

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001756-01

한식재료(천일염과 죽염)의 인슐린 저항성 개선 원인 구명과

Alzheimer's disease 예방 효과

(Improvement of insulin resistance and prevention of
Alzheimer's disease by Korean cuisine materials(solar salts
and bamboo salt))

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한식재료(천일염과 죽염)의 인슐린 저항성 개선 원인 구명과 Alzheimer's disease 예방 효과에 관한 연구”에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012년 12월 29일

목 포 대 학 교

연 구 진

연구기관명 : 목포대학교

연구책임자 : 함 경 식

책임연구원 : 함 경 식

연 구 원 : 사오라야

연 구 원 : 진 따 나

연 구 원 : 황 장 준

연 구 원 : 주 금 예

연 구 원 : 나 혜 리

연구기관명 : 목포대학교

책임연구원 : 조 정 용

연 구 원 : 박 선 영

연 구 원 : 키 티 풍

연 구 원 : 박 경 희

요 약 문

I. 제 목

한식재료(천일염과 죽염)의 인슐린 저항성 개선 원인 구명과 Alzheimer's disease 예방 효과에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 제 2형 당뇨병은 체내 각 조직에서 미토콘드리아의 기능 장애(mitochondrial dysfunction)와 endoplasmic reticulum stress로부터 유발된다고 보고되고 있다. 본 연구팀의 선행 연구에서, 국내산 천일염은 기존 암염, 정제염 등의 일반소금에 비해 oxidative stress를 줄여주고 insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation (pIRS1^{ser307})형성을 억제하여 인슐린 저항성을 개선하는 효과가 있음을 밝혔다. 따라서 본 연구 사업에서는 한식세계화 소재 중 하나인 천일염의 우수성을 홍보하기 위하여 천일염의 인슐린 저항성 개선 효과와 미토콘드리아 기능 장애, endoplasmic reticulum stress와의 연관성을 밝히고자 하였다.

또한 새로 발견된 신호전달물질인 황화수소(H₂S)가 알츠하이머병의 원인인 Aβ₄₂ 생성 효소를 저해한다고 보고되고 있다. 최근 본 연구팀은 죽염이 H₂S를 생성하고, 그 효과는 ATP-sensitive K⁺ channel의 활성화를 통해서임을 밝혔다. 그래서 본 연구 사업에서는 죽염의 Alzheimer's disease 예방 및 뇌 건강 기능성을 밝히고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제 1세부과제: 천일염의 인슐린 저항성 개선 원인 구명

- 동물모델(정상쥐)에서 국내산 천일염이 인슐린 신호전달에 미치는 영향
- 산화적 스트레스에 관여하는 인자들의 발현 조사
- 천일염이 mitochondrial dysfunction에 미치는 영향
 - Flow cytometry에 의한 mitochondrial membrane potential 측정
- 전자전달계의 oxidative phosphorylation (OXPHOS)에 관여하는 유전자들의 발현 조사
- ATP 함량, ROS 산물 조사
- 대사체 분석(metabolomic analysis):

- 소금 종류에 따라 변하는 대사물질의 차이 구명
- 미토콘드리아의 에너지 대사와 지방산 대사물질변화 조사

제2세부과제: 죽염 섭취가 Alzheimer's disease 예방 및 뇌 건강에 미치는 영향

- 죽염의 종류에 따른 황화수소 생성 조사
- 동물모델(정상쥐)에 죽염이 Alzheimer's disease에 미치는 영향
 - Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1 (BACE-1)의 발현
 - APP (Amyloid Precursor Protein) 발현
 - Aβ1-42 생성조사
- 뇌 건강에 미치는 영향 조사
 - Neuroinflammation 관련 인자의 함량 조사
 - 뇌에서 산화적 스트레스 관련 인자의 발현 조사

연구개발의 내용	연구범위
<p>▶ 국내산 천일염의 인슐린 저항성 개선 원인 구명</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 동물모델(정상쥐)에서 국내산 천일염이 인슐린신호 전달에 미치는 영향 ○ 천일염이 mitochondrial dysfunction에 미치는 영향 ○ 전자전달계의 oxidative phosphorylation (OXPHOS)에 관여하는 유전자들의 발현 조사 ○ 산화적 스트레스에 관여하는 인자들의 발현 조사 ○ 대사체 분석(metabolomic analysis)에 의한 소금 종류에 따라 대사물질의 차이 구명(미토콘드리아의 에너지 대사와 지방산 대사물질) 	<p>동물실험에 의해 기존 일반소금에 비해 천일염의 인슐린 저항성 개선 원인 구명에 있어서 mitochondrial dysfunction에 대한 천일염의 건강기능성 평가</p>
<p>▶ 죽염의 뇌 건강 기능성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 죽염의 종류에 따른 미네랄 성분 및 황화수소 생성 조사 ○ 정상쥐에서 죽염이 Alzheimer's disease 예방에 미치는 영향 ○ 뇌에서 산화적 스트레스 및 inflammation에 미치는 영향 	<p>동물실험에 의해 소금 섭취로부터 오는 대사성 질환 예방 효과에 있어 뇌에서 죽염의 Alzheimer's disease 예방 및 neuroinflammation 억제에 대한 기능성 평가</p>

IV. 연구개발결과

1. 천일염의 인슐린 저항성 개선 원인 구명

인슐린 저항성은 미토콘드리아 내에서 산화적 인산화 관련 효소들의 발현량 감소, 미토콘드리아의 크기와 양 감소, ATP 생성량 감소, ROS 증가 등 미토콘드리아의 기능 장애와 밀접한 관계가 있다고 보고되고 있다. 과도한 소금 섭취로부터 오는 인슐린 저항성은 아마도 미토콘드리아의 기능 장애로 인한 것으로 시사되었다. 또한 과도한 소금 섭취는 인슐린 저항성을 생기게 하여 제 2형 당뇨병을 유발한다고 잘 알려져 있다. 본 연구팀은 미네랄이 함유된 소금 섭취는 미네랄이 거의 없는 일반소금에 비해 인슐린 저항성을 줄여 주는 효과를 밝힌 바 있다. 그래서 천일염의 인슐린 저항성 개선 효과와 미토콘드리아 기능 장애, endoplasmic reticulum stress와의 연관성을 밝히고자, 동물실험에서 인슐린신호전달, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress 및 산화적 스트레스에 관여하는 인자들을 조사하고, 에너지에 관련된 대사체(metabolites)을 조사하였다.

