

엽산과 비타민 B₁₂ 결핍에 의한 호모시스테인혈증 흰쥐의 조직내 비타민 지표간의 상관관계 분석*

민혜선[§] · 김미숙

한남대학교 생명나노과학대학 식품영양학과

A Critical Evaluation of the Correlation Between Biomarkers of Folate and Vitamin B₁₂ in Nutritional Homocysteinemia*

Min, Hyesun[§] · Kim, Misook

Department of Food and Nutrition, College of Bio-Nano Science, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

Folate and vitamin B₁₂ are essential cofactors for homocysteine (Hcy) metabolism. Homocysteinemia has been related with cardiovascular and neurodegenerative disease. We examined the effect of folate and/or vitamin B₁₂ deficiency on biomarkers of one carbon metabolism in blood, liver and brain, and analyzed the correlation between vitamin biomarkers in mild and moderate homocysteinemia. In this study, Sprague-Dawley male rats (5 groups, n = 10) were fed folate-sufficient diet (FS), folate-deficient diet (FD) with 0 or 3 g homocystine (FSH and FDH), and folate-/vitamin B₁₂-deficient diet with 3 g homocystine (FDHCD) for 8 weeks. The FDH diet induced mild homocysteinemia (plasma Hcy 17.41 ± 1.94 nmol/mL) and the FDHCD diet induced moderate homocysteinemia (plasma Hcy 44.13 ± 2.65 nmol/mL), respectively. Although liver and brain folate levels were significantly lower compared with those values of rats fed FS or FSH (p < 0.001, p < 0.01 respectively), there were no significant differences in folate levels in liver and brain among the rats fed FD, FDH and FDHCD diet. However, rats fed FDHCD showed higher plasma folate levels (126.5 ± 9.6 nmol/L) compared with rats fed FD and FDH (21.1 ± 1.4 nmol/L, 22.0 ± 2.2 nmol/L) (p < 0.001), which is the feature of "ethyl-folate trap" by vitamin B₁₂ deficiency. Plasma Hcy was correlated with hepatic folate (r = -0.641, p < 0.01) but not with plasma folate or brain folate in this experimental condition. However, as we eliminated FDHCD group during correlation test, plasma Hcy was correlated with plasma folate (r = -0.581, p < 0.01), hepatic folate (r = -0.684, p < 0.01) and brain folate (r = -0.321, p < 0.05). Hepatic S-adenosylmethionine (SAM) level was lower in rats fed FD, FDH and FDHCD than in rats fed FS and FSH (p < 0.001, p < 0.001 respectively) and hepatic S-adenosylhomocysteine (SAH) level was significantly higher in those groups. The SAH level in brain was also significantly increased in rats fed FDHCD (p < 0.05). However, brain SAM level was not affected by folate and/or vitamin B₁₂ deficiency. This result suggests that dietary folate- and vitamin B₁₂-deficiency may inhibit methylation in brain by increasing SAH rather than decreasing SAM level, which may be closely associated with impaired cognitive function in nutritional homocysteinemia. (Korean J Nutr 2009; 42(5): 423~433)

KEY WORDS: homocysteine, S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, DNA methylation, cognitive function.

서론

엽산과 비타민 B₁₂는 호모시스테인이 메티오닌으로 메틸

접수일 : 2009년 6월 10일 / 수정일 : 2009년 7월 7일

채택일 : 2009년 7월 10일

*This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (KRF-2004-204-C00085) and also supported by Hannam University Research Fund (2009).

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hsmi@hnu.kr

화되는 과정에 필요한 영양소로서 뇌의 기능에 중요한 역할을 한다.¹⁻³⁾ 호모시스테인은 비필수 아미노산으로서 신경퇴화를 촉진하여 정신질환 및 치매를 비롯한 노인기 신경질환의 독립적인 위험인자로 작용하는 것으로 보고되고 있다.⁴⁻⁷⁾ 호모시스테인이 신경계 작용을 저해한다는 사실은 cystathionine β-synthase 결핍 환자의 지적능력 손상, 뇌조직 위축 및 경련 증상 등으로부터 이미 오래전부터 알려져 있었다.^{8,9)} 노인 대상 연구에서 혈장내 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도가 낮을 때 혈장호모시스테인 농도가 높은

경향을 나타냈으며, 연령이 높을수록 혈장 호모시스테인 농도가 높았다.¹⁰⁾

신경정신계 질환자들을 대상으로 조사된 연구에서 이 환자들 가운데 엽산과 비타민 B₁₂ 결핍이 빈번하게 나타났으며,¹¹⁻¹³⁾ 이 두 비타민의 결핍이 신경계질환을 가져오는 원인은 직접적으로 신경계에 손상을 주거나 또는 호모시스테인 농도를 증가시킴으로써 간접적으로 신경계 손상을 가져오는 것으로 보고되었다.^{3,14,15)} 일부 연구에서 호모시스테인 증가되었을 때 DNA의 메틸화가 저하되고, DNA 손상이 증가되며 세포사멸이 증가되어 신경이 손상되는 것으로 제안되었다.^{14,16,17)} 즉, 엽산 또는 비타민 B₁₂가 결핍되었을 때 뇌조직의 S-adenosylmethionine (SAM) 농도가 저하되고 S-adenosylhomocysteine (SAH) 농도가 증가되어 저메틸화를 가져오기 때문에 신경이 손상되는 것으로 제안하였다.^{18,19)} SAM은 DNA 메틸화 뿐 아니라 epinephrine과 phosphatidylethanolamine과 같은 신경전달물질의 합성에 필수적인 역할을 하므로 뇌조직에서 가장 중요한 메틸 공여체로 작용한다.²⁰⁾ 따라서 엽산 또는 비타민 B₁₂가 결핍되면 SAM 합성의 저하와 SAH 합성의 증가로 인해 SAM/SAH 비율이 저하됨으로써 DNA 손상을 일으켜 세포사멸을 가져오므로, 호모시스테인이 신경계에 간접적으로 독성을 나타내는 것으로 보고하였다.¹⁴⁾

비타민 B₁₂가 결핍되면 methionine synthase (MS) 활성이 저하되며, 이로 인해 호모시스테인으로부터 메티오닌의 합성이 저해되기 때문에 호모시스테인이 축적됨과 동시에 메티오닌 대사회로에 이상이 초래한다. 이 현상은 “methyl-folate trap” 가설에 의해 다음과 같이 설명되고 있다.²¹⁻²³⁾ 비타민 B₁₂가 결핍되면 methionine synthase 활성이 저하되므로 MS의 조효소로 이용되는 5-methyltetrahydrofolate (5MTHF)가 다른 형태로 전환되지 못하고 축적되는데, 이는 MS에 의한 효소반응이 5MTHF를 다른 형태로 전환시키는 유일한 반응이기 때문이다. 따라서 비타민 B₁₂가 결핍되면 세포내 엽산은 5MTHF 형태로 trap되고, 그 결과 DNA합성과 세포분열과 단백질의 메틸화가 저해된다. 이와 동시에 메티오닌의 합성이 저하되어 SAM 농도가 저해된다. SAM은 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)의 강력한 저해제이므로 SAM 농도가 저하되면 MTHFR 활성이 up-regulate되므로, 5, 10-methylene-THF가 5MTHF로 환원되는 반응이 더욱 촉진되어 세포내에 엽산이 충분량 있어도 메티오닌 대사회로가 저해되고, 엽산은 DNA 합성에 이용될 수 없는 5MTHF 형태로 trap된다.²¹⁻²³⁾ 또한 5MTHF는 folylpolyglutamate synthase에 대한 친화력이 매우 낮으므로 polyglutamate 형태로 잘 전환되지

