대한산업의학회지 제 14 권 제 1 호 (2002년 3월)
Korean J Occup Environ Med, 2002;14(1):23~33

흰쥐 뇌의 선조체에서 망간에 의한 산화적 스트레스에 관한 연구

한양대학교 의과대학 산업의학교실, 예방의학교실[1], 약리학교실[2]

이수진 · 홍순오[1] · 고현철[2]

— Abstract —

Manganese-induced Oxidative Stress in the Corpus Striatum of the Rat Brain

Soo-Jin Lee, Soonoh Hong[1], Hyun Chul Koh[2]

Department of Occupational & Environmental Medicine, Hanyang University College of Medicine, Department of Preventive Medicine, Hanyang University College of Medicine[1], Department of Pharmacology, Hanyang University College of Medicine[2]

Objectives: This study was undertaken to identify the effect of oxidative stress on the pathology of manganese intoxication through an analysis of manganese concentrations, superoxide dismutase (SOD) activities, malondialdehyde (MDA) concentrations, and the compositional changes of fatty acids from the corpus striatum of the rat brain.

Methods: Ten Sprague-Dawley rats were equally divided into two groups. Five rats in the experimental group were administered $MnCl_2$ intraperitoneally for 4 weeks (4 ㎎/㎏ once daily, 5 days per week) and another five rats from the control group were given normal saline. Twenty-four hours after the last injection, the rats were decapitated and, the corpus striatum was isolated from the brain.

Results: In the corpus striatums of the experimental group, manganese concentrations increased significantly by 139 % ($p<0.01$). The SOD activities decreased significantly by 81 % ($p<0.01$) and the MDA concentrations increased significantly by 138 % ($p<0.01$) as compared to the control group. Among fatty acids, total n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) increased significantly by 325 % ($p<0.01$) as compared with the control group. Arachidonic acids (AA) increased by 341 % ($p<0.01$), and these increases were composed mostly of n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA). Among n-3 PUFAs, with the exception of linolenic acids, eicosapentanoic acid (EPA) decreased significantly by 72 % ($p<0.05$) and docosahexanoic acids (DHA) decreased by 67 % ($p<0.05$) as compared with the control group.

Conclusions: Our results suggest that the oxygen free radicals produced by manganese may cause compositional changes of fatty acids in the corpus striatum of the rat brain. The characteristics of the fatty acids' compositional changes by manganese were a decrease of EPAs and DHAs (n-3 PUFAs), and an increase of AAs (n-6 PUFAs). These changes coupled with the decrease of SOD activity and the increase of MDA, suggest that manganese neurotoxicity is caused by lipid peroxidation mediated with oxygen free radicals, particularly superoxide radicals.

Key Words : Manganese, Corpus striatum, Superoxide dismutase, Malondialdehyde, Fatty acid, Oxidative stress

<접수일 : 2001년 11월 22일, 채택일 : 2002년 1월 23일>
교신저자 : 이 수 진 (Tel : 02-2290-9292) E-mail : sjlee@hanyang.ac.kr

* 이 논문은 1999년 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

서 론

동물이나 인체에서 필수원소의 하나인 망간은 결핍시에는 성장장애, 골격변형, 생식불능이나 신생아 사망 등을 유발하고(Hurley, 1981), 과다 노출시에는 망간중독증을 일으키는 것으로 알려져 있다. 일반적인 노출원은 망간광석, 망간제련 및 합금, 망간 함유 세라믹, 건전지의 분극제, 화학공업의 산화제, 농약 생산 및 망간 흄이 발생하는 용접작업 등의 직업적 노출이며, 최근 무연가솔린 및 제트연료의 항녹킹제로 이용되는 methyl-cyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT)에 의한 노출도 문제시 되고있다(Zayed et al, 1999). 또한, 고농도의 망간을 함유하는 곡물과 육류의 섭취 및 살충제에 의해 오염된 음식물을 통해서도 흡수될 수 있으며, 성인의 경우 1일 약 4 ㎎이 식품섭취를 통해 흡수된다(U.S.EPA, 1984).

망간중독증의 초기에는 피로감, 두통, 수면과다, 무기력 및 무관심과 같은 비특이적 증상과 정서변화, 정서불안정, 강박성 웃음 및 환각과 같은 증상이 주를 이루어 망간정신병(manganese psychosis)이라 불리우며, 노출이 지속되면 진전, 구음장애, 보행장애, 행동이 느려지는 증상, 소자증 및 자세이상 등 특발성 파킨슨병에서 나타나는 추체외로계 이상소견과 유사한 운동장애가 나타나는 것이 특징이다(Calne et al., 1994; Huang et al., 1998). 최근, 망간중독과 파킨슨병의 임상 양상의 유사성으로 인해 일부 신경변성질환의 발병에 망간과 같은 전이금속이 관련된다는 환경성 원인설에 대한 관심이 증대되고 있다(Feldman, 1992).

망간에 의한 신경독성의 병리기전에 대해 현재까지 명확하게 밝혀져 있지 않지만, 망간중독 후 경과시기에 따라 생체에서 관찰되는 생화학적 변화에 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 초기에는 도파민 생성에 관여하는 tyrosine hydroxylase의 활성도 증가(Bonilla, 1980), 선조체의 도파민 교체율(turnover rate)의 증가(Barbeau, 1984), N-methyl-D-aspartate (NMDA) 의존성 글루탐산염(glutamate) 수용체에 의해 매개되는 시납스전 도파민 자가수용체의 손실(Cuesta de Di Zio et al., 1995) 등이 관찰되는데, 이 결과들은 뇌조직의 도파민 농도나 활동성 증가가 중독 초기에 보이는 정신분열증과 유사한 임상증상의 발현과 관련됨을 시사한다. 반면 추체외로계 관련 증상은 도파민을 비롯한 카테콜아민의 자가산화반응의 증가와 그 대사산물인 cyclized ortho-quinone 및 부수적으로 생성된 산소유리기가 세포독성에 기여하여 이로 인한 뇌조직내 도파민 농도의 일시적인 감소와 관련되며, 만성 망간중독증은 산소유리기(oxygen free radical)와 apoptosis에 의한 세포사(cell death)가 기여하는 것으로 알려져 있다(Archibald & Tyree, 1987; Segura-Aguilar & Lind, 1989).

