

임신 쥐의 철 과잉섭취가 조직의 산화적 스트레스에 미치는 영향

박 미 나 · 이 연 숙[§]

서울대학교 식품영양학과/생활과학연구소

Effects of Iron Overload during Pregnancy on Oxidative Stress in Maternal Rats

Park, Mi-Na · Lee, Yeon-Sook[§]

Department of Food and Nutrition & Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

Although iron is an essential mineral, excess iron intake during pregnancy may increase oxidative stress in tissues. This study was conducted to investigate the effects of iron overload during pregnancy on iron status and oxidative stress in maternal rats. Ten week-old female Sprague-Dawley rats were mated with male rats. Non-pregnant (control) and pregnant rats were fed diets containing normal Fe (35 mg/kg diet), high Fe (350 mg/kg diet), or excess Fe (1,050 mg/kg diet) during pregnancy. Rats were sacrificed on pregnancy day 19. No significant difference in weight gain, diet intake, or litter size was observed according to iron intake levels. Furthermore, serum iron, hemoglobin, and hematocrit were not different among the rats administered the three levels of Fe both in the control and pregnant groups. However, the iron levels were lower in pregnant rats than those in the control. The liver and spleen iron contents increased significantly in the excess Fe group. An increase in liver ferritin levels with increasing iron intake was observed. Protein carbonyl content, as a marker of oxidative stress, increased significantly in liver with increasing iron intake but not malondialdehyde. Glutathione peroxidase activity in the liver of pregnant rats fed excess iron decreased significantly. Bcl-2 protein expression in the liver declined remarkably with increasing maternal iron intake in pregnant rats. Taken together, iron overload during pregnancy had little effect on hematology. However, the deposits of iron in the liver and the decline in antioxidant enzyme activity implied increased oxidative stress in tissues of the excess Fe group. These results suggest that excess iron intake during pregnancy increases oxidative stress in maternal tissues and may also affect fetal tissues. (*Korean J Nutr* 2011; 44 (1): 5 ~ 15)

KEY WORDS: iron overload, pregnancy, oxidative stress, antioxidant enzyme.

서 론

철 (iron)은 체내에서 헤모글로빈과 미오글로빈의 구성성분으로서 각 조직세포로 산소를 운반하고, 미토콘드리아의 전자전달계에서 산화-환원 반응에 관여하는 시토크롬계 효소의 구성성분으로 ATP를 생성하는데 중요한 역할을 한다.¹⁾ 이와 같이 철은 체내 필수 미량무기질이지만, 세포내에서 과잉되면 자유기 (free radicals) 생성을 촉진시켜 지질과 산화 (lipid peroxidation), 단백질변성 (protein modification) 및 DNA 손상을 일으킬 수 있다.²⁾ 또한 체내 과잉 저장된 철과 당뇨병, 암, 심혈관질환 및 파킨슨 (Parkinson) 이나 알츠하이머 (Alzheimer) 질환과 같은 퇴행성신경질환

들과의 관련성이 높은 것으로 보고되었다.^{2,3)}

건강과 영양소의 역할에 대한 관심의 증가로 비타민, 무기질 보충제를 비롯한 건강기능식품의 섭취가 급격히 증가하여 비타민 및 무기질 보충제의 복용율이 평균 30~40%로 높은 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ 최근 조 등⁵⁾의 연구에 의하면 우리나라 임신여성의 하루 총 철 섭취량이 90.1 ± 44.8 mg으로 평균필요량 (Estimated Average Recommendation, EAR)의 487%로 조사되었다. 특히 임신, 수유기에는 지나친 영양부족에 대한 우려 때문에 여러 가지 보충제를 동시에 복용함으로써 과다 섭취의 우려가 있지만 대부분의 임신부가 섭취하는 철 보충제의 과잉 섭취에 대한 영향은 거의 보고된 바가 없다.

임신기에는 태아 및 태반의 성장, 산모의 혈액량의 증가로 인한 철의 요구도가 증가한다.⁶⁾ 그러나 임신시에 철의 흡수는 동물과 인간에서 모두 증가한다고 알려져 있다.^{7,8)} Southon 등⁷⁾에 의하면 비임신 쥐의 철 흡수율은 기간에 상관없이 거

접수일: 2010년 10월 25일 / 수정일: 2010년 12월 27일

채택일: 2011년 1월 11일

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: lysook@snu.ac.kr

의 일정하였으나, 임신 쥐의 경우는 임신 말기로 갈수록 유의적으로 증가하였다. 인간의 경우에도 임신 12주, 24주, 36주에 non-heme iron의 흡수율이 각각 7%, 36%, 66%로 증가하였다.⁸⁾ 임신 중기 이후에 빈혈 예방을 위해 시판되고 있는 철 보충제의 복용량은 하루 60~120 mg 정도인데, 이 양은 일상 식사 섭취량과 합해지면 하루 권장량 (임신전반기 20 mg, 후반기 24 mg)에 비해 5~10배 정도로 증가하게 된다. 임신동안 철 결핍이 조산율과 저체중아 출산율을 증가시키는 반면에, 상대적으로 지나치게 높은 헤모글로빈 농도, 헤마토크릿 (hematocrit) 및 페리틴 (ferritin) 함량도 미숙아 출산, 저체중아, 주산기 사망 (perinatal death) 등의 해로운 결과를 초래한다고 하였다.^{9,10)}

임신기는 미토콘드리아가 풍부한 태반 때문에 더욱 산화적 손상을 받기 쉽다.⁶⁾ 또한 산모로부터 태반을 통한 태아로의 철 축적도 임신 말기에 급격히 증가한다. 그리고 태반에서의 산화적 스트레스는 자간전증 (pre-eclampsia)의 병인으로 알려지고 있다. 임신기 동안의 산화적 스트레스가 증가하면 세포내 DNA 손상으로 인해 산화물인 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)가 증가하여 소변 내 농도가 상승하고 지질과산화물인 malondialdehyde (MDA)의 농도가 증가하며, 신생아의 출생체중이 감소하였다고 보고 된 바 있으며,¹¹⁾ 정상 임신부에 비해 자간전증 임신부에서는 혈청과 태반의 MDA가 유의적으로 높았고, 적혈구내 superoxide dismutase (SOD), 태반의 glutathione peroxidase (GPx)와 glutathione (GSH) 수준이 유의적으로 감소하였다고 보고 되었다.^{12,13)} 또한 과잉 섭취된 철은 Fenton reaction이나 Haber-Weiss reaction을 통해 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)를 다량으로 생성시킨다. 이렇게 생성된 ROS가 미토콘드리아 내막에 손상을 주게 되면 미토콘드리아에서 사이토크롬 c (cytochrome c)나 세포사멸유도인자 (apoptosis inducing factor, AIF)가 방출되고, 연이어 caspase 효소들이 차례로 활성화되면서 세포의 사멸과정 (apoptosis)이 진행된다.¹⁴⁾ 이러한 산화적 스트레스로 인한 세포사멸과정에서 미토콘드리아 막에 존재하는 Bcl-2를 비롯한 여러 단백질들 (Bcl-2 family proteins)이 세포사멸과정을 촉진시키거나 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. 특히, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 단백질 발현이 세포사멸을 촉진하는 Bax단백질의 발현에 비해 상대적으로 낮은 경우 세포사멸이 촉진된다.¹⁵⁾

따라서 임신기 동안의 철의 과잉 섭취는 산화적 스트레스를 증가시키고, 항산화 효소의 변화를 일으켜서 산모 뿐만 아니라 태아 조직에도 산화적 손상을 일으킬 가능성을 내포하고 있다. 그러나, 지금까지의 임신기 철 영양상태에 관한 연

구들은 주로 철 결핍에 의한 빈혈에 초점을 두어왔고 철 과잉 섭취의 영향에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로, 본 연구에서는 임신기 동안의 철 과잉 섭취가 어미쥐의 철 대사 지표와 임신의 결과 및 조직의 산화적 스트레스에 미치는 영향을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육

서울대학교 실험동물 자원관리원으로부터 4주령된 암컷과 수컷 Sprague-Dawley (SD) rats을 분양받아 일반 고형식으로 성장시킨 후, 10주령 200 g 이상이 되었을 때, 암컷과 수컷흰쥐를 1 : 1로 교배시켜 다음날 아침 암컷의 vaginal plug의 관찰로 임신을 확인하였다. 임신이 확인된 임신쥐 (실험군)와 비임신쥐 (대조군)에게 식이 중 철 수준이 정상수준 (35 mg Fe/kg diet), 고수준 (정상의 10배; 350 mg Fe/kg diet) 및 과잉수준 (정상의 30배; 1050 mg Fe/kg diet)의 3가지 실험식을 급여하였다. 실험동물들은 사육 케이지에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실 환경은 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $65 \pm 5\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 주기 (7 : 00 a.m.~7 : 00 p.m.)로 조절하였다. 실험동물의 구입과 사육의 모든 과정은 서울대학교 실험동물자원관리원의 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 승인을 받고 그 규정에 따라 실행하였다.