않아서, 엽산이 세포내에 효율적으로 보유되지 않고 혈액으로 방출된 후 소변으로 배설되므로 조직내 총엽산 함량이 낮아진다.^{23,24)} 이런 이유에서 엽산 결핍과 비타민 B₁₂의 결핍시 엽산대사와 메티오닌 대사회로의 biomarker에 나타나는 변화양상이 다르므로, 이들 비타민 결핍에 의한 호모시스테인혈증에 있어 혈장 호모시스테인, 혈장 및 조직세포의 엽산농도 및 간과 뇌 조직에서 메티오닌 대사회로의 biomarker들 간의 상관관계가 달라지나 이에 대한 연구가 미흡하다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 엽산 결핍식을 이용하여 경미한 호모시스테인혈증 (mild homocysteinemia)을 유발하고, 엽산/비타민 B₁₂ 결핍식을 이용하여 중위의 호모시스테인혈증 (moderate homocysteinemia)을 유발한 상태에서 두 비타민의 biomarker인 혈장 호모시스테인과 간과 뇌 조직 SAH, SAM 및 혈장, 간 및 뇌 조직 엽산농도 사이의 상관관계를 분석함으로써 엽산결핍과 비타민 B₁₂ 결핍에 의한 호모시스테인혈증의 특성을 “methyl-folate trap” 가설에 근거하여 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 사육과 실험식

실험동물의 사육 및 관리는 NIH Guide (NIH Publications NO. 80-23, 1996)에 따라 수행되었다. Sprague Dawley 중 6 주령 숫컷 쥐 (187.2 ± 10.5 g) 50마리를 일본 Slc 사 (Hamamatsu, Japan)에서 분양받아 3일간 고형사료를 공급한 후, 체중에 따라 난괴법으로 5군으로 나누어 스텐레스 사육장에 한 마리씩 분리하여 실험식으로 8주간 사육하였다. 사육실의 온도와 습도는 각각 22 ± 2°C, 50 ± 5%로 유지하였으며 조명은 12시간 주기 (9 : 00~21 : 00)로 조절하였고 물은 2차 증류수로 급여하였다.

영양결핍 (엽산 또는 비타민 B₁₂)에 의한 영양성 호모시스테인혈증 (nutritional homocysteinemia)을 유도할 목적으로 엽산결핍식이, 비타민 B₁₂ 결핍식이 및 0.3% 호모시스틴 첨가식이²⁵⁾를 이용하였다. 실험식은 AIN-93M식이 (Dyets, Bethlehem, PA, USA)를 기준으로 대조군은 엽산충분식이 (FS)를 주었으며, 엽산충분식이에 호모시스틴을 첨가한 식이 (FSH), 엽산결핍식이 (FD), 엽산결핍식이에 호모시스틴을 첨가한 식이 (FDH) 및 엽산/비타민 B₁₂ 결핍식이에 호모시스틴을 첨가한 식이 (FDHCD)를 각각 공급하였다 (Table 1). 식이섭취량은 2일에 한 번씩 측정하였으며, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율 (Food efficiency ratio: FER)은 일정기간의 체중

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients (g/kg diet)	Group				
	FS	FSH	FD	FDH	FDHCD
Cornstarch	465.62	462.62	465.62	462.62	462.62
Casein (>85%)	140	140	140	140	140
Dextrinized cornstarch	155	155	155	155	155
Sucrose	100	100	100	100	100
Soybean oil	40	40	40	40	40
Fiber (Pectin) ¹⁾	50	50	50	50	50
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35	35	35	35	35
L-Cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate (41.1% choline)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-Butylhydroquinone	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10	0	10	0	0
Folate-free vitamin mix ²⁾	0	10	0	10	0
Folate & B ₁₂ -free vitamin mix ³⁾	0	0	0	0	10
Homocystine	0	3	0	3	3

1) Five percent of pectin was added to each diet for the purpose of accelerating depletion of vitamin B₁₂

2), 3) Folate-free vitamin mix and folate & B₁₂-free vitamin mix were made from AIN-93-vitamin mix by omitting folate or folate & vitamin B₁₂, respectively

FS: folate-sufficient diet, FSH: folate-sufficient/0.3% homocystine diet, FD: folate-deficient diet, FDH: folate-deficient/0.3% homocystine diet, FDHCD: folate-deficient/vitamin B₁₂-deficient/0.3% homocystine diet

증가량을 동일기간 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

시료수집 및 전처리

실험기간이 종료되기 전날부터 동물을 12시간 절식시킨 상태에서 CO₂ 가스로 마취시킨 뒤 개복하여 심장천자법으로 헤파린 처리된 주사기를 사용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 즉시 1,500 g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리 및 채취한 후 즉시 -70°C에 냉동 보관하였다. 간과 뇌조직을 적출한 후 무게를 측정하고 즉시 액체질소로 급속 냉동시켜 -70°C에 냉동 보관하였다가 생화학적 분석에 사용하였다.

조직 및 혈장의 엽산 분석

시료의 엽산 함량은 *Lactobacillus casei* (ATCC 7469)를 이용한 미생물학적 분석방법을 96-well에 적용시킨 방법으로 분석하였다.²⁶⁾ 간과 뇌조직의 엽산은 aultolysis 방법에²⁷⁾ 의해 polyglutamate chain을 가수분해한 후 분석하였으며 혈장엽산은 전처리 없이 직접 미생물학적 분석법으로 분석하였다.

혈장 호모시스테인 분석

혈장 호모시스테인 농도는 Araki & Sako의 HPLC법²⁸⁾을 일부 수정한 방법²⁹⁾을 이용하여 분석하였다. 혈장 호모시스테인의 티올기와 ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate (Wako chemicals, Osaka, Japan)

를 반응시켜 높은 형광성을 나타내면서 안정한 성질의 형광 물질을 형성시켰다. ODS Hypersil analytical column (250 × 4.6 mm, I.D. 5 μm, Thermo-Keystone, Runcorn, Great Britain)을 이용하여 분리한 후 RF-10AXL fluorescence detector (Shimadzu, Kyoto, Japan)로 정량하였다.

간과 뇌조직의 SAM과 SAH의 분석

간과 뇌조직내 SAM과 SAH의 농도는 Wagner 등³⁰⁾의 방법 의해 측정하였다. 조직을 0.4 M perchloric acid 용액을 이용하여 분쇄한 후 원심분리하여 얻은 상청액을 당일 분석하였다. 상청액은 centrifugal filter (Millipore사)로 여과한 후 ODS Betasil analytical column (250 × 4.6 mm, I.D. 5 μm, Thermo-Keystone, Runcorn, Great Britain)에 주입하였으며, gradient mobile phase를 이용하여 분리하였다. SPD-10A UV detector (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 254 nm에서의 얻은 흡광도의 면적을 이용하여 SAM과 SAH의 농도를 정량하였다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 SPSS PC⁺ 14.0 통계 package program을 이용하여 수행하였다. 실험식이 처리에 의한 각 분석 항목의 분석치는 평균값과 표준오차 (Mean ± S.E.)로 나타냈으며, 실험군 간의 비교는 일원배치분산분석으로 분석하였다. 식이에 따른 측정치의 평균값의 차이에 대한 유의성은 Duncan의 다중비교법을 이용하여 사후검정하였

다. 변인들 사이의 상관관계는 Pearson test로 조사하였다. 모든 통계처리는 양측 검정하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

결 과

식이섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율

실험식이를 6주령 흰쥐에게 8주간 급여한 후 성장률을 비교하였다 (Table 2). FD군과 FDH군의 성장은 FS군과 비슷한 성장률을 나타냈다. 그러나 FDHCD군은 다른 식이군과 비교할 때 성장이 유의적으로 저하되었다. 식이섭취량은 FS, FD, FDH의 식이섭취량은 비슷한 섭취량을 보였으나 FDHCD군은 유의적으로 적은 식이 섭취량을 나타냈다 ($p < 0.05$). 또한 FDHCD군의 식이효율은 0.218 ± 0.005 로서 다른 실험군보다 유의적으로 낮았다 ($p < 0.001$). 이 결과로부터 엽산과 B₁₂가 동시에 결핍된 식이군은 낮은 식이섭취량과 식이효율로 인해 체중증가가 유의적으로 감소된 것으로 보인다. 그러나 식이에 0.3% 호모시스틴 첨가하거나 엽산 결핍식이 공급은 흰쥐의 성장에 유의적인 영향을 주지 않았다.