한편, 뇌조직은 산소유리기의 민감한 표적물인 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acids), 특히 다수의 이중결합 구조를 지닌 eicosapentanoic acid와 docosahexanoic acid가 타 조직에 비해 풍부하게 존재하고(Esterbauer et al., 1991), 뇌세포의 O_2 소모량이 많은 점, Fe^{2+}의 풍부함 및 catalase 같은 항산화 효소의 부족(Halliwell, 1992) 등의 이유로 인해 산화적 스트레스에 의해 쉽게 지질과산화반응이 일어나는 것으로 알려져 있으며 최근에는 파킨슨병, 알쯔하이머병, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis)과 같은 신경변성질환의 병인으로 산소유리기와 지질과산화반응이 지목되고 있다(Halliwell & Gutteridge, 1998).

이 연구는 망간에 의한 신경독성이 산소유리기에 의해 매개된 과다한 지질과산화반응에 기인한다는 가설 하에 망간을 투여한 흰쥐 뇌의 선조체에서 superoxide dismutase (SOD) 활성도, malondialdehyde (MDA) 농도 및 지방산 조성 변화를 비교·분석함으로써 망간중독증의 병리기전에서 산화적 스트레스의 역할을 구명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 240±10 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐였으며, 실험 3일 전부터 상업용 배합사료로 약 18℃가 유지되는 동물실에서 사육하였다. 실험기간 동안 사료와 물은 제한 없이 공급하였으며, 조도는 한쪽 벽면에 위치한 창을 통한 자연광과 낮 시간(09-18시)의 인공조명으로 조절하였다.

2. 실험방법

1) 동물처리 및 시료채취

망간 주사군은 0.15 M 생리식염수로 7.2 ㎎/㎖ 농도로 녹인 $MnCl_2$를 4 ㎎/kg(0.5 cc/250 g)용량으로 1일 1회, 주 5일, 연속 4주 동안 복강으로 주사하였다. 대조군에게는 생리식염수만을 주사하였고 각 군당 배정한 동물 수는 5마리였다. 마지막 주사 후 24시간 경과하여 동물들을 단두도살한 후, 얼음 위 슬라이드 글라스 상에서 뇌를 분리하고, 이 중 선조체(corpus striatum)를 떼어 phosphate buffered saline 용액과 섞은 뒤 균질화하였다. 시료 중 일부는 망간 측정에 사용하였고, 나머지는 초음파 처리한 후, 4 ℃, 20,000 G에서 30분간 원심분리한 상층액을 취하여 지방산, SOD 활성도 및 MDA 측정에 사용하였다.

2) 선조체의 망간 및 총 단백질 농도 측정

조직시료 0.1 ㎖와 매질개선제(0.5 % Triton X-100, 1.25 % $(NH_4)2HPO_4$ 0.9 ㎖를 섞은 다음, 이 중 10 ㎕를 비불꽃 원자흡수분광광도계(PE 3300, Perkin Elmer, Norwalk, CT, U.S.A.)에 주입하여 망간농도를 분석하였다. 또한, 조직의 망간농도, SOD 활성도 및 MDA 농도를 보정하기 위하여 뇌조직의 단백질 농도를 구하였는데 bovine serum albumin을 표준으로 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다.

3) 선조체의 SOD 활성도 측정

SOD 활성도는 Sun 등(1988)의 방법으로 정량하였다. Xanthine oxidase (1 kU/g) 20 ㎕를 1 mM sodium salicylate가 함유된 2.3 M $(NH4)_2SO_4$ 5 ㎖에 희석하여 최종농도가 167 mU/ℓ가 되도록 하였다. SOD 측정시약은 0.3 mM xanthine 용액 40 ㎖, 0.6 mM EDTA 용액 20 ㎖, 150 μM nitro-blue tetrazolium 용액 20 ㎖, 400 mM Na_2CO_3 용액 12 ㎖, 1 g/ℓ bovine serum albumin 용액 6 ㎖를 섞어 제조하였다. 먼저, 2.45 ㎖의 SOD 측정시약과 검체 또는 SOD 표준용액 0.5 ㎖를 섞은 후, xanthine oxidase 용액을 검체간 30초의 간격을 두고 50 ㎕씩 분주한 다음 20분간 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 0.8 mM $CuCl_2$ 용액을 1 ㎖씩 분주한 후 시료를 534 nm의 파장에서 분광광도계(DU-65, Beckman, Fullerton, CA, U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다.

4) 선조체의 MDA 농도 측정

MDA 농도는 thiobarbituric acid (TBA)와의 반응을 이용하여 Shah 등(1983)의 방법으로 정량하였다. 원심분리된 상층액 0.5 ㎖를 취한 후 17.5 % trichloroacetic acid (TCA) 0.5 ㎖와 0.6 % TBA (pH 2.0) 0.5 ㎖를 첨가 후 15분간 끓인 후, 실온에서 10분간 식힌 뒤 70 % TCA 0.5 ㎖를 첨가하고 20분간 얼음 욕조에 방치하였다. 2,500 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 534 nm 파장에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 표준시료는 malondialdehyde bis(diethyl acetal) 24 ㎕를 0.01 M 염산 10 ㎖에 섞어 6시간 동안 실온에 방치하여 얻었다.