미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 없는 일반소금보다, 미네랄이 풍부한 천일염보다는 자죽염이 더 좋은 포도당 부하 내성 결과를 나타냈다. 또한 고염을 섭취시킨 각 식이군들은 대조군에 비해 상대적으로 낮은 IRS-1의 발현량을 나타냈으나 자죽염(PBS)과 미네랄이 풍부한 천일염(SS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 높은 IRS-1의 발현량을 나타냈다. 본 연구팀의 선행 연구에서는 과도한 소금 섭취가 근육조직이나 지방조직에서 IRS-1의 serine이 인산화된 pIRS1^{Ser307}의 함량이 높았는데 이 결과와 유사한 경향을 보였다. 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 IRS-1 발현량이 높았던 것은 아마도 과도한 소금의 섭취로부터 오는 pIRS1^{Ser307}과 같은 IRS-1의 변형이 적었던 것으로 시사되었다. 그러나 근육조직에서 과도한 소금 섭취로부터 오는 산화적 스트레스로 인해 생성된 지질 혹은 단백질 산화물 함량은 소금의 종류 간의 현저한 차이를 보이지 않아 본 연구팀의 선행 연구 결과와 다소 차이를 보였다. 과도한 소금 섭취는 인슐린 저항성을 유발시키지만 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 인슐린 저항성을 줄여 주는 효과가 있음이 재차 확인되었다.

미토콘드리아의 기능 장애와 관련된 인자들의 경우에 있어서, MitoProbeTm JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide) assay kit를 이용하여 유세포분석기(flow cytometer)로 미토콘드리아의 막전위(membrane potential)를 분석하였다. JC-1은 membrane potential sensitive probe로 살아있는 세포에서 membrane potential-dependent하게 세포내로 침투되어 J-aggregates가 되어 red fluorescence ($\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$)를 갖는다. 그러나 미토콘드리아 막전위가 depolarization 되고 있는 경우는 JC-1이 미토콘드리아내로 들어가지 못하고 monomer 상태를 유지하게 되어, green fluorescence ($\lambda_{em} = 527 \text{ nm}$)를 갖게 된다. 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)과 자죽염식이군(PBS)는 대조군과 유사

한 JC-1의 집합체 형태를 즉 red fluorescence 값이 높았으나 미네랄이 없는 일반 소금식이군(RS)은 대조군에 비해 넓게 분산된 JC-1의 단량체 형태가 관찰되고 red fluorescence 값이 적은 것이 관찰되었다. 즉 미네랄이 풍부한 천일염과 죽염은 미네랄이 없는 소금에 비해 미토콘드리아의 막내 전위차가 높은 것을 관찰하였다. 또한 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 크기도 막내 전위차와 유사한 경향을 보였으나 ATP 생성량의 경우는 유의적 차이를 보이지 않았다. 또한 과도한 소금 섭취는 ROS 생성을 증가시켰으나 소금의 종류에 따라 ROS 생성량은 차이를 보였다. 즉 미네랄이 풍부한 천일염과 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 ROS 생성이 적었다. 본 연구에서 보고자 했던 oxidative phosphorylation에 관여하는 단백질들 (Complex IV의 cytochrome c oxidase subunit I and III)의 발현량에 대한 실험은 단백질이 적은 양이 관찰되어 비교하기가 어려웠다. 아마 이 들이 막단백질로서 적은 양이 존재하여 그런 것이 아닌가 생각되며 현재 추가 분석 중에 있다. 과도한 소금 섭취는 미토콘드리아의 막내 전위차에 손실을 주고 크기도 줄어들며 또한 ATP 생성량은 줄어들고 ROS 생성량을 증가시켜 미토콘드리아의 기능 장애를 생기게 하는 것으로 해석되었다. 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 기능 장애에 미치는 영향에 다소 차이를 보였다. 현재의 결과만으로 미네랄이 풍부한 천일염과 자죽염이 일반소금에 비해 미토콘드리아의 기능 장애를 줄여 준다고 단정할 수 없다. 이에 대한 현저한 차이를 입증하기 위해서는 현재 고염 식이 기간보다 매우 긴 장시간 식이를 통한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

또한 미네랄이 없는 일반소금(PS), 미네랄이 풍부한 천일염(SS), 죽염 (PBS)을 4주 동안 섭취시킨 정상쥐로부터 얻어진 뇌와 근육조직을 대상으로 대사체 분석을 실시하였다. 뇌의 대사체 분석 결과에서는 소금의 종류 간에 유의적으로 분리가 되는 것으로 보아 대사에 있어서 차이가 있음을 알 수 있었다. 이 중 소금의 종류에 따라 유의적으로 차이가 있는 13종의 대사체들은 cytosine, formylmethionine, hippuric acid, homocysteine, methionine, methylcytosine, methylhistidine, oxoglutaric acid, phenylalanine, thymine, tryptophan, uridine, xanthurenic acid로 동정되었다. 이 중 cytosine, formylmethionine, homocysteine, methylcytosine, phenylalanine, tryptophan, uridine, xanthurenic acid의 함량은 미네랄이 없는 일반 소금식이군에 비해 죽염식이군이 낮았으며 미네랄이 풍부한 천일염식이군은 cytosine, methylcytosine, uridine만 그 함량이 줄었다. 반면에 hippuric acid와 thymine인 경우 자죽염식이군이 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 다소 증가하였다. 특히 소금에 민감한 동물 모델에서는 신장손상의 지표가 되는 creatinine 함량에 있어서 소금종류에 따라 뚜렷한 차이가 관찰되었는데 이번에 정상동물 모델에서는 소금 종류에 따른 차이가 관찰되지 않았다. 근육조직의 대사체 분석 결과

에서는 오줌과 같이 많은 대사체가 관찰되지 않았으며 또한 소금의 종류 간에 확연한 차이는 관찰되지 않았으나 두 그룹 간 비교에서 PS와 SS 그룹 간 유의적으로 차이가 확인되었다. 소금의 종류에 따라 유의적으로 차이가 있는 대사체들은 현재 동정 중에 있다.