혈장, 간 및 뇌조직의 엽산농도

혈장과 간 및 뇌조직의 엽산 농도를 분석한 결과는 Table 3과 같았다. 혈장 엽산 농도는 엽산결핍식이군 (FD, FDH)이 각각 21.1 ± 1.4 nmol/L, 22.0 ± 2.2 nmol/L으로 유사했으며, 대조군 (162.3 ± 13.5 nmol/L)의 약 13% 수준으로 유의적으로 낮았다 ($p < 0.001$). 이와 대조적으로 FDHCD군의 혈장 엽산농도는 126.5 ± 9.6 nmol/L로서 대조군보다는 낮았지만, FD군과 FDH군의 약 6배 높은 수준이었다. 간 엽산농도는 FD군, FDH군에서 각각 5.1 ± 0.4 nmol/g, 4.8 ± 0.4 nmol/g로 대조군 (17.3 ± 0.78 nmol/g)과 비교할 때 각각 대조군의 28% 또는 27% 수준으로 저하되었다 ($p < 0.001$). FDHCD군의 간 엽산농도는 $4.4 \pm$

0.3 nmol/g으로 FD, FDH군과 유의적인 차이가 없었다.

이와 대조적으로 뇌조직의 엽산농도는 엽산결핍식이군 (FD, FDH)에서 각각 599.3 ± 72.5 nmol/g, 599.1 ± 107.0 nmol/g로서 대조군 (4.31 ± 0.09 nmol/g)의 약 87~92% 수준으로 저하되었으나 ($p < 0.001$), FDHCD군의 뇌엽산농도는 772.1 ± 145.4 nmol/g으로 대조군과 동일한 수준을 나타냈다.

혈장 호모시스테인

엽산과 비타민 B₁₂ 결핍 및 호모시스틴 식이를 8주간 급여하였을 때 혈장호모시스테인 농도는 Fig. 1과 같았다. FSH군의 혈장 호모시스테인 농도 (7.00 ± 0.67 nmol/mL)는 대조군 (4.95 ± 0.43 nmol/mL) 보다 다소 증가되었으나 차이가 유의적이지 아니었으므로 정상식이에 0.3% 호모시스틴을 첨가하였을 때 호모시스테인혈증이 유발되지 않았으며, FD군과 FDH군의 혈장 호모시스테인 농도는 각각 13.75 ± 3.03 nmol/mL, 17.41 ± 1.94 nmol/mL로 증가되어 경미한 호모시스테인혈증이 유발되었다 ($p < 0.001$). 그러나 FDHCD군의 혈장 호모시스테인 농도는 44.13 ± 2.65 nmol/mL로서 중위의 호모시스테인혈증이 나타났으므로, 엽산 및 비타민 B₁₂ 결핍과 호모시스틴 첨가에 의한 FDHCD식으로 인한 호모시스테인혈증 (nutritional homocyst-

Table 3. The effects of folate- and vitamin B₁₂-deficient diet combined with homocystine feeding on plasma and liver folate concentration of rats

Group	Plasma folate (nmol/L)	Liver folate (μ mol/g)	Brain folate (nmol/g)
FS	$162.3 \pm 13.5^{1)ab}$	17.3 ± 0.7^a	772.3 ± 139.7^a
FSH	172.9 ± 14.4^a	17.6 ± 1.4^a	801.1 ± 144.3^a
FD	21.1 ± 1.4^c	5.1 ± 0.4^b	599.3 ± 72.5^b
FDH	22.0 ± 2.2^c	4.8 ± 0.4^b	599.1 ± 107.0^b
FDHCD	126.5 ± 9.6^b	4.4 ± 0.3^b	772.1 ± 145.4^a

1) Values are mean \pm S.E. (n = 10)

2) Values with different superscript letter within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple-range test

Table 2. The effects of folate- and vitamin B₁₂-deficient diet combined with homocystine feeding on food intake, body weight gain, food efficiency ratio, and body weight of rats

Group	Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	F.E.R ¹⁾	Body weight (g)
FS	$5.3 \pm 0.1^{2)ab}$	19.78 ± 0.51^{ab}	0.270 ± 0.003^a	387.2 ± 8.4^a
FSH	5.6 ± 0.2^a	20.82 ± 0.67^a	0.268 ± 0.004^a	401.0 ± 12.0^a
FD	5.4 ± 0.3^a	20.70 ± 0.75^a	0.259 ± 0.004^a	389.5 ± 15.5^a
FDH	5.6 ± 0.2^a	21.07 ± 0.51^a	0.267 ± 0.006^a	404.8 ± 13.2^a
FDHCD	4.0 ± 0.1^b	18.47 ± 0.28^b	0.218 ± 0.005^b	314.7 ± 6.9^b
F-value	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

1) Food efficiency ratio (g body weight gain/ g feed)

2) Values are mean \pm S.E. (n = 10)

3) Means in the same row not sharing a common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple-range test

einemia)을 흰쥐에게 유발시킬 수 있었다.

간과 뇌조직의 S-adenosylmethionine과 S-adenosylhomocysteine

엽산 또는 비타민 B₁₂ 결핍 및 호모시스틴 식이가 간과 뇌조직의 SAH와 SAM에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같았다. FD군과 FDH군의 간조직의 SAH 농도는 각각 대조군 보다 44% 및 50%씩 증가되었고 (p < 0.001), 간 SAM 농도는 대조군 보다 각각 72%, 71% 저하되었으며 (p < 0.001), 그 결과 두 군 모두 SAM/SAH 비율이 대조군 보다 약 80% 저하되었다 (p < 0.001). 한편 FDHCD군의 간 SAH 농도를 대조군과 비교할 때 대조군 보다 107% 증가되었고 (p < 0.001), SAM 농도는 대조군 보다 81% 저하되어 (p < 0.001) SAM/SAH 비율이 대조군 보다 약 90% 저하되어 매우 낮은 SAM/SAH 비율을 나타냈다 (p

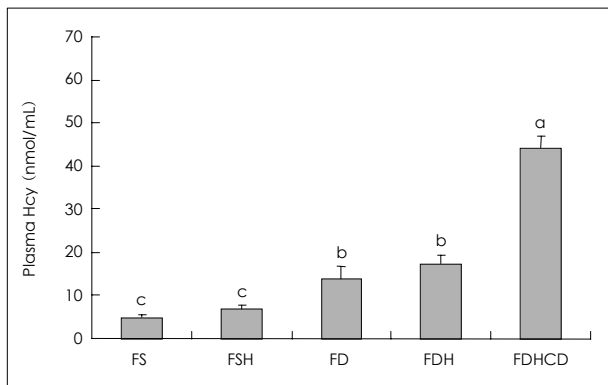


Fig. 1. The effects of folate- and vitamin B₁₂-deficient diet combined with homocystine feeding on plasma homocysteine. Mean ± S.E (n = 10). Bars with different superscript letter are significantly different among groups (p < 0.05). Folate-deficient diets (FD, FDH) elevated plasma homocysteine significantly (p < 0.001), whereas homocystine feeding alone did not affect plasma Hcy in rats. Mild homocysteinemia was induced by FD or FDH and moderate homocysteinemia was induced by FDHCD. FS: folate-sufficient diet, FSH: folate-sufficient/0.3% homocystine diet, FD: folate-deficient diet, FDH: folate-deficient/0.3% homocystine diet, FDHCD: folate-deficient/vitamin B₁₂-deficient/0.3% homocystine diet.