실험식이

실험식에서 철의 양은 AIN-93G purified diet¹⁶⁾의 수준을 정상수준 (NFe; 35 mg Fe/kg diet)으로 하였고, 고수준 (HFe; 350 mg Fe/kg diet)은 정상수준의 10배로, 과잉수준 (EFe; 1,050 mg Fe/kg diet)은 정상수준의 30배로 첨가하여 임신쥐와 비임신쥐에게 각각 자유급식 방법 (ad libitum)으로 급여하였다 (Table 1).

실험식의 원료로는 정제된 카제인 (sodium caseinate, 매일유업(주)과 옥수수 전분 (corn starch, 대상(주), 서울), 식이섬유소 (α -cellulose, Sigma, USA), 대두유 (CJ, 서울), 비타민 혼합물 (AIN-93 vitamin mixture, ICN Biomedicals, Inc., USA), 무기질 혼합물 (AIN-93G mineral mixture, ICN Biomedicals, Inc., USA)을 사용하였다. 철의 급원으로는 ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Samchun pure chemical Co., LTD, Korea)를 사용하였으며, 고수준과 과잉수준 군에서는 철 보충으로 인한 다른 식이성분의 변화를 최소화하면서 소량의 ferrous sulfate가 식이 전체에 골고루 잘 섞이게 하기 위하여 ferrous sulfate 내의 철 함량 (20%)

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

Diet ingredients ¹⁾	NFe	HFe	EFe
Cornstarch	529.486	529.486	529.486
Casein	200	200	200
Sucrose	100	96.9	90
Soybean oil	70	70	70
Fiber (α -cellulose)	50	50	50
Min.mixture ³⁾	35	35	35
Vit.mixture ⁴⁾	10	10	10
Methionine	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014
FeSO ₄ · 7H ₂ O (pre-mix ⁵⁾ with sucrose)	0	3.1	10
Total	1,000	1,000	1,000

1) AIN-93G purified diet 2) NFe: normal iron (35 mg/kg diet), HFe: high iron (350 mg/kg diet), EFe: excess iron (1,050 mg/kg diet) 3) AIN-93G mineral mixture 4) AIN-93 vitamin mixture 5) Fe pre-mixture: 101,500 mg Fe/kg

을 고려하여 설탕과 미리 혼합한 고농도 pre-mixture (101,500 mg Fe/kg mixture)를 만든 후, 다른 식이성분과 배합하였다. 실험기간 동안 일정한 시간에 체중과 식이 섭취량을 측정하였다.

시료수집

교배 (mating)시킨 날을 임신 0일로 정하고 임신 19일째 되는 날 임신 쥐와 비임신 쥐를 12시간 절식시킨 후, 염산케타민 (케타라, 유한양행(주), 서울)으로 복강내 마취 (투여농도: 80 mg/kg BW)에 의해 희생시켰다. 혈액은 경동맥에서 채취하였으며, 헤모글로빈과 헤마토크릿 측정을 위해서는 일부 혈액을 헤파린 처리된 튜브에 수집하고, 나머지 혈액은 혈청분리를 위해서 4℃에서 2~3시간 방치한 후, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 혈청을 분석 전까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 간, 뇌 및 지라 조직은 냉장 생리식염수 (0.9% NaCl용액)로 세척하여 장기에 부착된 지방이나 근육 및 혈액을 제거한 다음 무게를 재고, 태생 쥐와 태반 또한 적출하여 무게를 재고 분석 때까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다.

시료분석

혈청 철 (serum iron)의 농도는 혈청 중 transferrin과 결합된 Fe³⁺을 산성에서 유리시키고 환원제인 ascorbic acid를 이용하여 Fe²⁺로 환원시키면, 환원된 Fe²⁺이 2-(5-Nitro-2-Pyridylazo)-5-(N-Propyl-N-Sulfopropylamino)-Phenol과 결합하여 갈색의 킬레이트 화합물을 형성하는 방법 (NPS법)으로 590 nm에서 흡광도를 측정하는 Fe Kit (아산제약(주),

서울)을 사용하였다. 헤모글로빈 (hemoglobin) 농도는 전혈을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하는 Hemo-s Reagent (영동제약(주), 서울)을 사용하였다. 헤마토크릿 (hematocrit)은 미세소관 (micro-capillary tube)에 전혈을 채취하여, 원심분리한 후 전혈 중 혈구가 차지하는 비율로 측정하였다.

조직의 철 함량 분석을 위해서는 간, 뇌, 지라 조직을 각각 0.5~1 g 정도로 무게를 측정하여 각 용기에 넣고, 7 mL 65% HNO₃와 1 mL 30% H₂O₂를 첨가하여 극초단파분해 (microwave digestion, ETHOS PLUS, MILESTONS, USA)를 시켰다. 그 후에, 1% HNO₃ 용액으로 희석한 시료를 원자흡광분광계 (Atomic Absorption Spectrophotometry, GBC904AA, Australia)를 이용하여 철 농도를 248.3 nm에서 측정하였다. 분석에 사용한 모든 초차기구는 10% HCl 용액에 12시간 이상 담구었다가 3차 증류수로 행구어 건조시킨 후 사용하였다.

산화적 스트레스의 측정은 균질완충용액 (homogenizing buffer; 154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)을 이용하여 10% 간 균질액 (homogenates)을 만들어 MDA, protein carbonyl 함량과 catalase, GPx 및 GR의 활성을 측정하였다. 단백질 정량은 Bradford method를 이용한 단백질 정량 kit (PQ01-12, Dojindo Co., Japan)를 사용하고 BSA를 standard로 하여 600 nm에서, 지질과산화 정도는 malondialdehyde (MDA)를 thiobarbituric acid (TBA)와의 반응법으로 측정하는 Ohkawa 등¹⁷⁾의 방법으로 540 nm에서 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다. 단백질의 산화의 지표로는 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)를 가진 carbonyl groups (aldehydes와 ketones)이 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNP)를 형성하는 반응에 기초한 Levine 등¹⁸⁾의 방법으로 370 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glutathione peroxidase (GPx) 활성은 colorimetric assay kit (Oxford Biomedical Research, Inc.; FR 17, USA)를, Glutathione Reductase (GR)의 활성은 colorimetric assay kit (Oxford Biomedical Research, Inc.; FR 19, USA)를 이용하여 분광광도계 (spectrophotometer; Beckman DU-650, USA) 340 nm에서 측정하였다. Catalase의 활성은 Aebi¹⁹⁾의 방법에 따라 분석하였으며, 1분당 1 mg 단백질을 기준으로 catalase가 1 μ mole H₂O₂를 분해하는 양을 1 unit으로 계산하였다.