2. 죽염 섭취가 Alzheimer's disease 예방 및 뇌 건강에 미치는 영향

새로운 신호전달물질로 밝혀진 황화수소를 생성하는 자죽염이 일반소금에 비해 Alzheimer's disease에 어느 정도 영향을 주는지 알아보고자, 자죽염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 뇌 조직을 대상으로 Alzheimer's disease의 주요 원인 중 하나로 알려진 Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거에 관여하는 인자들을 조사하고 산화 스트레스에 관여하는 인자들을 조사하였다. 그 결과, 자죽염식이군은 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 amyloid beta 펩타이드 생성에 관여하는 BACE-1의 발현량이 현저하게 낮았으며, 그 생성물인 A β 1-42 함량도 매우 낮았다. 또한 amyloid beta 펩타이드 제거에 관여하는 RAGE와 LRP1의 발현량을 조사하였을 때 혈액에서 blood-brain barrier(BBB)를 통과하여 뇌로 amyloid beta 펩타이드를 이동시켜 뇌에서 amyloid beta 펩타이드 함량을 증가시키는 RAGE는 자죽염 그룹에서 감소하고 거꾸로 뇌에서 BBB를 통과하여 혈액으로 Amyloid beta 펩타이드를 내보내 결과적으로 뇌에서 Amyloid beta 펩타이드 함량을 낮추어주는 LRP1 발현은 매우 낮음을 확인하였다. 자죽염식이군이 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 Amyloid β 함량이 낮았던 것으로 보아 그 제거에 관여하는 인자인 NEP와 IDE 발현량도 높을 것으로 예상되었으나 미네랄이 없는 일반소금식이군이 자죽염식이군에 비해 높았다. 이는 최근 대뇌에서 NEP와 IDE의 발현량은 Amyloid β 농도 의존적으로 증가한다는 보고와 일치하였다. 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 산화 스트레스로부터 오는 TNF- α 와 NF- κ B p65의 발현량도 유의적으로 낮았으며, 그 산화 생성물인 protein carbonyl 함량도 현저하게 낮았다.

본 연구 결과에서는 소금이 Alzheimer's disease 유발에 어느 정도로 영향을 주는지는 단정할 수 없다. 다만 소금의 종류에 따라 Alzheimer's disease 관련된 주요 인자 중 amyloid beta 펩타이드 생성에 영향을 줌을 확인하였다. 특히 본 연구에서 행해진 4주간 고염을 섭취시킨 정상쥐의 뇌 조직에서 미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 없는 소금에 비해 Amyloid beta 펩타이드 생성을 줄여주고 산화 스트레스를 줄여주는 긍정적인 영향을 줌을 알 수 있었다. 그러므로 소금이 Alzheimer's disease 관련된 주요 인자인 amyloid beta 펩타이드 생성에 어느 정도로 영향을 주는지에 대한 연구는 추후 수행되어야만 한다.

본 연구 수행에서 얻어진 매우 흥미로운 결과는 자죽염이 미네랄이 없는 일반소금에 비해 Alzheimer's disease에 관여하는 주요 인자인 Amyloid beta를 줄여주는 효과를 입증한 것이다. 특히 자죽염은 일반소금에 비해 산화 스트레스를 적게 주고, Amyloid beta 펩타이드 생성에 관여하는 인자인 BACE 발현을 억제할 뿐만 아니라 그 제거에 관여하는 RAGE는 낮추고 LRP1 발현을 높여 Amyloid beta 함량을 줄여주는 효과가 있음을 확인하였다. 특히 고염 식이에 있어서 11주 식이가 4주 보다 소금의 종류에 따른 Amyloid beta 생성에 미치는 영향이 현저하였다. 그리고 황화수소는 Amyloid beta 생성에 직접적으로 관여하는 BACE1의 발현을 줄여주는 효과가 있다고 보고된 바와 같이, 황화수소를 생성하는 물질을 다량 함유하고 있는 자죽염의 Amyloid beta 생성 억제 효과는 황화수소가 주된 원인물질일 가능성이 강하게 시사되었다. 그러므로 우리는 소금을 매일 섭취하여야만 하는데, 장기간 소금 섭취에 있어서 자죽염 섭취는 기타 일반 소금에 비해 Alzheimer's disease을 예방하는데 더욱 효과가 있을 것으로 기대된다. 장기간 자죽염 섭취가 기타 일반 소금에 비해 amyloid β aggregation, acetylcholine 함량, neurofibrillary tangle에 얼마나 영향을 주는지 과학적으로 입증을 통해, 자죽염이 소금섭취로부터 오는 Alzheimer's disease를 줄여 주는 효과를 밝히는 연구가 추후 행해져야 할 것이다.

천일염과 이를 열처리하여 제조한 죽염과 같은 열처리소금은 한식의 맛을 내는 가장 기본 소재이다. 이들 소금이 세계에서 주로 섭취하고 있는 일반소금에 비해 건강에 이롭다는 사실이 입증되고 있으며 본 연구 결과에서도 Amyloid beta 생성을 줄여주는 효과를 입증하였다. 그러므로 이와 같은 천일염과 죽염을 한식 소재로 활용이 된다면 한식은 세계 다양한 음식과 차별화가 가능할 것으로 기대된다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과

1. Effects of purple bamboo salt on the expression of proteins related to Alzheimer's disease in Sprague Dawley rats/2012 International Symposium and Annual Meeting Quality of Life (QOL): Food Industry and Health (Page 430), 한국식품영양과학회, 2012. 10. 31-11. 02 (학술발표)
2. Effects of various salts on oxidative stress, blood pressure, and expression of proteins related to Alzheimer's disease/2012 International Symposium and Annual Meeting Quality of Life (QOL): Food Industry and Health, 한국식품영양과학회, 2012. 10. 31-11. 02 (학술발표)
3. Effects of mineral-rich sea salt and purple bamboo salt on insulin

resistance in Sprague-Dawley rats/ International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Food 2012(Page 159), ISNFF, 2012. 12. 1~6. Hawaii, USA.