<0.001).

간조직과 대조적으로 FSH, FD 및 FDH 식이군의 뇌조직 SAM 농도는 엽산결핍, 비타민 B₁₂ 결핍 및 호모시스틴 급여에 의해 영향을 받지 않고 대조군과 유사한 수준을 보였다 (Table 4). 그러나 FDHCD군의 뇌조직 SAH 농도는 대조군 보다 60% 증가되었으며 (p < 0.05), 그 결과 SAM/SAH 비율은 대조군 보다 약 28% 저하되었다 (p < 0.05).

비타민 biomarker들 사이의 상관관계

영양성 호모시스테인혈증 가운데 엽산 결핍에 의한 호모시스테인혈증과 비타민 B₁₂ 결핍에 의한 호모시스테인혈증은 메티오닌 대사회로의 중간대사물질인 호모시스테인, SAM 및 SAH 농도에 각각 다른 영향을 줄 수 있으며,¹⁷⁾ 이로 인해 두 영양소가 부족할 때 나타나는 vitamin biomarker들의 변화를 비교하였다. 따라서 전체 실험군 (5개 실험군)과 엽산과 비타민 B₁₂가 동시에 부족한 FDHCD군을 제외한 4개 실험군의 자료를 따로 분리하여, 호모시스테인혈증과 관련된 biomarker들 사이의 상관관계를 분석하여 Pearson의 상관계수를 Fig. 2와 Table 5에 각각 A, B로 제시하였다. Fig. 2A에서 볼 수 있듯이 혈장 호모시스테인은 간 엽산과는 음의 상관관계 (r = -0.641, p < 0.01)을 보였으나 뇌 엽산 또는 혈장 엽산과는 유의적인 상관관계를 보이지 않았다. 그러나 이와 대조적으로 FDHCD군을 제외시킨 나머지 네개의 실험군 자료만으로 상관관계를 분석하였을 때 혈장 호모시스테인과 뇌 엽산 (r = -0.321, p < 0.05), 혈장 엽산 (r = -0.581, p < 0.01) 및 간 엽산 (r = -0.684, p < 0.01) 사이에 모두 유의적인 상관관계를 나타냈다.

혈장 호모시스테인과 간조직의 SAH 및 SAM 농도 사이의 상관관계는 Table 5의 A와 B와 같았으며, FDHCD군을 제외시킨 나머지 네 개의 실험군 자료만으로 상관관계를 분석하였을 때 뇌조직 SAH 농도들 제외한 모든 상관관계수가 전체 실험군 자료로 분석한 경우보다 높았다. 즉, Table 5A에서 혈장 호모시스테인과 간조직의 SAH 및 SAM

Table 4. The effects of folate- and vitamin B₁₂-deficient diet combined with homocystine feeding on liver and brain SAM and SAH concentration of rats

Group	Liver			Brain		
	SAH (nmole/g)	SAM (nmole/g)	SAM : SAH ratio	SAH (nmole/g)	SAM (nmole/g)	SAM : SAH ratio
FS	15.88 ± 0.85 ^{1)c2)}	41.73 ± 3.54 ^a	2.64 ± 0.21 ^a	1.55 ± 0.09 ^b	13.57 ± 0.31 ^{NS3)}	8.85 ± 0.46 ^a
FSH	15.11 ± 0.79 ^c	33.66 ± 2.70 ^b	2.26 ± 0.19 ^a	1.45 ± 0.09 ^b	14.25 ± 0.65	9.92 ± 0.47 ^a
FD	22.91 ± 1.64 ^b	11.83 ± 1.76 ^c	0.53 ± 0.08 ^b	1.44 ± 0.14 ^b	13.91 ± 0.66	9.93 ± 0.60 ^a
FDH	23.78 ± 0.91 ^b	12.10 ± 1.28 ^c	0.52 ± 0.06 ^b	1.43 ± 0.09 ^b	13.45 ± 0.31	9.47 ± 0.39 ^a
FDHCD	32.87 ± 1.43 ^a	7.93 ± 0.73 ^c	0.25 ± 0.03 ^b	2.49 ± 0.42 ^a	14.87 ± 0.42	6.37 ± 0.70 ^b

1) Values are mean ± S.E. (n = 10)

2) Values with different superscript letter within a column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple-range test

3) NS: not significant

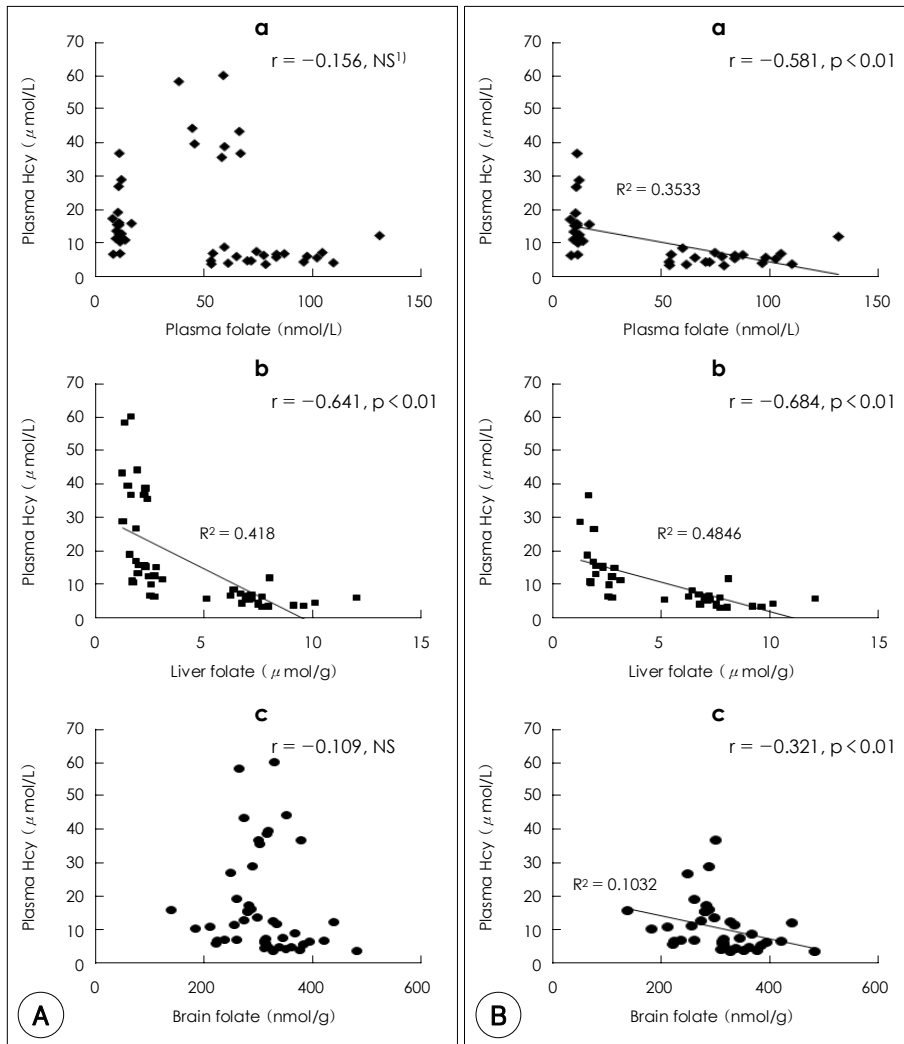


Fig. 2. The correlation between concentrations of plasma homocysteine and tissue folate. A: Data of biomarkers of FS, FSH, FD, FDH and FDCDH (5 groups) were analyzed for correlation test. Correlation coefficients between plasma homocysteine and plasma folate, a: liver folate, b: and brain folate, c. B: Data of biomarkers of FS, FSH, FD and FDH (4 groups) were analyzed for correlation test. NS: not significant.