간 조직의 ferritin, bcl-2, bax 및 caspase-3 단백질 수준은 각각 단백질의 특이 항체를 사용한 Western blot 방법으로 분석하였다. 각 조직의 10% 균질액을 단백질량이 50 μ g이 되도록 12.5% polyacrylamide gel에 loading한

후, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacryl electrophoresis (SDS-PAGE)로 단백질을 분리시켰다 (전기영동 완충용액: 25 mM Trizma base; 192 mM glycine; 0.1% SDS, pH 8.3, 40 V로 1시간 후, 80 V로 약 2시간). 단백질분리 후, 단백질 전이완충용액 (10 mM CAPS, pH 11.0; 20% MeOH)을 이용하여 400 mA에서 2시간 동안 polyvinylidene fluoride membrane (PVDF; Millipore Corp., Bedford, MA, USA)에 전이시켰다. 전이된 막은 5% skimmed milk/TBS-T (20 mM Tris, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1% Tween-20)용액에서 1시간 동안 실온에서 blocking하였다. 이것을 TBS-T 용액으로 10분간 3회 세척한 후 anti-Rabbit Ferritin polyclonal antibody (Dako Corporation, Carpinteria, CA; 1 : 5,000), anti-Rabbit Bcl-2 polyclonal antibody (Santa Cruze Biotechnology, Santa Cruze, CA; 1 : 5,000), anti-Mice Bax monoclonal antibody (Zymed, San Francisco, CA; 1 : 5,000), anti-Rabbit Caspase-3 polyclonal antibody (Cell signaling Technology, Beverly, MA; 1 : 1,000)로 4 °C에서 overnight hybridization하였다. 그 후 실온에서 10분간 3회 세척 후 1 : 5,000으로 희석한 2차 항체를 사용하여 실온에서 1시간 동안 hybridization시켰다. 이것을 10분간 3회 세척한 후, 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Pierce) detection reagent에서 Amersham Hyperfilm (GE Healthcare Bio-sciences Co. USA)을 이용하여 노출시킨 후, 현상하였다. 최종적으로 나타난 밴드 (band) 면적의 차이를 Image J 프로그램 version 1.37 (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)로 분석하였다. Loading control로서 β -actin 특이항체 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 1 : 5,000)를 사용하여 actin 단백질을 측정하였다.

통계분석

실험 결과는 SAS program (version 8.1)을 이용하여 통계 처리하였으며, 모든 실험결과는 평균과 표준 오차 (mean \pm SE)로 나타내었다. 철의 섭취 수준과 임신여부의 2가지 요인에 따른 영향을 보기 위하여 two-way ANOVA test로 검증하였고, 비임신쥐와 임신쥐 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교, 분석하였다.

결 과

체중변화와 식이섭취량

임신이 18일 동안 임신 쥐의 체중 변화와 식이 섭취량은 철의 섭취 수준에 의해서는 유의적인 차이를 보이지 않았다

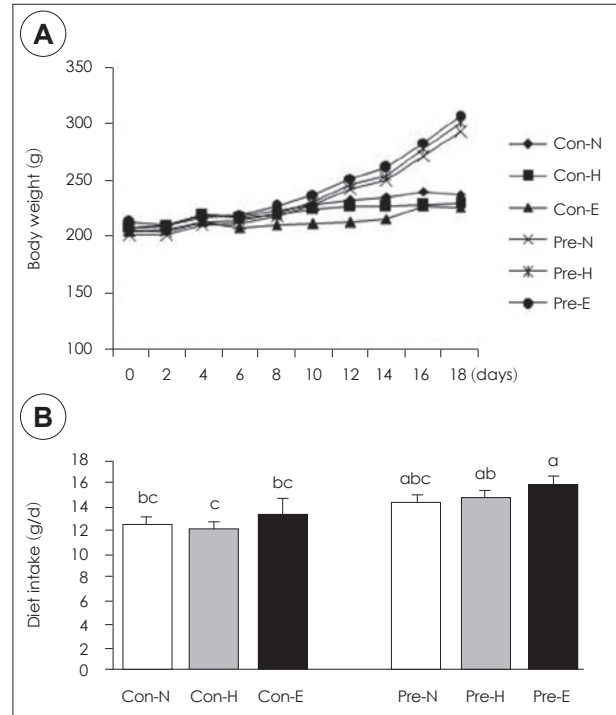


Fig. 1. The body weight and food intakes of non-pregnant and pregnant rats. A) The growth chart during experimental period. B) Food intakes during experimental period. Con-N: Non-pregnant Control fed normal Fe diet, Con-H: Non-pregnant Control fed high Fe diet, Con-E: Non-pregnant Control fed excess Fe diet, Pre-N: Pregnant rats fed normal Fe diet, Pre-H: Pregnant rats fed high Fe diet, Pre-E: Pregnant rats fed excess Fe diet. Values are mean \pm SE of 6 rats per group. Bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(Fig. 1). 초기 체중에서는 모든 실험군에서 유의적인 차이가 없었으나, 10일 이후부터 임신쥐의 체중이 증가하여 최종 체중은 비임신 대조군에 비해 임신쥐의 체중이 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.01$). 식이 섭취량의 경우도 철 섭취 수준의 영향은 받지 않았으나 비임신 쥐에 비해 임신쥐의 식이 섭취량이 증가하였다 ($p < 0.01$).

어미쥐의 조직무게

임신쥐와 비임신쥐의 간, 뇌 및 지라 조직의 무게를 측정한 결과와 100 g체중에 대한 조직 무게의 비율을 Table 2에 표시하였다. 비임신쥐와 임신쥐의 간, 뇌, 지라 조직에서 모두 철의 섭취 수준에 따라 조직무게의 차이는 없었다. 그러나 비임신쥐에 비해 임신쥐의 간 조직무게가 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.01$). 뇌 조직은 비임신쥐와 임신쥐 모두에서 차이가 없었지만 임신쥐에서 체중의 증가로 인해 체중에 대한 비율은 감소하였다. 지라 조직은 임신에 의해 증가 경향을 보였고, 과잉 철을 섭취한 군에서만 비임신쥐에 비해 임신쥐에서 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.01$).

Table 2. Tissue weights of non-pregnant and pregnant rats

Groups	Liver		Brain		Spleen	
	g	g/100 gBW	g	g/100 gBW	g	g/100 gBW
Non-pregnant rats						
Con-N	5.29 ± 0.11 ^{1)b2)}	2.29 ± 0.03 ^b	1.59 ± 0.03 ^{NS3)}	0.69 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.03 ^b	0.27 ± 0.01 ^{ab}
Con-H	5.15 ± 0.13 ^b	2.33 ± 0.05 ^b	1.60 ± 0.04	0.72 ± 0.01 ^a	0.62 ± 0.02 ^b	0.28 ± 0.01 ^a
Con-E	5.22 ± 0.19 ^b	2.38 ± 0.05 ^b	1.60 ± 0.03	0.73 ± 0.03 ^a	0.58 ± 0.06 ^b	0.26 ± 0.02 ^{ab}
Pregnant rats						
Pre-N	9.20 ± 0.22 ^a	3.16 ± 0.08 ^a	1.61 ± 0.03	0.55 ± 0.02 ^b	0.68 ± 0.02 ^{ab}	0.24 ± 0.01 ^b
Pre-H	8.84 ± 0.22 ^a	2.98 ± 0.08 ^a	1.62 ± 0.03	0.55 ± 0.02 ^b	0.68 ± 0.03 ^{ab}	0.23 ± 0.01 ^b
Pre-E	9.25 ± 0.29 ^a	3.05 ± 0.08 ^a	1.64 ± 0.03	0.54 ± 0.01 ^b	0.78 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.01 ^{ab}
Fe level	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pregnancy	**	**	NS	**	**	*
Fe level × pregnancy	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1) Values are Mean ± SE of 6 rats per group 2) a, b values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test 3) NS : not significantly different among groups

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ by two-way ANOVA test

Table 3. Litter size, total fetus weight and total placenta weight of pregnant rats