4. 자죽염을 포함하는 알츠하이머병 예방용 조성물 및 자죽염의 제조 방법. 대한민국 출원 제10-2013-0007827호, 출원일 2013년 1월 7일 (특허출원)
5. 미네랄이 풍부한 천일염의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 천일염. 대한민국 출원 제 10-2013-0001576호, 출원일 2013년 1월 24일 (특허출원)

2. 성과 활용 계획

- 국내산 천일염의 인슐린 저항성 개선 구명 (SCI논문발표, 2013년)
- 동물실험에서 죽염의 Alzheimer's disease 예방 효과 (SCI논문발표, 2013년)
- 소금의 인슐린 저항성 개선 및 Alzheimer's disease 예방 효과 (교육지도 및 홍보, 2012년)

SUMMARY

(영문요약문)

1. Improvement of insulin resistance by Korean cuisine materials (solar salts and bamboo salt)

Recently we have investigated that mineral-rich solar sea salt (SS) have ability to keep blood pressure (BP) level lower and improve insulin resistance compared with mineral-deficient salt (RS). Moreover, purple bamboo salt (PBS) was more effective in improving BP level and insulin resistance compared to SS. However, the mechanisms of these effects were still not clear and need more study.

Glucose metabolism is largely dependent on mitochondria to generate energy in cells. More recent studies suggest that more defects in mitochondrial function might also play a role in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Therefore, in this study we have investigated effects of several salts on mitochondria dysfunction in Sprague Dawley (SD) rats. Rats were divided into four groups and fed with high salt (8% NaCl) diet (CON: normal diet, RS: reagent grade salt diet, SS: mineral-rich solar sea salt diet, and PBS: purple bamboo salt diet) for 4 weeks. A few day before surgery, urine was collected for 24 hr to do metabolomic analysis and oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed. Lipid and protein oxidations in plasma were measured using TBARS and PCOs assay. During surgery, skeletal muscles were collected, and muscle single cells were isolated. Mitochondria membrane potential, size (mass), ATP content, and ROS production were measured.

OGTT result showed that RS group had highest insulin resistance level compared to other groups. PBS group showed lower insulin resistance levels compared to SS group. SS group showed higher expression level of IRS1 than RS group but lower than PBS group. This result indicated that SS intake result in lower insulin resistance level compared with RS. Moreover, PBS group showed better effects on insulin resistance compared to other groups. SS and PBS groups showed lower lipid oxidation levels compared to RS group. And there were no significant difference between SS and PBS. Significant difference of PCOs contents among groups were not observed.

Mitochondria membrane potential were measured using JC-1, a lipophilic, cationic dye that can selectively enter into mitochondria, reversibly change color from green to red as the membrane potential increases. Cells were

stained with JC-1 and analyzed by flow cytometry. Relative red/green fluorescence ratio values were calculated. RS group showed lower red/green fluorescence ratio values compared to other groups, indicating lowest mitochondrial membrane potential among groups. CON, SS, and PBS groups showed similar level. Mitochondria size (mass) were detected by flowcytometer using MitoTracker green FM probe. SS and PBS groups showed high relative fluorescence intensity values compared to RS group, indicating that mitochondrial masses of SS and PBS groups were larger than that of RS group. ROS production were measured using Nitroblue tetrazolium (NBT) assay. NBT is reduced by ROS to a dark blue insoluble form of NBT called formazan and detected at 560 nm. Relative NBT reductions of SS and PBS groups showed lower value than that of RS group, but higher than CON group. ATP contents were measured by bioluminescence assay for quantitative determination of ATP using recombinant firefly luciferase and its substrate D-luciferin. CON group showed highest ATP content, SS and PBS groups showed lower contents than CON but higher than RS group. These results suggest that SS and PBS groups have ability to improve mitochondria dysfunction-induced insulin resistance compared to RS group, although statistically significant differences were not observed in this experiment.

2. Prevention of Alzheimer's disease by Korean cuisine materials (solar salts and bamboo salt)

Alzheimer's disease (AD) is characterized pathologically by aggregation of senile plaques that comprise beta amyloid peptide 40 ($A\beta$ 1-40) and 42 ($A\beta$ 1-42). $A\beta$ is generated from cleavage amyloid precursor protein (APP) by beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) and γ -secretase enzyme. Oxidative stresses and inflammation in brain induce BACE1 expression and generate $A\beta$. The $A\beta$ in brain can be cleared by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), receptor for advanced glycation end products (RAGE), insulin degrading enzyme (IDE), and neprilysin (NEP). Imbalance between $A\beta$ production and its clearance induces formation amyloid plaque in brain and leads to AD. Purple bamboo salt (PBS) is made from solar sea salt with bamboo by roasting above 1,000°C and exerts biological effects including antioxidant, anti-inflammation, and anticancer activities. The aim of this study was to investigate the effects of PBS on Alzheimer's disease using Sprague Dawley (SD) rats as a model system.

Sprague-Dawley (SD) rats were fed with high reagent salt diet (8% NaCl) (RS) and high purple bamboo salt diet (8% NaCl) (PBS) for 4 weeks. In

addition, rats were also fed RS and PBS for 11 weeks. We have measured BACE1, P65 NF- κ B, LRP1, RAGE, IDE, and NEP protein expressions by western blotting, A β (1-40), A β (1-42), and TNF- α levels were measured by ELISA,

In the animals fed high salt diets for 4 weeks, PBS and SS groups showed significantly decreased BACE1 protein levels in brains compared with RS group ($p < 0.05$) but A β levels had no significant differences ($p < 0.05$) among groups. The inflammatory markers TNF- α , and P65 NF- κ B were significantly decreased in PBS and SS groups compared with RS group ($p < 0.05$) while protein carbonyl contents as an oxidative stress marker showed no significant difference. The A β clearance related protein RAGE showed decreased levels in SS and PBS groups compared with RS group ($p < 0.05$), but LRP1 had no significant differences ($p < 0.05$).