농도 사이의 상관계수는 (각각 $r = 0.739, p < 0.01$; $r = -0.629, p < 0.01$)였으며, Table 5B에서의 이들 상관계수 (각각 $r = 0.878, p < 0.01$; $r = -0.657, p < 0.01$) 보다 높았다. 그러나 이와 대조적으로 혈장 호모시스테인과 뇌조직 SAH 사이의 상관관계는 FDHCD군을 포함하였을 때에만 유의적이었다 ($r = 0.667, p < 0.01$).

고 찰

역학조사 및 임상연구에서 호모시스테인혈증이 동맥경화성 심혈관계질환, 뇌졸중, 말초동맥경색질환 및 정맥전색의 독립적인 위험인자로 밝혀졌으며,^{3,5)} 인지능력손상, 치매, 알츠하이머 및 우울증과 같은 신경계질환의 위험인자로도 보고되었다.^{3,31-33)} 호모시스테인혈증은 엽산 또는 비타민 B₁₂가 결핍되거나 메티오닌 대사회로의 일부 효소활성이 결여되어 메티오닌 대사에 장애가 있을 때 나타난다. 엽산과 비

타민 B₁₂는 메티오닌 대사회로에 영향을 줌으로써 DNA 메틸화에 필요한 SAM의 합성 및 조직내 SAH의 수준을 유지시킴으로써 신경세포 및 혈관계의 기능을 정상으로 유지하는 것으로 제안되었으므로,³⁰⁻³²⁾ 본 연구에서는 환위를 대상으로 식이에 엽산과 비타민 B₁₂를 결핍시켜 경미한 호모시스테인혈증 또는 중위의 호모시스테인혈증을 유발하였으며 (Fig. 1), 메티오닌 대사 회로상의 이들 비타민 biomarker를 분석함으로써 영양성 호모시스테인혈증에 있어 엽산 결핍과 비타민 B₁₂ 결핍이 이 biomarker들 간의 상관관계에 미치는 영향을 조사하였다.

엽산결핍식이군 (FD, FDH)의 혈장 엽산농도는 대조군의 약 13% 수준으로 유의적으로 낮았으나 ($p < 0.001$), FDHCD군의 혈장 엽산농도는 FD군과 FDH군의 약 6배 높은 수준으로 조사되어, 엽산결핍/비타민 B₁₂ 결핍/호모시스테인군의 혈장 엽산 농도는 엽산만 결핍되었을 때보다 크게 높았다. 이 결과는 비타민 B₁₂ 결핍에 의한 "methyl-folate

Table 5. Correlation between the concentration of vitamin biomarkers in plasma, liver and brain

(A) Correlation among the five groups¹⁾								
	Plasma Hcy	Brain folate	Plasma folate	Liver folate	Liver SAH	Liver SAM	Brain SAH	Brain SAM
Plasma Hcy	1	-0.109	-0.156	-0.641**	0.878**	0.657**	0.667**	0.114
Brain folate		1	0.551**	0.467**	-0.181	0.320	-0.004	0.138
Plasma folate			1	0.712**	-0.409**	0.588**	0.069	0.018
Liver folate				1	-0.718**	0.812**	-0.333	0.035
Liver SAH					1	-0.673**	0.525**	0.080
Liver SAM						1	-0.284	-0.135

(B) Correlation among the four groups²⁾								
	Plasma Hcy	Brain folate	Plasma folate	Liver folate	Liver SAH	Liver SAM	Brain SAH	Brain SAM
Plasma Hcy	1	-0.321*	-0.581**	-0.684**	0.739**	-0.629**	0.207	0.005
Brain folate		1	0.575**	0.657**	-0.336*	0.406**	0.027	0.252
Plasma folate			1	0.850**	-0.774**	0.741**	0.044	-0.066
Liver folate				1	-0.714**	0.767**	-0.055	0.148
Liver SAH					1	-0.573**	0.739**	0.055
Liver SAM						1	0.049	-0.106

1) Data of the five experimental groups including FS, FSH, FD, FDH, and FDHCD were analysed according to Pearson test and correlation coefficients were presented. *: p < 0.05, **: p < 0.01

2) Data of the four experimental groups including FS, FSH, FD, and FDH were analysed according to Pearson test and correlation coefficients were presented. *: p < 0.05, **: p < 0.01

trap”으로 인해 엽산이 세포 내에 효율적으로 보유되지 못하고 혈류로 운반된 후 배설되기 때문인 것으로 보인다.²¹⁻²⁴⁾ 이와 대조적으로 뇌조직의 엽산농도는 엽산결핍식이군 (FD, FDH)에서는 유의적으로 저하되었으나, 흥미롭게도 FDH-CD군의 뇌 엽산농도는 대조군과 동일한 수준을 나타냈다. 따라서 뇌조직은 다른 조직보다 엽산결핍식에 의해 경미하게 영향 받으며 엽산 농도의 항상성이 잘 유지되는 것으로 나타났다. 이와 같이 FDHCD군의 뇌 엽산 농도가 변화되지 않은 이유는 확실치 않으나, 뇌조직은 간조직과 일부 다른 단일탄소기 대사 체계를 가지고 있기 때문인 것으로 사료된다.

식이에 호모시스테인을 0.3% 수준으로 첨가하였을 때 (FSH) 혈장 호모시스테인 농도가 대조군 (4.95 ± 0.43 nmol/mL) 보다 증가하여 7.00 ± 0.67 nmol/mL으로 상승되었으나, 통계적으로 유의적인 차이는 아니었으며 또한 호모시스테인 혈중의 수준은 아닌 것으로 나타났다. 따라서 식이에 0.3%의 호모시스테인만을 공급하는 것으로는 호모시스테인혈중 유발에 미흡하므로 호모시스테인 첨가량을 증량하는 것이 필요한 것으로 보인다 (Table 4). 또한 엽산 결핍시에도 호모시스테인 첨가에 의한 혈장 호모시스테인에 유의적인 영향을 나타내지 않아서 Kim 등²⁵⁾의 연구와 차이가 있었다.