Groups	Litter size (Number)	Total fetus weight (g)	Total placenta weight (g)
Pre-N	13.1 ± 0.5 ^{1)NS}	22.44 ± 4.99 ^{NS2)}	5.44 ± 0.44 ^{NS}
Pre-H	13.1 ± 0.9	24.85 ± 2.80	5.52 ± 0.27
Pre-E	14.3 ± 0.5	21.39 ± 1.79	5.67 ± 0.30

1) Values are Mean ± SE of 7 rats per group 2) NS : not significantly different among groups

Table 4. Hemoglobin, hematocrit and serum iron concentration of non-pregnant and pregnant rats

Groups	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	Serum Fe (μg/dL)
Non-pregnant rats			
Con-N	14.4 ± 0.1 ^{1)a2)}	47.3 ± 1.2 ^a	335.8 ± 9.5 ^a
Con-H	14.3 ± 0.3 ^a	47.3 ± 1.2 ^a	330.2 ± 9.8 ^a
Con-E	14.0 ± 0.2 ^a	47.9 ± 0.6 ^a	342.6 ± 7.2 ^a
Pregnant rats			
Pre-N	12.2 ± 0.5 ^b	40.1 ± 2.1 ^b	131.8 ± 9.1 ^{bc}
Pre-H	12.2 ± 0.2 ^b	42.4 ± 1.6 ^b	100.4 ± 14.9 ^c
Pre-E	12.1 ± 0.3 ^b	40.6 ± 0.9 ^b	154.6 ± 25.6 ^b
Fe level	NS ³⁾	NS	NS
Pregnancy	**	**	**
Fe level × pregnancy	NS	NS	NS

1) Values are Mean ± SE of 7 rats per group 2) a, b, c values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test 3) NS: not significantly different among groups

** : $p < 0.01$ by two-way ANOVA test

임신의 결과

임신 19일경에 임신 쥐로부터 수집한 어미 한 마리 당 태생 쥐의 수 (litter size)를 측정하고, 각 태생 쥐 (fetus)와 태반 (placenta)의 무게를 측정한 결과, 모두 임신 쥐의 철 섭취 수준에 따라서 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 3). 어미 한 마리 당 태생 쥐의 마리수는 정상 철 섭취군에서 평균 13 마리, 10배 섭취군에서 13마리와 30배 섭취군에서 14마리였다. 한 어미 당 총 태생 쥐의 무게와 태반의 무게가 철 섭취

수준에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

혈액 철 지표의 변화

비임신 쥐와 임신 쥐에서 실험기간 동안 각각 철의 섭취 수준에 따라 헤모글로빈 (hemoglobin, Hb)과 헤마토크릿 (hematocrit, Hct) 값은 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 4). 그러나 비임신 쥐에 비해 임신 쥐에서 헤모글로빈과 헤마토크릿 값이 유의적으로 낮았다 ($p < 0.01$). 그리고 혈청 철 농도도 임신 쥐에서 비임신 쥐에 비해 유의적으로 낮

Table 5. Iron contents in liver, brain and spleen of non-pregnant and pregnant rats

Groups	Liver		Brain		Spleen	
	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Total (mg)	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Total (mg)	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Total (mg)
Non-pregnant rats						
Con-N	402.1 \pm 16.0 ^{1) b2)}	2.12 \pm 0.08 ^d	11.3 \pm 0.2 ^{1) NS3)}	17.8 \pm 0.4 ^{NS}	879.4 \pm 14.9 ^b	538.8 \pm 26.9 ^{ab}
Con-H	470.2 \pm 35.6 ^{ab}	2.41 \pm 0.18 ^{cd}	10.7 \pm 0.3	17.0 \pm 0.7	757.7 \pm 25.9 ^b	467.9 \pm 23.3 ^b
Con-E	584.1 \pm 70.7 ^a	3.02 \pm 0.31 ^{bc}	11.1 \pm 0.2	17.7 \pm 0.2	1109.0 \pm 164.8 ^a	598.3 \pm 49.9 ^a
Pregnant rats						
Pre-N	129.5 \pm 13.1 ^b	1.18 \pm 0.10 ^e	10.5 \pm 0.3	16.9 \pm 0.7	476.1 \pm 48.2 ^c	326.6 \pm 37.1 ^c
Pre-H	391.8 \pm 35.9 ^b	3.45 \pm 0.28 ^b	10.8 \pm 0.4	17.4 \pm 0.5	697.7 \pm 89.2 ^b	465.3 \pm 50.4 ^b
Pre-E	530.7 \pm 47.3 ^b	4.86 \pm 0.39 ^a	10.4 \pm 0.2	17.1 \pm 0.3	722.6 \pm 55.0 ^b	550.8 \pm 32.7 ^{ab}
Fe level	**	**	NS	NS	*	**
Pregnancy	**	**	NS	NS	**	**
Fe level \times pregnancy	*	**	NS	NS	*	*

1) Values are Mean \pm SE of 6–7 rats per group 2) a, b values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test 3) NS: not significantly different among groups
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ by two-way ANOVA test

았다. 철의 섭취수준에 따라서는 비임신쥐에서는 영향을 받지 않았고, 임신쥐에서는 철 과잉섭취군에서 혈청 철 수준이 가장 높았다. 따라서, 혈액의 철 지표들의 경우는 철 섭취수준보다는 임신여부에 의해 더 크게 영향을 받았다.

조직의 철 함량

임신 동안 철의 섭취 수준에 따른 임신쥐와 비임신쥐의 조직 내 철 함량을 측정한 결과를 Table 5에 제시하였다. 뇌 조직에서는 철의 섭취수준에 따라 임신쥐와 비임신쥐 모두 유의적인 차이가 없었다. 한편, 철의 대사와 저장을 담당하는 조직인 간과 지라 조직에서는 철 함량이 임신쥐와 비임신쥐 모두 철의 섭취 수준에 따라 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 하지만 그 증가 폭은 비임신쥐에서보다 임신쥐에서 훨씬 컸다. 비임신 쥐에서는 간 조직의 경우, 정상수준 군에 비해 고수준과 과잉섭취 군에서 각각 17%와 45% 더 증가하였고, 지라의 경우는 고수준 군에서는 14% 감소하였으나 과잉섭취 군에서는 26% 더 증가하였다. 한편 임신쥐에서는 간의 경우 각각 203% 와 310%, 지라의 경우 각각 47% 와 52% 더 증가하였다.

조직의 산화적 스트레스

간 조직에서 지질 과산화물 지표인 MDA농도는 비임신 쥐에 비해 임신 쥐에서 증가하는 경향을 보였으나, 철의 섭취 수준에 따라서는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 6). 반면에 단백질의 산화 지표인 protein carbonyl (DNP) 농도는 비임신쥐와 임신쥐 모두에서 정상 수준에 비해 고수준과 과잉 수준에서 유의적으로 증가하였다.

철의 섭취 수준에 따른 임신기 동안의 항산화 효소의 활성을 보면 (Table 7), 임신 쥐와 비임신 쥐 모두에서 GPx 활성

Table 6. The contents of MDA and DNP in liver homogenates of non-pregnant and pregnant rats

Groups	MDA (nmole/mg protein)	DNP (nmole/mg protein)
Non-pregnant rats		
Con-N	0.54 \pm 0.04 ^{1) b}	2.93 \pm 0.36 ^{b2)}
Con-H	0.64 \pm 0.04 ^{ab}	4.09 \pm 0.34 ^a
Con-E	0.50 \pm 0.01 ^b	4.42 \pm 0.39 ^a
Pregnant rats		
Pre-N	0.65 \pm 0.04 ^{ab}	1.83 \pm 0.27 ^c
Pre-H	0.69 \pm 0.07 ^a	2.24 \pm 0.29 ^{bc}
Pre-E	0.63 \pm 0.05 ^{ab}	2.83 \pm 0.28 ^b
Fe level	NS ³⁾	*
Pregnancy	*	**
Fe level \times pregnancy	NS	NS

1) Values are Mean \pm SE of 7 rats per group 2) a, b, c values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test 3) NS: not significantly different among groups
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ by two-way ANOVA test

이 과잉 철 섭취군에서 유의적으로 감소하였고, GR이나 catalase는 유의적인 차이를 보이지 않았다. GPx는 정상섭취 군과 과잉섭취군에서 비임신시보다 임신시에 효소의 활성이 다소 증가하였다.