In the animals fed high salt diets for 11 weeks, PBS group showed significantly decreased BACE1 protein and A β (1-42) levels in brain compared with RS group ($p < 0.05$) but A β (1-40) levels had no significant difference ($p < 0.05$). The TNF- α , P65 NF- κ B, and protein carbonyl contents significantly decreased in PBS group compared with RS group ($p < 0.05$). The A β clearance related protein RAGE also showed decreased level in PBS group compared with that in RS group ($p < 0.05$), The expression level of LRP1 was significantly increased in PBS group compared with that in RS group ($p < 0.05$). The NEP and IDE protein expression level was significantly decreased in PBS group compared with those in RS group ($p < 0.05$).

Our results showed that decreased levels of BACE1 and A β correlated with decreased levels of inflammatory markers TNF- α , p65 NF- κ B, and protein carbonyl content. This may be due to antioxidant and anti-inflammation effects of PBS. Previous study showed that hydrogen sulfide (H₂S) reduced mRNA and protein levels of BACE1 and led to decreased A β generation. Furthermore, PBS reduced A β concentration in brain by increasing transport of A β across the blood-brain-barrier from brain to blood through increased level of LRP1 or by decreasing transport of A β across the blood-brain-barrier from blood to brain through decreased level of RAGE. However, NEP and IDE expression levels at 11 weeks were increased in brain of RS group, which may be in response to the increased accumulation of A β in RS group. These results suggest that PBS is expected to be a potential dietary salt to reduce possibility of AD and inflammation of brain in long-term consumption.

CONTENTS

I. Improvement of insulin resistance by Korean cuisine materials (solar salts and bamboo salt)	1
1. Background	1
2. Research content	3
A. Animal experiment	3
B. Oral glucose tolerance test (OGTT)	3
C. Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS)	3
D. Protein carbonyl content (PCOs)	4
E. Skeletal muscle pretreatment	4
F. Mitochondrial membrane potential measurement	5
G. Mitochondrial membrane size measurement	5
H. ATP (adenosine triphosphate) content	5
I. ROS (reactive oxygen species) production	6
J. Western blotting	6
K. Statistical Analysis	7
L. Metabolomic analysis	7
1) Urine and muscle metabolites extraction	7
2) Metabolites analysis using UPLC-Q-TOF MS	7
3) Data Process	8
4) Statistical Analysis	8
3. Results and Discussion	10
A. Food intake, water intake, and body weight change	10
B. Effects of solar salt and purple bamboo salt on insulin signalling in Sprague Dawley (SD) rats	11
1) Oral glucose tolerance test (OGTT) result	11
2) Expression level of IRS1 in skeletal muscle	12
C. Effects of domestic solar salt and purple bamboo salt on oxidative stress in Sprague Dawley (SD) rats	13
1) Oxidized lipid products 함량 content	13
2) Protein carbonyl content	14
D. Effects of domestic solar salt and purple bamboo salt on mitochondrial dysfunction in Sprague Dawley (SD) rats	15
1) Mitochondrial membrane potential	16
2) Mitochondrial size	18
3) ATP content	19
4) ROS content	20
4) Expression of cytochrome c oxidase	21
E. Metabolomic analysis	22
1) Metabolomic analysis in urine of various salt fed rats	22

(a) Urine metabolite analysis	22
(b) Qualitative and quantitative analysis of urine metabolites	25
2) Metabolomic analysis in muscle of various salt fed rats	26
(a) Muscle metabolite analysis	26
II. Prevention of Alzheimer's disease by Korean cuisine materials (solar salts and bamboo salt)	31
1. Introduction	31
2. Materials and Methods	36
A. Material and chemical	36
B. Determination of H ₂ S content in various salts	36
C. Animal Experiment	37
D. Food and water intake and body weight	37
E. Western blotting	38
F. Determination of Amyloid beta level	39
G. Determination of TNF- α level	39
H. Measurement of TBARS level	39
I. Measurement of Protein carbonyl level	40
J. Statistical analysis	40
3. Results and Discussion	40
A. H ₂ S content in various salts	41
B. Brain sample collection by guillotine method	41
C. Effect of high purple bamboo salt diet fed rats for 4 weeks	42
1) Food and water intake and body weight	42
2) BACE1 protein expression levels	43
3) Amyloid β content	43
4) RAGE protein expression levels	45
5) LRP1 protein expression levels	45
6) Protein carbonyl content	47
7) TNF- α level	48
8) NF- κ B protein expression levels	49
D. Effect of high purple bamboo salt diet fed rats for 11 weeks	52
1) Food and water intake and body weight	52
2) BACE1 protein expression levels	52
3) Amyloid β content	52
4) RAGE protein expression levels	55
5) LRP1 protein expression levels	56
6) Protein carbonyl content	57
7) TNF- α level	59
8. NF- κ B protein expression levels	59