5) 선조체의 지방산 조성 측정

조직시료 2 ㎖와 hexane : isopropyl alcohol (3 : 2 v/v) 1 ㎖를 섞은 다음, 7,500 G에서 10분간 원심분리한 후, 상부 지방층 300 ㎕를 취한 다음 methanol : hexane (4 : 1 v/v) 2 ㎖를 첨가하였다. 천천히 200 ㎕의 acetyl chloride를 가하고, 100℃에서 1시간 동안 가열하여 메틸화하였다. 상온에서 냉각한 다음 n-hexane 1 ㎖와 6 % potassium carbonate 5 ㎖를 첨가하고 1,000 G에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액 3 ㎕를 취하여 가스크로마토그라피(HP 6890, Hewlette Packard, Wilmington, DE, U.S.A.)에 주입하였다. 표준액은 myristic acid, docosahexanoic acid, linoleic acid, palmitoleic acid, stearic acid, palmitic acid, eicosapentanoic acid, arachidonic acid, linolenic acid, oleic acid 및 arachidic acid의 혼합액으로 각각의 농도는 10 ㎎/㎖이었다.

3. 통계분석

각 군별 측정항목들에 대해 Wilcoxon rank sum test로 대조군과 망간 주사군들간의 유의성을 검정하였다. 모든 통계분석은 SPSS (ver 10.0) 프로그램을 사용하였으며, 검정에 대한 유의수준은 0.05로

설정하였다.

결 과

망간농도는 대조군과 망간주사군에서 각각, 3.26 ± 0.15 μg/g protein 및 4.52 ± 0.08 μg/g protein 로서 망간주사군이 대조군에 비해 139 %($p<0.01$)로 통계적으로 유의하게 증가하였고 (Fig. 1), SOD 활성도는 각각, 0.41±0.01 unit/mg protein 및 0.33±0.01 unit/mg protein로서 대조군에 비해 81 %($p<0.01$, Fig. 1)로 유의하게 감소하였다. MDA 농도는 대조군과 망간주사군에서 각각, 13.24±0.91 ng/g protein 및 18.32±1.14 ng/g protein로서 망간주사군이 대조군에 비해 138 %($p<0.01$로 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

지방산 조성 결과를 보면, 포화지방산(saturated fatty acids, 이하 SFAs)인 myristic acid, palmitic acid, stearic acid 및 arachidic acid와 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acids, 이하 MUFAs)인 palmitoleic acid 및 oleic acid는 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Fig. 2).

n-6계 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, 이하 PUFAs)의 경우, linoleic acid는 유의한 차이가 없었으나, arachidonic acid는 대조군과 망간주사군에서 각각, 2.95 % (13.55±3.47 mg/g protein) 및 10.08 % (51.10±13.03 mg/g protein)로서 총 지방산 중 차지하는 분율이 대조군에 비해 341 %($p<0.01$)로 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

n-3계 PUFAs의 경우, linolenic acid는 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, eicosapentanoic acid는 대조군과 망간주사군에서 각각, 5.06 % (23.70±1.19 mg/g protein) 및 3.63 % (17.92±2.33 mg/g protein)로서 총 지방산 중 차지하는 분율이 대조군에 비해 72 %($p<0.05$), docosahexanoic acid는 각각, 7.11 % (33.39±1.75 mg/g protein) 및 4.76 % (23.29±3.07

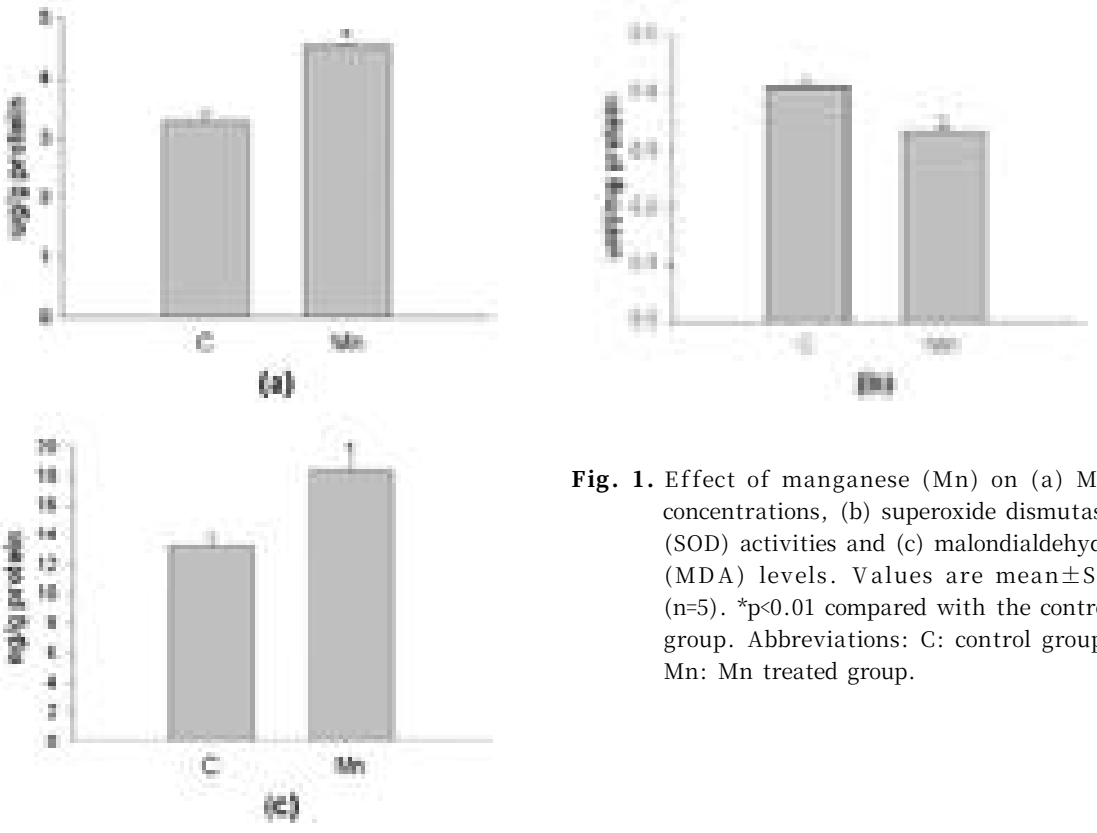

Fig. 1. Effect of manganese (Mn) on (a) Mn concentrations, (b) superoxide dismutase (SOD) activities and (c) malondialdehyde (MDA) levels. Values are mean±SE (n=5). *$p<0.01$ compared with the control group. Abbreviations: C: control group; Mn: Mn treated group.