호모시스테인은 S-adenosylhomocysteine hydrolase의 강력한 저해제로 작용하므로 호모시스테인이 증가되면 조직의 SAH 농도도 증가되는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ 본 연

구의 엽산결핍군 (FD, FDH)에서 간조직내 SAM 농도는 약 70% 저하되고 SAH 농도는 약 50% 증가되었으며, 그 결과 SAM/SAH 비율이 대조군보다 약 80% 저하되었다. 또한 엽산결핍/비타민 B₁₂결핍/호모시스테인군 (FDHCD)의 경우 간조직내 SAM 농도는 약 81% 저하되고 SAH 농도는 약 107% 증가되었으며, 그 결과 SAM/SAH 비율이 대조군보다 약 90% 저하되었다. 이와 같이 비타민 B₁₂의 결핍시 SAH 농도가 특히 현저하게 증가되었다. 또한 SAM은 MTHFR의 알로스테릭 저해제로 작용하므로, 엽산과 비타민 B₁₂의 결핍으로 인한 SAM/SAH 비율의 저하는 MTHFR의 활성을 증가시켜 엽산의 기능적 결핍을 더욱 심화시키는 것으로 알려져 있다.^{35,36)} 이와 같이 SAM 합성이 저하되면 엽산 조효소가 5MTHF 형태로되어 메티오닌 대사 회로에 주로 이용되므로 DNA합성에 필요한 퓨린이나 피리미딘 합성에는 이용되지 못하게 되어, 세포분열과 단백질 합성을 제한하는 결과가 나타난다 (methyl-folate trap).²²⁾ 따라서 신경이나 뇌조직과 같은 조직에서 더 중요한 메틸화 반응에 메티오닌이 이용될 수 있도록 뇌조직에 메티오닌이 더 효율적으로 보유됨으로써 뇌의 SAM 농도는 간조직 SAM 농도와 달리 항상성이 잘 유지되는 것으로 보고되었다.²²⁾

엽산과 비타민 B₁₂는 호모시스테인으로부터 메티오닌이 합성되는 반응의 조효소로 작용하며, 메티오닌은 methionine-adenosyltransferase의 작용에 의해 SAM 합성에 이용되므로 호모시스테인이 메티오닌으로 재메틸화되는 반응

은 SAM의 합성에 필수적이다.^{2,37,38} Table 4와 같이 간 조직내 메티오닌 회로의 메틸화 관련 biomarker들이 크게 변화되었으며, 또한 SAH는 SAM이 메틸기를 전이하는 반응의 생성물이며 DNA 메틸화를 비롯한 여러 가지 메틸화 반응을 저해하는 물질이므로,³⁴ DNA를 비롯한 여러 물질들의 메틸화가 저해될 수 있다. 또한 SAM은 DNA methyltransferase의 메틸기 공여체이므로 조직내 SAM의 부족은 DNA 메틸화를 저하시킴으로써 신경조직의 발달 및 유지에 필요한 특정 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있는 것으로 제안되고 있다.^{39,40}

SAH는 SAH hydrolase에 의해 호모시스테인과 adenosine으로 분해되지만, 호모시스테인이 효율적으로 제거되지 않는 경우 SAH hydrolase의 반응이 역반응으로 일어나므로 호모시스테인으로부터 SAH가 합성되는 반응이 우세하게 일어난다.^{39,41} 그 이유는 methyltransferase에 대한 친화력이 SAM 보다 SAH가 훨씬 높기 때문이며, 이런 성질 때문에 거의 모든 종류의 methyltransferase의 효소 작용은 SAH에 의해 크게 저해된다.^{40,41} 이와 같이 SAH의 methyltransferase에 대한 친화력이 SAM 보다 큰 성질 때문에, SAH 농도가 SAM : SAH ratio 보다 methyltransferase의 활성저하와 더 밀접한 관계가 있었으며,^{40,41} 혈장과 림프구에서도 SAH 농도가 높을 때 DNA 메틸화 수준이 유의적으로 낮았다.⁴² 심혈관계 질환자의 혈장 호모시스테인 농도 (moderate homocysteinemia)와 혈장 SAH의 농도는 대조군보다 높았으며, 심혈관계질환자의 경우 이들 biomarker들 사이의 상관관계가 높았다.^{42,43}

간조직과 달리 엽산결핍식이군 (FD, FDH)의 뇌조직 SAM 농도는 엽산결핍, 비타민 B₁₂ 결핍 및 호모시스틴 급여에 의해 영향을 받지 않고 대조군과 유사한 수준을 보였다 (Table 4). 이와 같이 뇌조직의 SAM 농도는 엽산결핍과 비타민 B₁₂ 결핍식이에 의해 변화되지 않은 반면 SAH 농도는 엽산과 비타민 B₁₂ 결핍식이에 의해 유의적으로 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 뇌에는 간조직과 달리 betaine-homocysteine methyltransferase가 결여되어 있으므로 뇌의 호모시스테인 대사는 간조직과 동일하지 않을 것으로 생각된다.

메티오닌 대사회로의 biomarker들 간의 상관관계를 전체 실험군 (5개 실험군)을 대상으로 분석한 결과와 비타민 B₁₂ 부족군인 FDHCD군을 제외한 4개 실험군의 자료를 따로 분리하여 분석한 결과를 비교하였다 (Table 5). 전체 실험군 자료로 분석하였을 때에는 혈장 호모시스테인 농도는 혈장 엽산 및 뇌엽산과 상관관계를 나타내지 않았으며, 비타민 B₁₂ 결핍군 (FDHCD)을 제외시킨 나머지 4군 자료를 분

석하였을 때에만 유의적인 상관관계가 나타났다 (Fig. 2, Table 5A). 이와 같은 결과가 나타난 이유는 비타민 B₁₂가 결핍된 경우 간조직의 엽산농도는 저하되나 혈장과 뇌조직의 엽산농도는 상대적으로 영향을 받지 않기 때문에 비타민 B₁₂ 결핍시 혈장 호모시스테인, 혈장 엽산 및 뇌 엽산 농도 사이의 관계가 변화되기 때문인 것으로 보인다. 따라서 비타민 B₁₂ 결핍이 빈번히 나타나는 노인 대상의 역학조사 또는 인체연구에서 혈장내 비타민 biomarker들 사이의 상관성을 분석할 때 이를 고려할 필요가 있을 것으로 사료된다.

혈장 호모시스테인과 간조직의 SAH 및 SAM 농도 사이의 상관관계는 FDHCD군을 제외시킨 나머지 네 개의 실험군 자료만으로 상관관계를 분석하였을 때 뇌조직 SAH 농도들 제외한 모든 상관관계가 전체 실험군 자료로 분석한 경우보다 대체로 높은 경향이 있었다 (Table 5). 이와 대조적으로 혈장 호모시스테인과 뇌조직 SAH 사이의 상관관계는 FDHCD군을 포함하였을 때에만 유의적이었다. 이상의 결과로부터 간조직의 SAH와 SAM 농도는 혈장 호모시스테인과 유사하게 변화되나, 뇌조직의 SAH와 SAM의 농도는 간조직과 달리 혈장 호모시스테인과 관련되어 있지 않으며 뇌조직에는 SAM과 SAH의 독립적인 조절기전이 있기 때문인 것으로 추정된다. 또한 Table 5B에서만 혈장호모시스테인과 뇌조직 SAH 농도사이에 상관관계가 관찰된 이유는 엽산만 결핍된 경우 (FD 또는 FDH) 뇌조직의 SAH 농도가 증가되지 않았으나 (Table 4), 엽산과 비타민 B₁₂가 동시에 결핍된 FDHCD군에서 SAH가 현저하게 증가되었기 때문인 것으로 보인다.