목 차

제 1장 천일염의 인슐린 저항성 개선 원인 구명	1
1. 연구의 필요성	1
2. 연구내용	3
가. 동물실험	3
나. 포도당 내성 검사 (Oral Glucose Tolerance Test ; OGTT)	3
다. 혈중 지질과산화물 (Thiobarbituric Acid Reactive Substance, TBARS) 함량 측정 ..	3
라. 단백질 카르보닐화 화합물 (PCOs) 함량 측정	4
마. 근육조직(골격근, skeletal muscle)의 전처리	4
바. Mitochondrial membrane potential 측정	5
사. Mitochondrial membrane size 측정	5
아. 세포내 ATP (adenosine triphosphate) 함량 측정	5
자. ROS (reactive oxygen species) 생성 측정	6
차. Western blotting	6
카. 통계처리	7
타. 대사체분석	7
1) 뇨와 근육으로부터 metabolites 추출	7
2) UPLC-Q-TOF MS를 이용한 대사체 분석	7
3) Data Process	8
4) 통계분석	8
3. 결과 및 고찰	
가. 식이섭취량, 물섭취량, 그리고 체중 변화	0
나. 정상쥐에서 국내산 천일염과 자죽염이 인슐린 신호전달에 미치는 영향	11
1) 포도당 부하 내성 검사 결과	1
2) 근육 조직에서 pIRS1의 발현량	2
다. 정상쥐에서 국내산 천일염과 자죽염이 산화 스트레스에 미치는 영향	3
1) Oxidized lipid products 함량	13
2) Protein carbonyl 함량	14
라) 정상쥐의 근육조직에서 국내산 천일염과 자죽염이 mitochondrial dysfunction에 미치는 영향	15
1) 미토콘드리아의 막내 전위차	6
2) 미토콘드리아의 크기	8
3) ATP 생성량	9
4) ROS 함량	20
5) Cytochrome c oxidase 발현량	20
마) 대사체 분석(metabolomic analysis)	21
1) 다양한 소금 섭취 쥐의 뇨 대사체 분석	2
(가) 뇨 대사체 분석	21
(나) 다양한 소금 섭취 쥐 뇨 대사체의 정성 정량 분석	42
2) 다양한 소금 섭취 쥐의 근육 대사체 분석	8
(가) 근육 대사체 분석	8
제 2장 죽염 섭취가 Alzheimer's disease 예방 및 뇌 건강에 미치는 영향	31

1. 연구의 필요성	31
2. 연구내용	36
가. 재료 및 시약	36
나. 황화수소 함량 측정	36
다. 실험동물	37
라. 체중, 물 섭취량, 식이 섭취량 측정	37
마. Western blotting에 의한 뇌에서 단백질 발현량 측정	38
바. Amyloid beta 함량 측정	39
사. TNF- α 함량 측정	39
아. 지질과산화물 함량 측정	39
자. 단백질 카르보닐화 화합물(PCOs) 함량 측정	40
차. 통계처리	40
3. 결과 및 고찰	40
가. 소금의 종류에 따른 황화수소 함량 확인	4
나. Guillotine에 의한 뇌 수집 방법 확립	41
다. 4주간 고염을 섭취시킨 정상쥐에서 죽염이 Alzheimer's disease 및 뇌 건강에 미치는 영향	42
1) 식이섭취량, 물섭취량, 그리고 체중 변화	4
2) Amyloid β 의 생성에 관여하는 인자들에 미치는 영향	4
가) BACE-1 (β -secretase)의 발현량 비교	4
나) Amyloid β 의 함량	4
3) Amyloid β 의 제거에 관여하는 인자들에 미치는 영향	4
가) RAGE의 발현량 비교	4
나) LRP1의 발현량 비교	4
4) 산화 스트레스에 미치는 영향	4
가) Protein carbonyl 함량	47
나) TNF- α 함량	4
다) NF- κ B 발현량	4
라. 11주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐에서 자죽염이 Alzheimer's disease 및 뇌 건강에 미치는 영향	52
1) 식이섭취량, 물 섭취량, 그리고 체중 변화	3
2) Amyloid β 의 생성에 관여하는 인자들에 미치는 영향	25
가) BACE-1 (β -secretase)의 발현량 비교	25
나) Amyloid β 의 함량	33
3) Amyloid β 의 제거에 관여하는 인자들에 미치는 영향	5
가) RAGE의 발현량	5
나) LRP1의 발현량 비교	6
다) NEP와 IDE의 발현량 비교	6
4) 산화 스트레스에 미치는 영향	7
가) Protein carbonyl 함량	57
나) TNF- α 함량	9
다) NF- κ B 함량	9