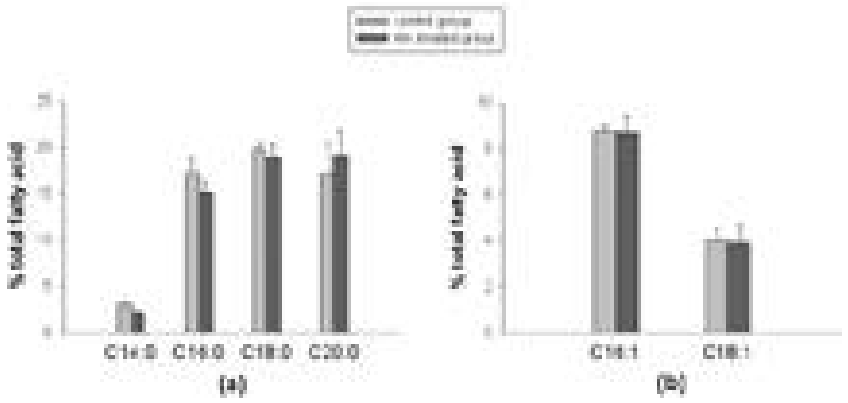

Fig. 2. Compositional changes of (a) saturated fatty acids and (b) monounsaturated fatty acids. Values are mean±SE (n=5). Abbreviations: C14:0: myristic acid; C16:0: palmitic acid; C18:0: stearic acid; C20:0: arachidic acid; C16:1: palmitoleic acid; C18:1: oleic acid.

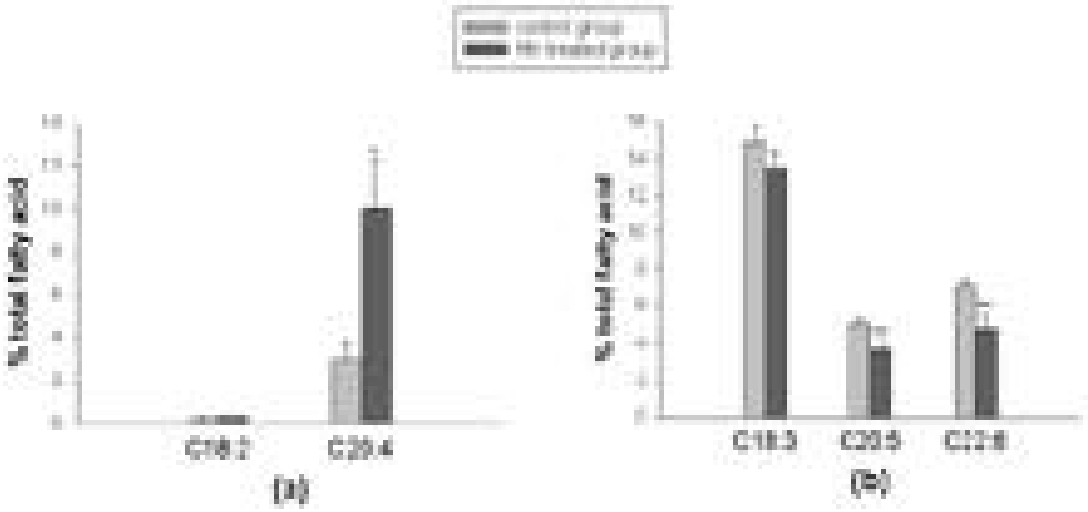

Fig. 3. Compositional changes of (a) n-6 polyunsaturated fatty acids and (b) n-3 polyunsaturated fatty acids. Values are mean±SE (n=5). *p<0.01, **p<0.05 compared with the control. Abbreviations: C18:2: linoleic acid; C20:4: arachidonic acid; Cl8:3: linolenic acid; C20:5: eicosapentanoic acid (EPA); C22:6: docosahexanoic acid (DHA)

㎎/g protein)로서 총 지방산 중 차지하는 분율이 대조군에 비해 67 %(p<0.05)로 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

지방산의 포화도에 따른 비교에서, 총 SFAs, 총 MUFAs 및 PUFAs는 실험군과 대조군 간에 유의한 차이가 없었고(Fig. 4), 총 SFAs에 대한 총 MUFAs 및 총 PUFAs의 비도 두 군간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

PUFAs를 n-6계와 n-3계로 구분한 비교에서, 총 n-6계는 대조군과 망간주사군에서 각각, 3.21 % (14.75 ± 3.30 ㎎/g protein) 및 10.42 % (52.78 ± 13.16 ㎎/g protein)로서 총 지방산 중 차지하는 분율이 대조군에 비해 325 %(p<0.01)로 통계적으로 유의하게 증가하였고, 총 n-3 계는 각

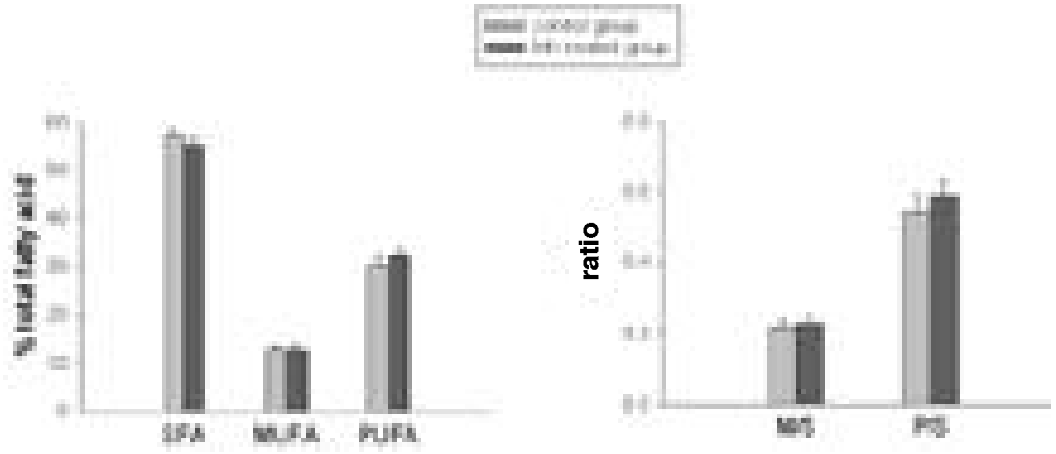

Fig. 4. Fatty acid composition by saturation degree. Values are mean±SE (n=5). Abbreviations: SFA: sum of saturated fatty acids; MUFA: sum of monounsaturated fatty acids; PUFA: sum of polyunsaturated fatty acids; M/S: sum of monounsaturated fatty acids/sum of saturated fatty acids; P/S: sum of polyunsaturated fatty acids/sum of saturated fatty acids.