간 조직의 페리틴 단백질 수준

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Western-blot 분석 결과에서 간 페리틴 단백질 수준은 비임신쥐에서는 철의 섭취수준이 증가할수록 유의적으로 감소한 반면에, 임신쥐에서는 정상 수준을 제외하고는 고수준과 과잉수준의 철을 섭취하였을 때, 페리틴 단백질 수준이 증가하였다. 특히, 고수준의 철을 섭취한 임신쥐에서는 비임신 정상섭취군 (Con-N)에 비해 유

Table 7. The activities of antioxidant enzymes in liver of non-pregnant and pregnant rats

Groups	GPx (mU/mg protein)	GR (mU/mg protein)	Catalase (U/mg protein)
Non-pregnant rats			
Con-N	27.7 ± 0.0 ^{1)ab2)}	18.0 ± 1.5 ^{NS3)}	92.5 ± 2.8 ^{ab}
Con-H	28.0 ± 2.0 ^{ab}	19.6 ± 1.2	101.3 ± 4.1 ^a
Con-E	20.8 ± 1.8 ^c	18.8 ± 0.5	91.1 ± 3.5 ^b
Pregnant rats			
Pre-N	32.8 ± 3.3 ^a	19.1 ± 0.8	96.9 ± 1.4 ^{ab}
Pre-H	26.5 ± 1.0 ^{abc}	17.6 ± 0.5	97.4 ± 1.0 ^{ab}
Pre-E	24.9 ± 1.8 ^b	16.9 ± 1.0	96.9 ± 3.1 ^{ab}
Fe level	NS ³⁾	NS	NS
Pregnancy	**	**	**
Fe level × pregnancy	NS	NS	NS

1) Values are Mean ± SE of 7 rats per group 2) a, b, c values with different superscript within a column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test 3) NS : not significantly different among groups

** : $p < 0.01$ by two-way ANOVA test

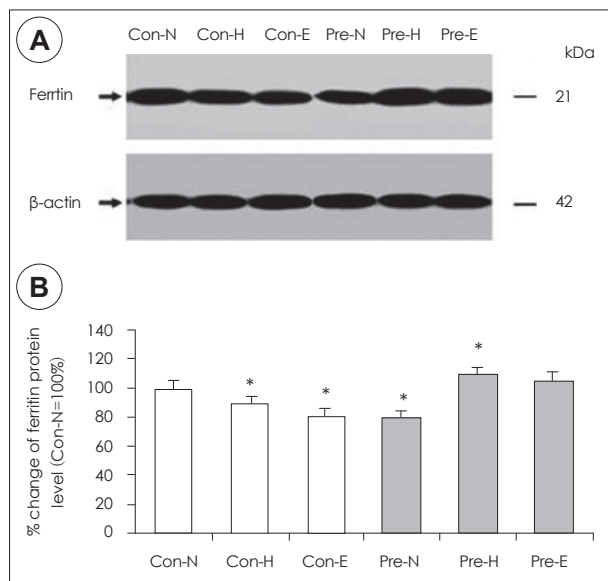


Fig. 2. Protein levels of ferritin in liver of non-pregnant and pregnant rats. A) Western blots show the protein expression levels of ferritin in liver of non-pregnant (Control) and pregnant rats at three iron intake levels (N: normal, 35 ppm, H: high, 350 ppm, E: excess, 1,050 ppm). B) Bar graph represent the relative density of ferritin protein level in liver. *: means a significant difference from Con-N at $p < 0.05$.

의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$).

간 조직의 Bax, Bcl-2 및 caspase-3 단백질 수준

간 조직에서 세포사멸 (apoptosis)과 관련된 요인들을 분석한 결과, Bax 단백질의 수준은 비임신쥐와 임신쥐가 다른 경향을 보였다. 비임신쥐에서는 철의 섭취 수준이 증가함에 따라 Bax 단백질의 발현이 증가하여, 과잉 철 섭취군에서는 정상 철 섭취군에 비해 유의적으로 증가하였다. 한편, 임신쥐에서는 철 섭취 수준의 증가에 따라 오히려 감소하는

경향을 보였다 (Fig. 3). 그러나, Bax 단백질의 수준은 비임신 정상 철 섭취군에 비해 모든 임신쥐 군에서 유의적으로 증가하였다. Bcl-2 단백질 또한 임신 쥐에서 비임신 쥐에 비해 유의적으로 증가하였는데, 비임신 정상 철 섭취군에 비해 정상과 고수준의 철을 섭취한 임신 쥐에서 유의적으로 높았다. 그리고 임신 쥐에서 Bcl-2 단백질은 철의 섭취 수준이 증가하면서 현저히 감소하였다. 임신쥐에서 정상 수준군에 비해 과잉 수준군에서 Bcl-2 단백질의 감소 폭이 53%인 것에 비해 Bax 단백질의 감소 폭은 25%로 Bax 단백질보다 Bcl-2 단백질 수준이 훨씬 더 큰 폭으로 감소하였다. 한편, Caspase-3 단백질 수준은 비임신쥐에 비해 임신쥐에서 약간 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았다. Caspase-3 19 kDa에서는 모든 군 간에 유의성이 없었고, 17 kDa에서는 비임신 과잉 철 섭취군에서만 정상 철 섭취군에 비해 유의적으로 감소하였다.

고 찰

임신기 동안 어미 쥐의 철 섭취수준과 체내 철 상태에 관한 실험연구들^{20,21)}에서, 체중과 식이섭취량에 미치는 효과가 본 연구결과와 일치하는 결과를 보였다. Southon 등²¹⁾의 연구에서 임신 2주 전부터 임신기간 동안 17 mg Fe/kg diet와 100 mg Fe/kg diet를 섭취시켰을 때, 체중과 식이섭취량이 어미쥐의 철 섭취 수준의 영향을 받지 않았다. 35, 75, 150과 300 mg Fe/kg diet의 식이를 급여한 Kochanowski와 Sherman의 연구²⁰⁾에서도 같은 결과를 보였다. 그러나 5, 16, 100, 300, 1,000, 2,500 및 5,000 mg Fe/kg diet까지 보다 많은 양의 철 식이를 처리한 Finch 등²²⁾의 연구결과를 보면, 가장 낮은 수준인 5 ppm과 2,500 ppm 이상 수준의 식

이에서는 임신 20일경 어미쥐의 체중감소를 보였다. 그러나 16~1,000 ppm사이의 수준에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 본 연구에서 사용된 어미쥐의 철 섭취수준이 35~