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 한식재료(천일염과 죽염)의 인슐린 저항성 개선 원인 구명과 Alzheimer's disease 예방 효과 (영문) Improvement of insulin resistance and prevention of Alzheimer disease by Korean cuisine materials(solar salts and bamboo salt)		
연구 기관	목포대학교	연구	(소속) 식품공학과
참여 기관	-	책임자	(성명) 함 경 식
연구 비	계	130,000천원	총 연구 기간
참여 연구원	10 명 (연구책임자: 2명, 책임연구원: 0명, 연구원: 1명, 연구보조원 7명)		
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>최근 제 2형 당뇨병은 미토콘드리아의 기능 장애 (mitochondrial dysfunction)로부터 유발된다고 보고되고 있음. 본 연구팀의 선행 연구에 의하면, 국내산 천일염은 기존 암염, 정제염 등의 일반소금에 비해 oxidative stress를 줄여주고 insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation (pIRS1^{ser307})형성을 억제하여 인슐린 저항성을 개선하는 효과가 있음을 밝혔다. 따라서 한식세계화 소재 중 하나인 천일염의 우수성을 홍보하기 위하여 천일염의 인슐린 저항성 개선 효과와 미토콘드리아 기능 장애와의 연관성을 밝히는 것을 첫번째 목표로 함. 한편 새로 발견된 신호전달물질인 황화수소(H₂S)가 알츠하이머병의 원인인 Aβ₄₂ 생성 효소를 저해한다는 보고가 최근 있고 본 연구팀은 죽염이 H₂S를 생성하고, 그 효과는 ATP-sensitive K⁺channel의 활성화를 통해서임을 밝혔다. 따라서 죽염의 Alzheimer's disease 예방 및 뇌 건강 기능성을 밝히는 것을 두번째 목표로 함.</p> <p>○ 연구결과</p> <p>미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 좋은 포도당 부하 내성 결과와 높은 IRS-1의 발현량을 나타냈다. 또한 자죽염이 미네랄이 풍부한 천일염보다 좋은 결과를 나타냈다. 이는 본 연구팀의 선행 연구에서 보였던 결과와 유사하였다. 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 IRS-1 변형을 줄여 인슐린 민감도를 개선해주는 효과가 있음이 재차 확인되었다. 뇌와 근육조직의 대사체 분석 결과에서는 소금의 종류 간에 확연한 차이는 관찰되지 않았으나 소금의 종류에 따라 유의적으로 차이가 있는 대사체들을 일부 동정하였다. 또한 미네랄이 풍부한 천일염과 자죽염이 일반소금에 비해 미토콘드리아의 기능 장애를 줄여 주는지에 대하여는 통계적으로 유의적인 큰 차이가 보이지 않았으나 미네랄이 풍부한 천일염과 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 미토콘드리아의 막내 전위차의 손실과 ROS 생성량을 어느 정도 줄여 주는 것으로 나타나 미토콘드리아의 기능 장애를 줄여주는 것으로 해석되었다. 한편 자죽염의 Alzheimer's diseases 예방 효과에 있어서, 황화수소를 생성하는 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 Amyloid beta 생성에 관여하는 BACE-1의 발현을 억제하고, 그 생성물인 Aβ₁₋₄₂ 함량도 낮추는 효과를 나타냈다. 또한 Amyloid beta 펩타이드 제거에 관여하는 RAGE, LRP1, NEP, IDE의 발현에도 긍정적인 영향을 주었다. 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 뇌에서 산화 스트레스를 줄여 주었다. 자죽염 섭취는 미네랄이 없는 일반소금에 비해 Amyloid beta 생성을 줄여 주어 Alzheimer's diseases 예방에 효과가 있는 것으로 기대된다.</p> <p>○ 연구 성과 및 성과활용 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미네랄이 풍부한 천일염의 제조 방법 및 그 천일염. (특허출원) - 뇌 기능 개선 효과를 갖는 열처리소금(죽염) 제조 기술 (특허출원, 2013년) - 국내산 천일염의 인슐린 저항성 개선 구명 (SCI논문발표, 2013년) - 동물실험에서 죽염의 Alzheimer's disease 예방 효과 (SCI논문발표, 2013년) - 소금의 인슐린 저항성 개선 및 Alzheimer's disease 예방 효과 (교육지도 및 홍보) 			

제 1장 천일염의 인슐린 저항성 개선 원인 구명

1. 연구의 필요성

우리가 매일 섭취하는 소금은 우리 몸에서 혈압 조절, 영양소 운반, 신경 전달 등의 생리 기능을 하는 매우 중요한 성분이나, 과량 소금 섭취는 고혈압 및 당뇨의 주된 원인물질로 알려져 있다. 그래서 WHO/ISH에서는 성인의 소금 일일 섭취량을 5 g이하로, 2000년 Japanese Society of Hypertension에서는 7 g이하로 섭취할 것을 권장하고 있다. 또한 지나친 소금 섭취의 제한이 혈압, 심혈관 등에 관련된 근거가 부족하다는 상반된 의견도 있어 소금과 혈압의 상관관계에 관한 논쟁은 계속되고 있다. 최근 선행 연구의 보고에 의하면 일일소금 섭취량을 5 g으로 제한할 경우 이 보다 더 많은 양(12 g)을 섭취했던 것 보다 심혈관 질병에 의한 사망률이 높다고 보고된 바 있다.

우리가 매일 섭취하고 있는 소금은 암염, 천일염, 재제염, 정제염 등으로 분류되는데, 천일염을 포함한 전 세계에서 생산되는 99%의 소금은 미네랄이 없는 99%의 염화나트륨으로 구성되어 있다. 세계 소금 중 암염 다음으로 많이 생산되고 있는 천일염은 해수를 바람과 햇빛을 이용하여 증발시켜 만든 것으로, 해수의 일정 성분비에 따라 모든 소금이 거의 동일한 성분으로 이루어져 있을 것으로 추정된다. 그런데 우리나라와 프랑스 등의 몇몇 국가에서 생산하고 있는 천일염은 멕시코, 호주 등의 대규모 염전에서 생산되는 천일염과 달리 마그네슘, 칼슘, 칼륨 등을 포함한 다수의 미네랄 성분이 다량 존재하고 있음이 밝혀졌다.

농산물의 미네랄 함량 감소와 현대인의 스트레스 등의 여러 원인으로 미네랄 결핍 환자가 증가하고 있어 이를 보충해 줄 수 있는 식품으로 미네랄이 풍부한 소금에 대해 관심이 집중되고 있다. 특히 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 소금에 비해 건강 기능성이 우수하다는 사실이 밝혀지고 있다. 특히 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 소금에 비해 산화 스트레스를 적게 주고 인슐린 저항성과 혈압 상승을 줄여 주는 것으로 최근 밝혀졌다.

우리나라에서는 미네랄이 풍부한 천일염의 건강기능성이 우수하다는 인식이 확산되면서 소비 인구가 급속히 증가하고 있다. 미네랄이 풍부한 천일염

의 기능성에 대한 과학적 data가 보다 확보되어질 경우 우리나라의 천일염은 세계적인 자산이 될 것으로 여겨진다.

한편 우리 몸에서 당 대사와 관련된 주요한 조직은 인슐린을 분비하는 췌장(β -세포)과 당을 이용하는 근육 및 지방 등의 각 조직 내에서 미토콘드리아의 기능 장애가 제 2 당뇨병을 유발시킨다고 최근 보고되고 있다. 즉, 췌장의 β -세포에서 미토콘드리아의 산화적 인산화 기능 장애(oxidative phosphorylation, OXPHOS)는 ATP/ADP 비의 감소로 인해 당 자극으로부터 유도되는 인슐린이 분비되지 않아 말초조직에서 당을 이용하지 못하여 당뇨가 유발된다고 하였다. 또한 근육조직에서의 경우 미토콘드리아의 지방산 β 산화 기능 장애는 fatty acid CoA, diacylglycerol, 그리고 ceramide와 같은 지방 대사산물들의 함량이 증가되는데, 이 물질들은 serine/threonine kinase들을 활성화시키는 물질들의 존재 하에 insulin receptor substrate-1의 serine phosphorylation을 증가시켜 인슐린 신호 전달에 관여하는 인자들(PI 3-kinase, AKT, GLUT4)을 저해하여 혈액으로부터 당 흡수를 억제시켜 인슐린 저항성과 함께 당뇨병을 유발시킨다. 그리고 지방조직에서 미토콘드리아의 기능 장애는 adiponectin 수치를 감소시켜 인슐린의 민감성이 저하되어 당뇨병이 유발된다고 보고된 바 있다.