각, 27.02 % (126.30 ± 1.41 ㎎/g protein) 및 21.86 % (107.37 ± 6.91 ㎎/g protein)로서 총 지방산 중 차지하는 분율이 대조군에 비해 81 %($p<0.05$)로 유의하게 감소하였다(Fig. 5). n-3계에 대한 n-6계의 비는 대조군과 망간주사군에서 각각, 0.12 ± 0.03 및 0.50 ± 0.12로서 대조군에 비해 427 %($p<0.01$)로 유의하게 증가하였다(Fig. 5).

고 찰

설치류에서 superoxide dismutase (SOD)는 세포질 내에 존재하는 Cu-Zn SOD와 미토콘드리아 내에 존재하는 Mn SOD의 2가지 종류가 존재하며, 이 연구에서의 SOD 활성도는 이들 아종을 구분하지 않은 총 활성도이다. SOD는 세포독성이 있는 내인성 superoxide radical (O_2^-)이 H_2O_2로 대사되는 과정을 촉매함으로써 생체 방어기전에 중요한 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다. 생체내에서 산소유리기는 반응성이 높고, 매우 불안정한 상태이므로 이들을 직접적으로 정량분석 하기는 쉽지 않다. 따라서 생체 대사과정에서 산소유리기의 개입여부에 대한 표지자로서 특정 산소유리기에 특이적인 항산화효소(O_2^-의 경우, SOD)의 활성도 측정과 같은 간접적인 접근방법이 널리 사용되고 있다(Halliwell & Gutterige 1998).

이 연구에서 SOD 활성도는 망간주사 후, 유의하게 감소하였는데, 이와 관련된 타 연구가 없어 직접적인 비교가 불가능하였다. 다만, SOD 활성도와 관련된 타 중금속의 영향을 살펴보면, 카드뮴이 직접 Cu-Zn SOD 효소에 작용하여 효소의 활성도를 상실시킬 수 있는 것으로 알려져 있어(Koford et al., 1991), 망간에서도 위와 같은 기전이 작용할 가능성도 있을 것으로 사료된다.

산소유리기에 의한 세포손상에서 지질과산화반응은 중요한 손상기전이다. 산소유리기는 세포와 세포내 소기관의 원형질막에 존재하는 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, 이하 PUFAs)을 산화시켜 세포손상 과정에 참여하며, 산화에 의한 세포손상을 평가하기 위해 가장 널리 사용되는 방법의 하나는 지질과산화반응의 최종산물인 malondialdehyde (MDA)를 정량하는 것이다. MDA는 지질과산화반응산물의 분해를 통하여 형성되는 저분자량의 알데히드로서 thiobarbituric acid (TBA)와 특이적으로 반응하여 발색단을 형성하는 특성이 있으며(Jiankang et al., 1997), 이 실험에서도 이 원리를 이용하여 MDA-TBA 반응산물을 정량함으

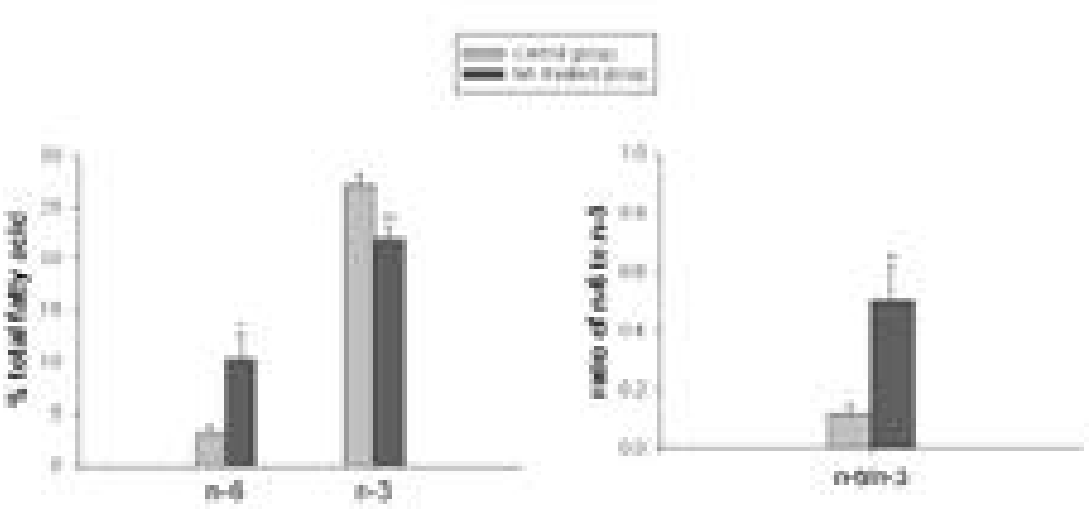

Fig. 5. Composition of unsaturated fatty acids by n-series. Values are mean±SE (n=5). *$p<0.01$, **$p<0.05$ compared with control group. Abbreviations: n-6: sum of n-6 polyunsaturated fatty acids; n-3: sum of n-3 polyunsaturated fatty acids.

로써 지질과산화반응의 정도를 평가하였다.