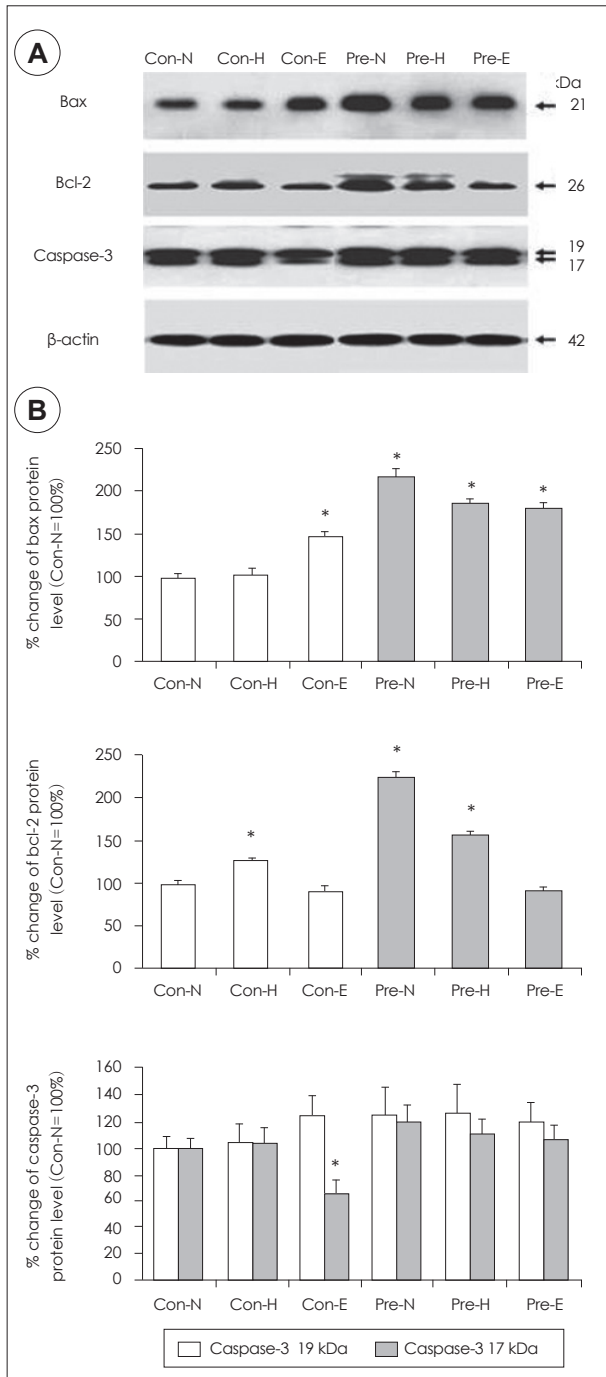


Fig. 3. Protein levels of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 of liver of non-pregnant and pregnant rats. A) Western blots show the protein expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase-3 as a marker of cell apoptosis. Results represented that Bcl-2 protein level of pregnant rats fed excess iron decreased significantly compared with rats fed normal iron. B) Bar graphs represent the relative density of bax, bcl-2 and caspase-3 protein level in liver respectively. *: means a significant difference from Con-N at $p < 0.05$.

1,050 ppm 범위의 수준이므로 체중과 식이섭취량에서는 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다. Sochaski 등²³⁾의 연구에서는 장기간의 철 노출에 의해 유의적인 체중감소를 보였는데, 철의 투여 방법이 복강내주사 (intraperitoneal injection, IP) 방법이었으며, 투여수준도 마우스 1마리 당 20 mg/d로 높은 수준이었다.

본 연구에서 비임신쥐와 임신쥐의 간, 뇌 및 지라 조직의 무게는 모두 철의 섭취 수준에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다. Kochanowski와 Sherman의 연구²⁰⁾에서 임신 동안 어미 쥐가 35 ppm과 300 ppm의 철 식이를 섭취했을 때, 간과 지라 조직의 무게에는 차이가 없었다. Lin과 Kirksey,²⁴⁾ Finch 등²²⁾의 연구에서도 조직의 무게는 철 섭취 수준의 영향을 받지 않아서 본 연구 결과와 일치하였다. 그러나, 비임신쥐에 비해 임신쥐의 조직이 체중증가와 함께 커짐을 알 수 있었고, 특히 간조직의 비대현상이 뚜렷하였다.

임신기 동안의 영양소 섭취 상태는 임신의 결과 (pregnancy outcome)에 상당한 영향을 미치는 것으로 보고되어 왔다.^{21,24,25)} 본 연구에서 임신기 동안 어미쥐의 철 과잉 섭취가 태아의 수나 출생 무게에 영향을 주는지를 살펴 본 결과, 철 섭취수준에 따라 출생시 태생쥐의 수나 체중 및 태반 무게에 유의적인 영향을 주지 않았다. Southon 등²¹⁾의 연구에서도 태생쥐의 수나 무게가 어미쥐의 철 섭취 수준의 영향을 받지 않아서 본 연구 결과와 일치하였다. 우리나라 임신부를 대상으로 한 조 등⁵⁾의 연구에서도 철 보충제를 하루 평균필요량의 3배 이상 섭취한 군과 3배이하 섭취한 군의 비교에서 신생아의 체중, 키, 임신주수, 체중증가량 및 신생아 황달 정도에서 차이를 보이지 않았다. 그러나 Finch 등²²⁾의 연구에서는 결핍 수준인 5 ppm과 2,500 ppm 이상의 과잉 수준에서는 임신 20일경 태생쥐의 생존률 감소를 보였으나, 16~1,000 ppm사이의 수준에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 7주령 임신쥐와 17주령 임신쥐에서 다양한 철 섭취수준 (10, 50, 250, 1250 mg Fe/kg diet)에 따른 임신 결과의 차이를 비교한 연구²⁴⁾에서, 가장 낮은 수준의 10 ppm 식이를 섭취한 7주령 임신쥐로부터 태어난 태생쥐의 체중만 감소했을 뿐, 다른 수준에서는 차이를 보이지 않았다. Tran 등²⁵⁾에 의하면 임신시 20 mg/kg BW의 철을 섭취하거나 혈청 철 농도가 400 μ g/dL 이상인 경우, 철 과잉의 독성 증상인 자연유산 (spontaneous abortion), 조산 (preterm delivery), 산모사망 (maternal death) 등이 나타났다고 한다. 따라서, 본 연구에서는 철이 결핍된 수준은 없었고, 정상의 30배인 과잉 수준 (1,050 ppm)은 임신의 결과에 대해서는 해로운 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

임신 동안 인간의 헤모글로빈 정상치는 WHO 기준에 의하

면 초기에는 11.0 g/dL 이상, 중기 이후에는 10.5 g/dL 이상이다.²⁶⁾ 강 등²⁷⁾의 보고에 의하면 정상 SD rat의 혈액 헤모글로빈 수치는 12.5~17.4 g/dL이고, 헤마토크릿은 34.7~51.2%로 인간에 비해 상당히 넓은 범위를 가진다. 본 연구에서 헤모글로빈과 헤마토크릿은 철 섭취 수준의 영향은 받지 않았고, 임신기에서 비임신기보다 유의적으로 감소하였다. 이 결과는 임신의 정상적인 생리현상으로 혈액량 증가에 의한 혈액희석 (hemodilution) 현상에 의한 것으로 사료된다. Kochanowski와 Sherman의 연구²⁰⁾에서 35 ppm과 300 ppm 사이의 철 섭취군에서 어미 쥐의 헤모글로빈 농도는 차이가 없었다. Nair 등²⁸⁾은 인간에서 임신 19주경에 임신기 동안 60 mg 철과 500 µg 엽산을 보충했을 때, 임신 27주와 35주에서 헤모글로빈농도, 혈청 페리틴 및 트랜스페린 수용체 (serum transferrin receptor, sTfR)농도에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나, 보충제 섭취 전에 빈혈을 가진 산모의 경우에는 임신 35주경에 철 보충제에 의해 헤모글로빈이 유의적으로 증가하였다. Lee 등²⁹⁾의 연구에서는 임신중기에 40 mg/d, 말기에 46 mg/d를 보충했을 때에도 임신말기에 혈청 철, 헤모글로빈, 헤마토크릿 및 페리틴은 감소를 보였다. Cogswell 등³⁰⁾의 연구에서 빈혈이 없는 정상 임신부에게 18주간 철 보충제를 준 연구에서도 대조군에 비해 전반적인 혈액지표나 조산율의 발현율은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 태아의 출생체중이 보충군에서 유의적으로 더 높았고, 저체중아 출산율도 유의적으로 낮았다. 본 연구에서는 임신 전에 철분의 결핍 조건이 아니었으므로 철 섭취 수준이 임신쥐의 혈청 철 수준이나 빈혈지표에 영향을 미치지 않은 것으로 사료되며, 다만 혈청 철 수준은 비임신쥐에 비해 임신쥐에서 약 1/3 수준으로 낮았다.