일반 노인을 대상으로 한 연구에서 치매 환자들의 혈장내 엽산, 비타민 B₁₂ 및 B₆ 농도와 인지능력 점수 사이에 유의 상관관계가 관찰되었으며, 혈장 호모시스테인 농도는 조직내 엽산 또는 비타민 B₁₂ 및 B₆ 농도 보다 인지능력저하와 더 상관성이 높은 것으로 조사되었다.^{2,17} 또한 신경 및 정신 질환자들의 뇌, 척수액내 호모시스테인 농도는 정상인 보다 높았으며, 이때 뇌척수액의 호모시스테인 농도는 혈청 호모시스테인 농도와 비례관계를 나타냈다.^{44,45} 그러나 뇌척수액 호모시스테인 농도는 혈장 호모시스테인의 1/20~1/100 정도로 낮은 수준이었다.⁴⁵

우울증 환자들의 적혈구 엽산 및 혈장 엽산농도는 대조군 보다 낮았으며,⁴⁶ 우울증이 심한 정도와 혈청 엽산, 적혈구 엽산 및 엽산 결핍기간 사이에도 상관관계가 보고되었다.⁴⁷ 또한, 우울증환자의 약 31% 정도가 낮은 혈청 비타민 B₁₂ 수준을 나타냈으며 일반 여성을 대상으로 한 연구에서도 유사한 결과가 보고되었다.^{46,48}

심한 고호모시스테인혈증 환자들은 정신지체, 뇌위축, 발

작 등 광범위한 임상적 병변을 나타낸다.⁴⁹⁾ 이 환자들의 뇌 신경 손상의 원인이 호모시스테인의 직접적인 독성효과 때문인지 혈관병변을 통한 이차적인 결과인지는 확실하지 않으나, 최근에 호모시스테인은 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체에 agonist로 작용하여 신경장애를 가져오거나, 호모시스테인의 산화산물인 homocysteic acid가 뇌세포에서 생성된 후 신경자극에 의해 분비되어 NMDA 수용체를 활성화시켜 일종의 흥분성 신경전달물질로 작용하는 것으로 보고되고 있다.⁵⁰⁾ 비타민 B₁₂의 영양 상태를 정확히 판정하는 것은 매우 중요함에도 불구하고, 총 혈청 비타민 B₁₂의 5~20%만이 transcobalamin에 결합되어 세포내로 운반되므로 총 혈청 비타민 B₁₂ 농도는 비타민 B₁₂ 활성을 나타내는 적합한 지표가 아닌 것으로 지적되고 있다. 따라서 최근 연구에서는 혈장 호모시스테인과 혈장 methylmalonic acid 농도가 비타민 B₁₂ 결핍을 측정하는 지표로 많이 이용되고 있다.^{7,10)}

이상의 결과를 요약하면, 엽산 결핍과 엽산결핍/비타민 B₁₂ 결핍시에 혈장 엽산, 뇌 엽산 및 뇌 SAH와 호모시스테인 농도 사이의 상관관계가 현저한 차이를 보였다. 또한, 엽산/비타민 B₁₂ 결핍으로 인한 뇌 SAH 농도의 증가는 뇌조직에서 메틸화 저해요인으로 작용할 수 있으므로 영양성 호모시스테인혈증에서 나타나는 인지능력저하의 원인으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 흰쥐를 대상으로 엽산결핍 또는 엽산결핍/비타민 B₁₂결핍/0.3% 호모시스틴 식이의 공급을 통해 각각 경미한 호모시스테인혈증과 중위의 호모시스테인혈증을 유도한 후, 혈장, 간 및 뇌 조직내 메티오닌 대사회로 biomarker와 엽산 농도 사이의 상관관계를 분석함으로써 영양성 호모시스테인혈증의 특성을 규명할 목적으로 실시하였다. 6 주령 Sprague-Dawley 수컷 쥐에게 엽산이 충분한 식이 (FS), 엽산결핍식이 (FD), 또는 동일 식이에 호모시스틴을 첨가한 식이 (FSH and FDH), 엽산결핍/비타민 B₁₂ 결핍/호모시스틴 첨가 식이 (FDHCD)를 8주간 공급하였다.

1) FD와 FDH 식이군은 경미한 호모시스테인혈증을 (17.41 ± 1.94 nmol/mL) 나타냈으며, FDHCD 식이군은 중위의 호모시스테인혈증을 (44.13 ± 2.65 nmol/mL) 나타내어 엽산과 비타민 B₁₂결핍에 의한 영양성 호모시스테인혈증의 모델로 이용할 수 있었다.

2) FD, FDH, FDHCD 식이군의 간 (p < 0.001)과 뇌조직 (p < 0.01) 내 엽산 농도는 FS, FSH군 보다 유의적으

로 낮았으나, FD, FDH, FDHCD 식이군의 간 및 뇌조직의 엽산농도 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 이와 대조적으로 혈장 엽산 농도는 FDHCD 식이군 (126.5 ± 9.6 nmol/L)이 FD, FDH 식이군 (21.1 ± 1.4 nmol/L, 22.0 ± 2.2 nmol/L) (p < 0.001) 보다 약 6배 높았으며, 이는 비타민 B₁₂ 결핍에 의한 “methyl-folate trap”으로 인해 엽산이 효율적으로 조직내 보유되지 못하고 혈류로 나와 소변을 통해 배설되기 때문인 것으로 보인다.

3) FD와 FDH 식이군의 간조직의 SAH 농도는 각각 대조군 보다 44% 및 50%씩 증가되었고 (p < 0.001), 간 SAM 농도는 각각 대조군 보다 72%, 71% 저하되었으며 (p < 0.001), 그 결과 두 군 모두 SAM/SAH 비율이 대조군 보다 약 80% 저하되었다 (p < 0.001). 한편 FDHCD 식이군의 간 SAH 농도를 대조군과 비교할 때 대조군 보다 107% 증가되었고 (p < 0.001), SAM 농도는 대조군 보다 81% 저하되었으며 (p < 0.001), 그 결과 SAM/SAH 비율이 대조군 보다 약 90% 저하되어 매우 낮은 SAM/SAH 비율을 나타냈다 (p < 0.001). 뇌조직 SAM 농도는 엽산결핍, 비타민 B₁₂ 결핍 및 호모시스틴 급여에 의해 영향을 받지 않고 대조군과 유사한 수준을 보여 뇌조직내 SAM의 항상성을 나타냈으나, FDHCD 식이군의 뇌조직 SAH 농도는 대조군 보다 60% 증가되었으며 (p < 0.05), 그 결과 SAM/SAH 비율은 대조군 보다 약 28% 저하되었다 (p < 0.05). 따라서 중위의 호모시스테인혈증을 나타낸 실험군에서만 뇌조직의 SAH 농도가 증가되었다.

4) 영양결핍 (엽산 또는 비타민 B₁₂)에 의한 호모시스테인혈증의 특성을 조사할 목적으로 혈장, 간 및 뇌 조직내 메티오닌 대사회로 biomarker와 엽산 농도 사이의 상관관계를 조사하였다. 혈장 호모시스테인은 간 엽산과 음의 상관관계 (r = -0.641, p < 0.01)를 보였으나, 뇌 엽산 또는 혈장 엽산과는 유의적인 상관관계를 보이지 않았다. 그러나 이와 대조적으로 FDHCD 식이군을 제외시킨 나머지 네 개의 실험군 자료만으로 상관관계를 분석하였을 때 혈장 호모시스테인과 뇌 엽산 (r = -0.321, p < 0.05), 혈장 엽산 (r = -0.581, p < 0.01), 간 엽산 (r = -0.684, p < 0.01) 사이에 모두 유의적인 상관관계를 나타냈다. 혈장 호모시스테인과 간조직의 SAH 및 SAM 농도 사이의 상관관계는 FDHCD군을 제외시킨 나머지 네 개의 실험군 자료만으로 상관관계를 분석하였을 때 뇌조직 SAH 농도들 제외한 모든 상관관계수가 전체실험군 자료로 분석한 경우보다 높았다. 따라서 엽산결핍/비타민 B₁₂결핍으로 인한 호모시스테인혈증 (FDHCD)에서는 혈장 엽산이 엽산결핍군 (FD, FDH) 보다 높으면서 동시에 혈장 호모시스테인 농도도 높은 특성

을 보였다.