이염화니켈(Sunderman et al., 1989), 연(Yiin & Lin, 1994) 및 카드뮴(Sarkar et al., 1995) 등 다수 중금속이 지질과산화반응을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 이 연구에서도 통계적으로 유의한 MDA의 증가를 보여 망간이 지질과산화반응을 증가시킨다는 결과를 얻었다. 지질과산화반응에 대한 망간의 효과에 대해 아직 이견이 많은데, Knight와 Voorhees (1990)는 ***in vitro***에서 이염화망간이 PUFAs의 일종인 linolenic acid를 산화시켜 지질과산화물이 증가됨을 관찰하였고, Misiewicz 등(1999)은 합금공정에서 망간에 노출된 근로자의 적혈구에서 MDA가 증가된다고 보고하였다. 또한, Yiin 등(1996)은 망간 노출 근로자의 혈장에서 MDA의 증가와 동시에 SOD, glutathione peroxidase, catalase와 같은 항산화효소 활성도가 증가된다고 보고하였으며, Sloot 등(1996)은 흰쥐 뇌의 선조체에서 이염화망간이 산소유리기의 일종인 hydroxyl radical($OH^{\cdot}$)의 생성을 촉진시키는 결과를 관찰함으로써 망간독성이 산소유리기가 매개된 과다한 지질과산화반응에 기인한다는 가설을 뒷받침하고 있다.

그러나, 일부 in vitro 실험에서는 망간이 MDA를 감소시키거나(Mariagrazia et al., 1992), $O_2^{\cdot-}$ 또는 $OH^{\cdot}$와 같은 산소유리기를 제거하는 결과를 보여(Cheton & Archibald, 1988; Hussain & Ali, 1999), 망간이 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 항산화제로 작용한다는 보고도 있다.

한편, Archibald와 Tyree(1987)의 연구에 의하면, Mn^{2+}은 $O_2^{\cdot-}$을 제거함으로써 지질과산화반응을 억제할 수 있으며, 망간독성은 주로 Mn^{3+}에 의해 유발된다고 하였다. 실제로 중성 또는 알카리성 유산소 수용액에서 충분한 Mn^{2+}이 축적되면 다음의 반응에 의해 쉽게 Mn^{3+}로 전환될 수 있는 것으로 알려져 있다(Green & Hill, 1984).

$$Mn^{2+} + 2OH^- \rightarrow Mn(OH)_2$$

$$2Mn(OH)_2 + \tfrac{1}{2}O_2 + H_2O \rightarrow 2Mn(OH)_3$$

또한, Hussain과 Ali(1999)는 ***in vitro*** 실험을 통해 망간이 저농도에서는 항산화제로 작용하는 결과를 얻었지만, 고농도에서는 산소유리기를 생성함으로써 신경독성을 유발할 수 있을 것으로 추측하는 등 망간의 산화능력이나 지질과산화 유발능력에 대해서는 연구자간 주장이 엇갈리고 있어 추후 보다 많은 연구가 필요한 실정이다.

PUFAs는 대부분이 linoleic acid와 linolenic acid로부터 합성되는데, 이들은 인체내에서 합성되지 않는 필수지방산으로 음식물을 통해 흡수된다. 첫번째 이중결합의 위치에 따라 n-3계와 n-6계로

분류되며, n-3계에는 linolenic acid와 이로부터 합성된 eicosapentanoic acid (EPA) 및 docosahexanoic acid (DHA) 등이 포함되고, n-6계에는 linoleic acid와 이로부터 합성된 arachidonic acid가 포함된다(Youdim et al., 2000). 생체세포에서 지방산은 세포막의 구조적인 통합성과 막유동성(Stillwell et al., 1993), 효소의 활성도(Slater et al., 1996), 지질과 단백질간의 상호작용(Salem & Niebylski, 1995) 및 prostaglandin, leukotriene 및 thromboxane 같은 eicosanoid 합성을 위한 전구체로서의 역할 등 다양한 생물학적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편, PUFAs는 동맥경화, 관상동맥질환, 급성 심장사(Albert et al., 1998; Leaf et al., 1999)를 비롯하여, 간질성 경련(Voskuyl et al., 1998; Leaf et al., 1999), 우울증(Hibbeln, 1998) 및 양극성 행동질환(Stoll et al., 1999) 같은 중추신경계 질환의 위험도를 감소시키거나 예방하는 효과를 보이며, 이는 주로 n-3계 PUFAs 특히, DHA와 EPA가 관여하여 나타난 결과로 알려져 있다.

일부 연구들은 n-3계 PUFAs와 관련된 유익한 생물학적 효과에 산소유리기가 관련되어 있음을 보여주고 있다. 즉, Benito 등(1997)은 섬유모세포 배양액에 첨가된 5.6 %의 EPA에 의해 SOD, glutathione peroxidase 등 항산화효소의 활성도가 증가된다고 하였으며, Relton 등(1993)과 Glozman 등(1998)은 동물실험을 통해 이미 산소유리기가 병인으로 알려져 있는 뇌조직의 허혈성 손상이 DHA 공급에 의해 억제된다고 하였으며, Billman 등(1994)은 심근허혈 손상에서도 동일 효과가 있음을 보고하였다.

이 연구에서 망간주사 후 관찰된 지방산 조성 변화의 특징 중 하나는 DHA와 EPA 같은 n-3계 PUFAs의 감소였다. 이것은 상기 연구들에 비추어 볼 때, 산소유리기로 매개된 지질과산화반응이 주로 n-3계 PUFAs에서 발생한 결과로 추측할 수 있으며, 이 연구에서 관찰된 SOD활성도의 감소와 MDA 농도의 증가도 이를 뒷받침하고 있다. 한편, 이 연구에서 SFAs와 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acids, 이하 MUFAs)은 망간주사군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 이것은 SFAs와 MUFAs가 산소유리기에 의한 지질과산화에 의한 손상에 민감하지 않음을 시사하며, 이는 산소유리기가 C=C 이중결합 위치를 공격하고 다수의 이중결합 구조를 지닌 PUFAs가 지질과산화반응에 취약하다는 사실(Esterbauer et al., 1991)과도 일치된다.