본 연구에서 임신쥐에서 고수준과 과잉수준 철 섭취군의 간 조직 철 함량이 정상 철 섭취군의 3~4배 정도로 증가하였다. 그러나 비임신 쥐에서는 정상 철 섭취군에 비해 고수준 군에서는 유의적인 증가를 보이지 않았고, 과잉 철 섭취군에서는 정상군의 1.5배 정도로 철 증가를 보였다. 이 결과는 비임신기에 비해 임신기에 철의 흡수가 유의적으로 증가함으로써 철의 섭취수준이 증가할수록 상당한 양의 철이 간에 축적될 수 있음을 보여주었다. 다른 연구들에서도 철 섭취의 증가로 간의 철 함량이 유의적으로 증가된 것을 보고 하였는데, Sherman과 Moran³¹⁾의 연구에서는 본 연구의 결과에서의 비율과 비슷하게 간 조직 철 함량이 증가하였고, Lin과 Kirksey의 연구²⁴⁾에서는 더 큰 비율로 증가하였다. 간 조직 뿐만 아니라 지라 조직도 체내 흡수된 철의 주요 저장고이다. 임신쥐의 지라조직은 정상 철 섭취군에 비해 고수준과 과잉수준에서 모두 약 1.5배 정도의 철 증가를 보였다

또한 비임신 쥐에서는 간 조직에서와 마찬가지로 과잉 섭취군에서만 1.3배 정도의 증가를 보였다.

철의 공급이 적절할 때, 체내 철의 25%가 간, 지라 및 골수의 망상내피세포계 (reticuloendothelial system)에 페리틴의 형태로 저장된다.³²⁾ 페리틴은 철에 의한 세포독성을 막아주는 주요 물질로 알려져 있지만, 조직의 페리틴 함량이 계속 증가할 경우, 저장된 철이 지질과산화작용의 개시반응에 참여함으로써 조직 산화 및 세포사멸을 촉진시키는 인자로 작용할 수도 있다.³³⁾ Templeton과 Liu의 연구³⁴⁾에 의하면 쥐에게 장기간 철을 공급하였을 때, L-ferritin mRNA가 증가하였다. 본 연구결과에서 간 조직의 페리틴 단백질 수준은 비임신쥐에서는 철 섭취수준의 증가에 따라 유의적으로 감소한 반면에, 임신쥐에서는 철 섭취 수준이 증가할수록 철 흡수가 증가하여 간조직의 페리틴 단백질 발현이 증가한 것으로 보여진다. 이것은 비임신기에는 철의 섭취 수준이 증가하면 철 흡수율이 낮아져 간의 페리틴 단백질 발현도 감소하는 것으로 볼 수 있으며, 임신기에는 유의적으로 증가된 철의 흡수와 함께 간의 페리틴 단백질 발현도 증가한 결과로 보여진다.

Khan 등³⁵⁾의 연구에서 5주간 철 결핍식을 섭취한 쥐에게 하루 8 mg의 철을 경구로 보충하였을 때, 대조군에 비해 철 보충군의 소장 점막에서 MDA와 protein carbonyl 생성이 유의적으로 증가하였다. 또한 carbonyl iron [Fe (CO)₅, 철 함량 98%] 형태의 철을 25,000 ppm 수준으로 섭취시킨 쥐에서 MDA함량이 대조군에 비해 186%나 증가하였다. 반면에 철의 과량 보충에도 불구하고 간, 신장 및 혈장에서 MDA의 차이를 보이지 않은 보고도 있었다.³⁶⁾ 본 연구 결과에서는 지질과산화반응이 임신에 의해서는 증가하였지만, 철의 섭취수준을 높였을 때 증가하지 않았다. 철 섭취 증가시 지질과산화물이 증가하였던 Khan 등의 연구³⁵⁾와 비교하였을 때 본 연구에서는 철의 섭취 기간도 짧았고, 섭취 수준도 더 낮았기 때문에 간 조직에서 지질과산화물의 농도가 증가하지 않았던 것으로 사료된다.

철은 세포내 신호전달에서 활성산소 (ROS)의 2차 전령 역할을 통해 산화적 스트레스에 관련된 유전자 전사를 조절한다고 한다.³⁴⁾ 결국, 스트레스에 대응하는 항산화 효소의 유전자 발현을 증가시키는데, 그 중 GPx는 가장 강력하게 산화적 스트레스에 의해 유도되는 효소 중 하나이다. 또한 GPx는 세포내 H₂O₂를 제거하는 셀레늄-의존 항산화효소로 잘 알려져 있다. 흰쥐에게 총 100 mg, 200 mg, 300 mg 철을 각각 복강내로 공급하였을 때, 심장의 셀레늄 농도와 GPx활성이 유의적으로 감소하였다.³⁷⁾ 세포 내 증가된 철 수준이 GPx mRNA transcription을 증가시킨다는 보고가 있는 반면,

철 수준의 증가에 따른 GPx 활성의 감소도 보고되었다.³⁷⁾ 따라서 본 연구에서도 임신기 동안의 철 과잉에 따라 GPx 활성이 가장 먼저 영향을 받은 것으로 사료된다.

미토콘드리아에서 발생하는 ROS가 신호로 작용하여 미토콘드리아 막에서 이온채널의 변화가 일어나고, apoptotic-specific protease로 알려진 caspases의 방출에 의해 세포사멸이 촉진된다.³⁸⁾ 특히, 프로그램화된 세포사멸 (apoptosis) 과정에서 세포사멸 촉진인자 (pro-apoptotic factor)인 Bax와 세포사멸억제인자 (anti-apoptotic factor)인 Bcl-2의 비율이 중요하며, 그 비율이 증가하면 세포사멸이 촉진된다고 한다.³⁹⁾ 본 연구 결과에서는 비임신기와 임신기에 간 조직 세포의 사멸에 관련하는 Bcl-2 family 단백질인 Bcl-2와 Bax 단백질의 수준에서 차이를 보였다. 비임신기보다는 임신기에 전반적으로 세포사멸과 관련된 요인들이 증가하는 경향을 보였는데 정상수준의 철을 섭취한 임신쥐는 비임신 쥐에 비하여 세포사멸을 촉진하는 Bax의 양이 크게 증가하였지만 동시에 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 양도 함께 증가함으로써 간세포의 사멸을 막아주고 있는 것으로 보인다. 그러나, 고농도나 과잉 농도의 철을 임신쥐에게 먹인 경우, Bax 단백질은 그대로 높게 유지되는 반면 Bcl-2의 단백질 양은 크게 감소하여 Bax/Bcl-2 단백질 비율이 증가함으로써 간세포의 사멸이 증가할 가능성을 보였다. 따라서, 임신기에 철을 과잉으로 섭취하면 간세포에서 Bcl-2 단백질이 현저하게 감소하여 조직 손상이 발생할 것으로 여겨지지만, 임신기 동안의 Bax/Bcl-2의 비율의 변화로 인한 조직의 세포사멸과의 관련성이 아직은 명확하게 밝혀지지 않아서 앞으로 더 많은 실험적 검증이 요구된다.

요 약

본 연구는 임신기 동안 어미쥐의 철 섭취 수준이 모체의 철 대사지표와 산화적 스트레스 및 임신의 결과에 미치는 영향을 검토하기 위해 비임신쥐를 대조군으로 하여 수행하였다. 10주령 200 g 이상 된 암컷과 수컷 흰쥐를 1 : 1로 교배시켜 임신을 확인한 후, 비임신쥐 (대조군)와 임신쥐 (실험군)에게 식이 중 철 수준이 정상수준 (AIN-93G diet 수준, 35 mg Fe/kg diet), 고수준 (정상의 10배, 350 mg Fe/kg diet) 및 과잉수준 (정상의 30배, 1,050 mg Fe/kg diet)의 3가지 실험식이를 급여하였다. 임신 19일째 되는 날, 비임신쥐와 임신 쥐를 희생시켜 분석한 결과는 다음과 같다. 체중의 증가나 식이섭취량은 철 섭취 수준의 영향을 받지 않았고, 임신의 결과로서 태아의 수, 태아체중 및 태반무게도 철 섭취 수준의 영향은 받지 않았다. 헤모글로빈, 헤마토크릿,

혈청 철 농도 등의 혈액지표들은 철 섭취 수준의 영향은 받지 않았으나 임신에 의한 감소 경향을 보였다. 임신쥐의 철 섭취 수준의 증가에 따라 간과 지라 조직의 철 함량이 유의적으로 증가하였다. 또한 임신쥐의 간에서 페리틴 단백질 수준이 철 섭취의 증가에 따라 현저히 증가하였다. 산화적 손상지표인 지질과산화물 (MDA)은 철 섭취수준의 영향을 받지 않았고, 단백질 산화물 (protein carbonyls)은 비임신쥐와 임신쥐에서 모두 철 과잉 섭취군의 경우 유의적으로 증가하였다. 항산화효소 중에서는 철 과잉섭취군에서 간의 GPx 활성이 유의적으로 감소하였다.