결론적으로, 식이 중 엽산만 결핍된 경우와 엽산결핍과 비타민 B₁₂ 결핍을 동반할 경우 “methyl-folate trap”으로 인해 혈장 엽산과 호모시스테인 농도 패턴에 차이가 있었으며, 메티오닌 대사회로의 biomarker 사이의 상관관계와 혈장 엽산, 뇌 엽산 및 뇌 SAH와 호모시스테인 농도 사이의 상관관계가 차이가 있었다. 또한 엽산 결핍과 비타민 B₁₂ 결핍으로 인해 나타나는 뇌 SAH 농도의 증가는 메틸화를 저해시킴으로써 인지능력에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

Literature cited

- Goodwin JS, Goodwin JM, Garry PJ. Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *JAMA* 1983; 249 (21) : 2917-2921
- Riggs KM, Spiro A III, Tucker K, Rush D. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 1996; 63 (3) : 306-314
- Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (2) : 614s-620s
- Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62
- Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food Nutr Bull* 2008; 29 (2 Suppl) : 116-125
- Morris MS. Homocysteine and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2 (7) : 425-428
- Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Elevated serum methylmalonic acid concentrations are common among elderly Americans. *J Nutr* 2002; 132 (9) : 2799-2803
- Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37 (1) : 1-31
- Yap S, Naughten E. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21 (7) : 738-747
- Obeid R, Schorr H, Eckert R, Herrmann W. Vitamin B12 status in the elderly as judged by available biochemical markers. *Clin Chem* 2004; 50 (1) : 238-241
- Carney MW, Sheffield BF. Serum folic acid and B12 in 272 psychiatric in-patients. *Psychol Med* 1978; 8 (1) : 139-144
- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; 55 (11) : 1449-1455
- Goodwin JS, Goodwin JM, Garry PJ. Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *JAMA* 1983; 249 (21) : 2917-2921
- Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000; 20 (18) : 6920-6926
- Rossi A, Cerone R, Biancheri R, Gatti R, Schiaffino MC, Fonda C, Zammarchi E, Tortori-Donati P. Early-onset combined methylmalonic aciduria and homocystinuria: neuroradiologic findings. *Am J Neuroradiol* 2001; 22 (3) : 554-563
- Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG, Miller JW, Selhub J, James SJ, Mason JB. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 1997; 65 (1) : 46-52
- Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocystinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55 (1) : 131-138
- Afman LA, Blom HJ, Drittij MJ, Brouns MR, van Straaten HW. Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 158 (1-2) : 59-65
- Schatz RA, Wilens TE, Sellinger OZ. Decreased transmethylation of biogenic amines after in vivo elevation of brain S-adenosyl-homocysteine. *J Neurochem* 1981; 36 (5) : 1739-1748
- Scott JM. Folate-vitamin B12 interrelationships in the central nervous system. *Proc Nutr Soc* 1992; 51 (2) : 219-224
- Herbert V, Zalusky R. Interrelations of vitamin B12 and folic acid metabolism: folic acid clearance studies. *J Clin Invest* 1962; 41 : 1263-1276
- Scott JM, Weir DG. The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid induced exacerbation of subacute combined degeneration in pernicious anaemia. *Lancet* 1981; 2 (8242) : 337-340
- Shane B, Stokstad EL. Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr* 1985; 5: 115-141
- Deacon R, Lumb M, Perry J, Chanarin I, Minty B, Halsey MJ, Nunn JF. Selective inactivation of vitamin B12 in rats by nitrous oxide. *Lancet* 1978; 2 (8098) : 1023-1024
- Kim JM, Lee HY, Jang N. Effects of dietary folate supplementation on the homocysteine diet-induced hyperhomocystinemia and hepatic S-adenosylmethionine metabolism in rats. *Korean J Nutr* 2003; 36 (8) : 811-818
- Tamura T. Microbiological assay of folate, in *Folic Acid Metabolism in Health and Disease* (Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF eds.), New York: Wiley-Liss; 1990. p.121-137
- Bird OD, McGlohon VM, Vaitkus JW. A microbiological assay system for naturally occurring folate. *Can J Microbiol* 1969; 15 (5) : 465-472
- Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422: 43-52
- Min H, Im ES, Seo JS, Mun JA, Burri BJ. Effects of chronic ethanol ingestion and folate deficiency on the activity of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29 (12) : 2188-2193
- Wagner J, Claverie N, Danzin C. A rapid high-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination

- of methionine, ethionine, S-adenosylmethione, S-adenosylethione, and the natural polyamines in rat tissues. *Anal Biochem* 1984; 140(1): 108-116
- 31) Fratiglioni L, Ahlbom A, Viitanen M, Winblad B. Risk factors for late-onset Alzheimer's disease a population-based, case-control study. *Ann Neurol* 1993; 33(3): 258-266
 - 32) Seshadri S, Drachman DA, Lippa CF. Apolipoprotein E4 allele and the lifetime risk of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1995; 52(11): 1074-1079
 - 33) Guo Z, Cupples LA, Kurz A, Auerbach SH, Volicer L, Chui H, Green RC, Sadovnick AD, Duara R, DeCarli C, Johnson K, Go RC, Growdon JH, Haines JL, Kukull WA, Farrer LA. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology* 2000; 54(6): 1316-1323
 - 34) Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem* 1979; 57(1): 56-65
 - 35) Kutzbach C, Stokstad EL. Feedback inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase in rat liver by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1967; 139(1): 217-220
 - 36) Kutzbach C, Stokstad EL. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 1971; 250(3): 459-477
 - 37) Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(4): 511-519
 - 38) Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr* 2002; 132(8 Suppl): 2333s-2335s
 - 39) Wong DL, Yamasaki L, Ciaranello RD. Characterization of the isozymes of bovine adrenal medullary phenylethanolamine N-methyltransferase. *Brain Res* 1987; 410(1): 32-44
 - 40) Lee HS, Schulz AR, Fuller RW. Isolation and purification of rabbit adrenal norepinephrine N-methyl transferase isozymes. *Arch Biochem Biophys* 1978; 185(1): 222-227
 - 41) Zhu BT, Patel UK, Cai MX, Conney AH. O-Methylation of tea polyphenols catalyzed by human placental cytosolic catechol-O-methyltransferase. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(9): 1024-1030
 - 42) Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000; 275(38): 29318-29323
 - 43) Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(6): 723-729
 - 44) Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293(5): 1485-1488
 - 45) Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y. Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Life Sci* 2005; 77(15): 1836-1843
 - 46) Abou-Saleh MT, Coppen A. The biology of folate in depression: implications for nutritional hypotheses of the psychoses. *J Psychiatr Res* 1986; 20(2): 91-101
 - 47) Carney MW, Chary TK, Laundry M, Bottiglieri T, Chanarin I, Reynolds EH, Toone B. Red cell folate concentrations in psychiatric patients. *J Affect Disord* 1990; 19(3): 207-213
 - 48) Penninx BW, Guralnik JM, Ferrucci L, Fried LP, Allen RH, Stabler SP. Vitamin B(12) deficiency and depression in physically disabled older women: epidemiologic evidence from the Women's Health and Aging Study. *Am J Psychiatry* 2000; 157(5): 715-721
 - 49) Watkins D, Rosenblatt DS. Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet* 1989; 34(3): 427-434
 - 50) Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(11): 5923-5928