이 연구에서 관찰된 지방산 조성의 또 다른 특징적 변화는 n-3계 PUFAs의 감소와 동반된 n-6계 PUFAs인 arachidonic acid의 증가였다. 이러한 특징은 n-3계에 대한 n-6계 비값의 비교에서 더욱 현저하게 나타났다. 이와 같은 지방산 조성의 불균형은 노화, 스트레스, 질병 등의 다양한 조건에서도 관찰된다(Fletcher, 1993; Simopoulos, 1991). 또한, Donaldson과 Knowles(1993)는 연중독에서 보이는 생물학적 변화가 지질과산화반응의 증가에 기인되고, 조직에서는 arachidonic acid가 증가되는 특징을 보인다고 하였으며, Osterode와 Ulberth(2000)도 연에 노출된 근로자의 적혈구막에서 arachidonic acid 농도가 연농도에 비례하여 증가된다고 보고하는 등 지방산 조성의 불균형 - n-3계 PUFAs의 감소와 n-6계의 증가 - 과 질병발생과의 연관성에 관한 관심이 증대되고 있다.

Arachidonic acid의 합성은 dihomo-gamma linolenic acid로부터 합성되며, phospholipase A_2 (PLA_2)가 속도조절효소로 작용된다. 따라서 망간이 PLA_2의 합성 또는 활성도를 증가시키는 작용을 한다면 결국, 망간은 세포 또는 조직에서 arachidonic acid를 증가시킬 것으로 예측되지만, 본 연구에서는 이 주제를 다루지 못하였다. 한편, Martin(1998)은 DHA가 PLA_2의 활성도를 저하시키는 작용이 있음을 보고하였는데, 이는 역으로 DHA의 감소가 PLA_2의 활성도의 증가를 유발하고, 결과적으로 arachidonic acid가 증가할 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 차후 연구에서 망간의 PLA_2에 대한 작용과 n-3계 PUFAs 특히, DHA와 EPA 투여가 망간독성에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 요약하면 망간이 대뇌의 선조체에서 지방산의 조성변화를 초래한 것으로 사료되며, 망간에 의한 지방산 조성변화의 특징은 n-3계 PUFAs인 EPA, DHA의 감소와 n-6계 PUFAs인 AA의 증가였다. 지방산 조성변화와 동반된 SOD 활성도의 감소 및 MDA가 증가된 결과는 망간성 신

경독성기전이 산소유리기 특히 O_2^-가 관여하는 지질과산화반응에 의한 것임을 시사하는 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : 이 연구는 망간을 투여한 실험동물의 뇌조직에서 망간 농도, superoxide dismutase (SOD) 활성도, malondialdehyde (MDA) 농도 및 지방산의 조성 변화를 관찰함으로써 망간중독증의 병리적 기전에 산화적 스트레스의 역할을 밝히고자 하였다.

방 법 : Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였으며, 실험군에게는 이염화망간(manganeses dichloride, $MnCl_2$)을 4 ㎎/㎏ 용량으로 1일 1회, 주 5일, 연속 4주 동안 복강으로 주사하였고, 동기간 중 대조군에게는 생리식염수만을 주사하였다. 마지막 주사 후 24시간이 경과한 후 적출한 대뇌로부터 선조체(corpus striatum)를 분리하여 시료로 삼았다.

결 과 : 선조체에서 망간농도는 실험군에서 대조군에 비해 139 %로 통계적으로 유의하게 증가하였고 ($p<0.01$), SOD 활성도는 대조군의 81 %($p<0.01$)로 유의하게 감소하였다. MDA 농도는 대조군과 비교하여 138 %($p<0.01$)로 높았으며, 지방산 중, 총 n-6계 polyunsaturated fatty acids (PUFAs)는 325 %($p<0.01$)로 현저하게 증가하였고, 특히 arachidonic acid (AA)의 경우 341 %($p<0.01$)로 그 차가 현저하였다. 한편 지방산 중 linolenic acid를 제외한 n-3계 PUFAs 중 eicosapentanoic acid (EPA)는 대조군에 비해 72 %($p<0.05$)로 낮은 농도였으며, docosahexanoic acid (DHA)도 67 %($p<0.05$로 실험군에서 현저하게 낮은 값이었다.

결 론 : 이상의 결과는 망간에 의해 생성된 산소유리기가 대뇌의 선조체에서 지방산의 조성변화를 초래한 것으로 사료된다. 망간에 의한 지방산 조성변화의 특징은 n-3계 PUFAs인 EPA, DHA의 감소와 n-6계 PUFAs인 AA의 증가였는데, SOD 감소 및 MDA의 증가와 동반된 이러한 변화가 망간성 신경독성기전은 산소유리기 특히 O_2^-가 관여하는 지질과산화반응에 의한 것임을 시사한다.

참고문헌

Albert CM, Hennekens CH, O Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN, Manson JE. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. J Am Med Assoc 1998;279:23-28.

Archibald FS, Tyree C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. Arch Biochem Biophys 1987;256:638-650.

Barbeau A. Manganese and extrapyramidal disorders. Neurotoxicology 1984;5:13-36.

Benito S, Fernadez Y, Mitjavila S, Moussa M, Anglade F, Periquet A. Phospholipid fatty acid composition affects enzymatic antioxidant defences in cultured Swiss 3T3 fibroblasts. Redox Rep 1997;3:281-286.

Billman GE, Hallaq H, Leaf A. Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by ω3 fatty acids. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:4427-4430.

Bonilla E. L-tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. Neurobehav Toxicol 1980;2:37-41.

Calne DB, Chu NS, Huang CC, Lu CS, Olanow W. Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. Neorology 1994;44:1583-1586.

Cheton PL, Archibald FS. Manganese complex and the generation and scavenging of hydroxyl radicals. Free Radic Biol Med 1988;5(5-6):325-333.