결론적으로, 임신기 동안 어미쥐의 철 섭취수준의 증가는 어미쥐의 혈액지표와 임신의 결과에는 유의적인 영향을 미치지 않았지만, 간 조직 내 철 함량과 페리틴 단백질 수준을 유의적으로 증가시켰으며, 간 조직에서 단백질 산화물인 protein carbonyl 농도를 증가시키고, 항산화효소 중 특히 GPx의 활성 감소를 초래하였다. 또한 간 조직에서 세포사멸을 억제하는 중요한 인자인 Bcl-2 단백질 수준이 임신쥐에서 철 섭취의 증가에 따라 유의적으로 감소하였다. 이러한 영향이 철을 정상 수준의 10배 섭취한 군에서는 약하게 나타났으나, 30배 과잉으로 철을 섭취한 군에서는 유의적으로 차이를 보였다. 이 결과는 임신시 철 과잉 섭취의 해로운 영향이 지금까지 철 대사의 측정도구로 삼아왔던 혈액지표의 변화 보다는 체내에서 일어나는 조직의 산화적 스트레스의 증가나 조직 내 철의 축적 등에 보다 더 민감하게 반영됨을 알 수 있었다. 따라서, 철 과잉 섭취가 모체 뿐만 아니라 태생 조직의 산화적 스트레스에도 영향을 줄 수 있음을 시사하였다.

Literature cited

- 1) Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(10): 940-959
- 2) Swanson CA. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. *Alcohol* 2003; 30(2): 99-102
- 3) Levenson CW, Tassabehji NM. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Res Rev* 2004; 3(3): 251-263
- 4) Ministry of Health & Welfare, 2008 the Report of Korean National Health & Nutrition Examination Survey; 2009
- 5) Cho JH, Ahn HS, Bae HS. The use of iron supplements of pregnant women and pregnancy outcome. *Korean J Community Nutr* 2009; 14(3): 327-339
- 6) Casanueva E, Viteri FE. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr* 2003; 133(5 Suppl 2): 1700S-1708S
- 7) Southon S, Wright AJ, Fairweather-Tait SJ. The effect of differences in dietary iron intake on 59Fe absorption and duodenal morphology in pregnant rats. *Br J Nutr* 1989; 62(3): 707-717
- 8) Barrett JFR, Whittaker PG, Williams JG, Lind T. Absorption

- of nonhaem iron from food during normal pregnancy. *BMJ* 1994; 309: 79-82
- 9) Long PJ. Rethinking iron supplementation during pregnancy. *J Nurse Midwifery* 1995; 40(1): 36-40
- 10) Scholl TO. High third-trimester ferritin concentration: associations with very preterm delivery, infection, and maternal nutritional status. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 161-166
- 11) Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, Ha EH. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 2005; 19: 487-492
- 12) Atamer Y, Kocyigit Y, Yokus B, Atamer A, Erden AC. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 119(1): 60-66
- 13) Vanderlelie J, Venardos K, Clifton L, Gude NM, Clarke FM, Perkins AV. Increased Biological Oxidation and Reduced Antioxidant Enzyme Activity in Pre-eclamptic Placentae. *Placenta* 2005; 26: 53-58
- 14) Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644(2-3): 169-177
- 15) Motoyama S, Saito S, Saito R, Minamiya Y, Nakamura M, Okuyama M, Imano H, Ogawa J. Hydrogen peroxide-dependent declines in Bcl-2 induce apoptosis in hypoxic liver. *J Surg Res* 2003; 110(1): 211-216
- 16) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951
- 17) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
- 18) Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478
- 19) Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126
- 20) Kochanowski BA, Sherman AR. Iron status of suckling rats as influenced by maternal diet during gestation and lactation. *Br J Nutr* 1983; 49(1): 51-57
- 21) Southon S, Wright AJ, Fairweather-Tait SJ. The effect of differences in dietary iron intake on ⁵⁹Fe absorption and duodenal morphology in pregnant rats. *Br J Nutr* 1989; 62(3): 707-717
- 22) Finch CA, Huebers HA, Miller LR, Josephson BM, Shepard TH, Mackler B. Fetal iron balance in the rat. *Am J Clin Nutr* 1983; 37(6): 910-917
- 23) Sochaski MA, Bartfay WJ, Thorpe SR, Baynes JW, Bartfay E, Lehotay DC, Liu PP. Lipid peroxidation and protein modification in a mouse model of chronic iron overload. *Metabolism* 2002; 51(5): 645-651
- 24) Lin WJ, Kirksey A. Effects of different levels of dietary iron on pregnancy superimposed upon growth in the rat. *J Nutr* 1976; 106: 543-554
- 25) Tran T, Wax JR, Philput C, Steinfeld JD, Ingardia CJ. Intentional iron overdose in pregnancy management and outcome. *J Emerg Med* 2000; 18(2): 225-228
- 26) Van den Broek N. Anemia and micronutrient deficiencies. *Br Med Bull* 2003; 67: 149-160
- 27) Kang BH, Son HY, Ha CS, Lee HS, Song SW. Reference Values of Hematology and Serum Chemistry in Krc: Sprague-Dawley Rats. *Korean J Lab Anim Sci* 1995; 11(2): 141-145
- 28) Nair KM, Bhaskaram P, Balakrishna N, Ravinder P, Sesikeran B. Response of hemoglobin, serum ferritin, and serum transferrin receptor during iron supplementation in pregnancy: A prospective study. *Nutrition* 2004; 20(10): 896-899
- 29) Lee JI, Kang SA, Kim SK, Lim HS. A cross sectional study of maternal iron status of Korean women during pregnancy. *Nutr Res* 2002; 22(12): 1377-1388
- 30) Cogswell ME, Parvanta I, Ickes L, Yip R, Brittenham GM. Iron supplementation during pregnancy, anemia, and birth weight: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 773-781
- 31) Sherman AR, Moran PE. Copper metabolism in iron-deficient maternal and neonatal rats. *J Nutr* 1984; 114(2): 298-306
- 32) Bashiri A, Burstein E, Sheiner E, Mazor M. Anemia during pregnancy and treatment with intravenous iron: review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110: 2-7
- 33) Bresgen N, Jaksch H, Lacher H, Ohlenschlager I, Uchida K, Eckl PM. Iron-mediated oxidative stress plays an essential role in ferritin-induced cell death. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 1347-1357
- 34) Templeton DM, Liu Y. Genetic regulation of cell function in response to iron overload or chelation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619(2): 113-124
- 35) Khan MF, Wu X, Tipnis UR, Ansari GA, Boor PJ. Protein adducts of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal in livers of iron loaded rats: quantitation and localization. *Toxicology* 2002; 173(3): 193-201
- 36) Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J Nutr* 2000; 130(3): 621-628
- 37) Srigiridhar K, Nair KM. Iron-deficient intestine is more susceptible to peroxidative damage during iron supplementation in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(6): 660-665
- 38) Brady HJ, Gil-Gomez G. Bax: the pro-apoptotic Bcl-2 family member. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(6): 647-650