Cuesta de Di Zio MC, Gomez G, Bonilla E. Suarez-Roca H. Autoreceptor presynaptic control of dopamine release from striatum is lost at early stages of manganese poisoning. Life Sci 1995;56:1857-1864.

Donaldson WE, Knowles SO. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? Comp Biochem Physio 1993;104C:377-379.

Esterbauer H, Shauer RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonal, malondialdehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 1991;11:91-128.

Feldman RG. Manganese as possible ecoetiologic factor in Parkinson's disease. Ann NY Acad Sci 1992;648:266-267.

Fletcher JR. Eicosanoids, critical agents in the physiological process and cellular injury. Arch

Surg 1993 Nov;128(11):1192-1196.
Glozman S, Green P, Yavin E. Intraaminiotic ethyl docosahexanoate administration protects fetal rat brain from ischemic stress. J Neurochem 1998;70:2484-2491.
Green MJ, Hill HAO. In Methods in enzymology, Packer L., ed. Academic press, New York, Vol. 105, pp. 3-22, 1984.
Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 1992;59:1609-1623.
Halliwell B, Gutterige JMC. Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1998.
Hibbeln JR. Fish consumption and major depression. Lancet 1998;351:1210-1213.
Huang CC, Chu NS, Lu CS, Chen RS, Calne DB. Long-term progression in chronic manganism: ten years of follow-up. Nuerology 1998;50:698-700.
Hurley LS. Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. Physiol Rev 1981;61:249-295.
Hussain A, Ali SF. Manganese scavenges superoxide and hydroxyl radicals: an in vitro study in rats. Neurosci Lett 1999;261(1-2):21-24.
Jiankang L, Helen CY, Stephanie JD, Bruce NA. Assay of aldehyde from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. Anal Biochem 1997;245:161-166.
Knight JA, Voorhees RP. Peroxidation of linolenic acid catalysis by transition metal ions. Anal Clin Lab Sci 1990;20:347-352.
Koford P, Bauer R, Danielsen E, Larsen E, Bjerrum ML. ^{113}Cd-NMR investigation of a cadmium-substituted copper, zinc-containing superoxide dismutase from yeast. Eur J Biochem 1991;198:607-611.
Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE, Voskuyl RA. The antiarrhythmic and anticonvulsant effects of dietary n-3 fatty acids. J Membr Biol 1999;172:1-11.
Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.
Mariagrazia C, Fulvio U, Alberto B. Antioxidant effect of manganese. Arch Biochem Biophys 1992;299(2):330-332.
Martin RE. Docosahexanoic acid decreases phospholipase A_2 activity in the neuritis/nerve growth cones of PC12 cells. J Neurosci Res 1998;15(54):805-13.
Misiewicz A, Radwan K, Misiewicz A, Dziewit T. Malonyl dialdehyde concentration in red blood cells of workers engaged in the production of iron-manganese alloys. Med Pr 1999;50(4):277-281.
Olanow CW, Good PF, Shinotoh H et al., Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. Neurology 1996;46:492-498.
Osterode W, Ulberth F. Increased concentration of arachidonic acid in erythrocyte membrains in chronically lead-exposed men. J Toxicol Environ Health, part A 2000;59:87-95.
Relton JK, Strijbos PJLM, Cooper AL, Rothwell NJ. Dietary n-3 fatty acids inhibit ischemic and excitotoxic brain damage in the rat. Brain Res Bull 1993;32:223-226.
Salem NJ, Niebylski CD. The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function. Mol Membr Biol 1995;12(1):131-134.
Sarkar S, Yadav P, Bansal AK, Bhatnager D. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissue. J Trace Elements Med Bio 1995;9:144-149.
Segura-Aguilar J, Lind C. On the mechanism of the $Mn^{3(+)}$-induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT diaphorase and superoxide dismutase. Chem Biol Interact 1989;72(3):309-324.
Shah SV, Cruz FC, Baricos WH. NADPH induced chemiluminescence and lipid peroxidation in kidney microsome. Kidney Int 1983;23:691-698.
Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am J Clin Nutr 1991;54(3):438-463.
Slater SJ, Kelly MB, Yeager MD, Larkin J, Ho C, Stubbs CD. Polyunsaturation in cell membrains and lipid bilayers and its effects on membrain properties. Lipids 1996;31:S189-S192.
Sloot WN, Korf J, Koster JF, De Wit LE, Gramsbergen JB. Manganese-induced hydroxyl radical formation in rat striatum is not attenuated by dopamine depletion or iron chelation in vivo. Exp Neurol 1996;138(2):236-45.
Stillwell W, Ehringer W, Jenski LJ. Docosahexanoic acid increases permiability of lipid vesicles and tumor cells. Lipids 1993;28(2):103-108.

Stoll AL, Severus E, Freeman MP, Rueter S, Zboyan HA, Diamond E, Gress KK, Marangell LB. Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. Arch Gen Psychiatry 1999;56: 413-416.

Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clinical Chemistry 1988;34:497-500.

Sunderman FW, Hopfer SM, Lin SM, Plowman MC, Stojanovic T, Wong SHY et al. Toxicity to alveolar macrophages in rats following parenteral injection of nickel chloride. Toxicol Appl Pharmacol 1989;100:107-118.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Health assessment document for manganese. Environmental Criteria and Assessment Office. Final Report, EPA 6008-83-013F. Washington: EPA, 1984.

Voskuyl RA, Vreugdenhil M, Kang JX, Leaf A. Anticonvulsant effect of polyunsaturated fatty acids in rats, using the cortical stimulation model. Eur J Pharmacol 1998;341:145-152.

Yiin SJ, Lin TH. Lipid peroxidation in workers exposed to lead. Arch Environ Health 1994;186:1-17.

Yiin SJ, Lin TH, Shin TS. Lipid peroxidation in workers exposed to manganese. Scand J Work Environ Health 1996;22:381-386.

Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. Int J Devel Neuroscience 2000;18:383-399.

Zayed J, Vyskocil A, Kennedy G. Environmental contamination and human exposure to manganese - contribution of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in unleaded gasoline. Int Arch Occup Environ Health 1999;72:7-13.