앞서 언급한 바와 같이 최근 본 연구팀은 천일염과 일반소금을 동물에 4주 동안 섭취시킬 때 천일염은 일반소금에 비해 insulin receptor substrate-1의 serine phosphorylation 생성을 줄여 인슐린 민감도를 개선하는 효과를 밝혔다. 즉 미네랄이 없는 일반소금은 근육조직에서 미네랄이 풍부한 천일염보다 인슐린 신호전달 단백질(IRS-1)에 변형이 더 발생한 것으로 보아 과량의 NaCl 섭취는 미토콘드리아의 지방산 β 산화 기능 장애에 크게 영향을 준 것으로 추측된다. 이와 반대로 미네랄이 풍부한 천일염은 동일한 NaCl 함량을 섭취하였다고 할지라도 천일염에 함유된 미네랄 성분들이 미토콘드리아의 지방산 β 산화 기능 장애에 미치는 영향이 적어 인슐린 저항성이 더 낮았던 것으로 시사되었다.

그러므로 다량의 NaCl 성분 이외에 미네랄이 함유된 소금 섭취는 미네랄이 거의 없는 일반소금에 비해 인슐린 저항성이 낮았던 점을 고려해 볼 때, 천일염에 존재하는 미네랄 성분들이 NaCl로부터 유발되는 미토콘드리아의 기능 장애를 더 줄여 줄 가능성이 강하게 시사되었다.

그래서 천일염의 인슐린 저항성 개선 효과와 미토콘드리아 기능 장애, endoplasmic reticulum stress와의 연관성을 밝히고자, 동물실험에서 항당뇨 및 인슐린 신호전달, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress 및 산화 스트레스에 관여하는 인자들을 조사하고, 에너지에 관련된 대사체(metabolites)을 분석하였다.

2. 연구내용

가. 동물실험

본 실험에 사용된 실험동물은 4주령의 Sprague Dawley (SD) rat 32마리를 다물사이언스(대전, 한국)로부터 구입하여, 케이지당 2마리씩 넣어 사육하였다. 사육환경은 온도 21~24℃, 습도 50~60%가 되도록 유지하였고, 명암은 12시간(day light 06:00~18:00)을 주기로 하여 1주일간 환경에 순화시킨 후 실험을 수행하였다. 실험군은 난피법에 의하여 대조군, 정제염군(RS), 천일염군(SS), 그리고 자죽염군(PBS)으로, 총 4개의 실험군(n=8)으로 분류하였다. 대조군은 일반식이(AIN-93G)를 실시하였고, 그 외 3개의 시료처리군은 AIN-93G를 기본으로 각각 8%의 정제염(RS), 천일염(SS) 및 자죽염(PBS)을 첨가하여 제조한 후, 4주간 물과 함께 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 4주간의 식이가 끝난 후 9주령에 희생하고 혈액과 근육조직에 대하여 생화학적 분석을 실시하였다.

나. 포도당 내성 검사 (Oral Glucose Tolerance Test ; OGTT)

포도당 내성 검사를 위해 시료식이 4주 후 12시간이상 절식시킨 후, 5% 포도당 용액(2 g/Kg)을 경구 투여한 다음, 0, 30, 60, 120, 그리고 180분 간격으로 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 혈당은 혈당측정기(지닥터, 녹십자, 한국)를 이용하여 측정하였다.

다. 혈중 지질과산화물 (Thiobarbituric Acid Reactive Substance, TBARS) 함량 측정

혈액로부터 분리한 혈장 100 μ L를 20% trichloroacetic acid (TCA) 500 μ L와 1 M thiobarbituric acid (TBA) 300 μ L에 혼합한 다음 90~95℃에서 20분간 반응시켰다. 이후 방랭한 반응용액을 n-butanol 800 μ L로 분배하고

원심 분리하여 malondialdehyde (MDA)-TBA 반응물이 함유된 *n*-butanol 층을 얻었다. 얻어진 *n*-butanol 층을 532 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 사용된 표준용액 malondialdehyde (MDA)으로 작성된 표준곡선을 이용하여 혈장에 함유된 MDA 함량을 구하였다.

라. 단백질 카르보닐화 화합물 (PCOs) 함량 측정

Protein carbonyl 함량은 Reznick 와 Packer (Methods In Enzymology, 1994) 등의 방법에 의해 측정하였다. 즉 10 mM DNPH의 2 M HCl 용액 100 μ L에 혈장에서 얻어진 단백질 2 mg을 가한 다음 상온 및 암실에서 1시간 동안 반응시켰으며 이때 15분 간격으로 교반하였다. 이 반응용액에 얼음으로 냉각시킨 10% trichloroacetic acid (w/v) 1 mL를 가하여 혼합한 다음 3000 \times g로 10 분 동안 원심분리 하였다. 얻어진 단백질 펠렛(pellet)을 ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) 용액 2 mL로 3회 반복하여 세척한 다음 이를 6 M guanidine hydrochloride (pH 2.3) 1.5 mL로 용해시켜 37 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 반응시킨 후 370 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도 값에 대한 DNPH의 molar extinction coefficient ($\epsilon = 2.2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)를 나누어 혈장에서의 protein carbonyl 함량으로 환산하였다.

마. 근육조직(골격근, skeletal muscle)의 전처리

각 식이군의 소포체 스트레스(Endoplasmic Reticulum Stress; ER stress)에 의한 mitochondrial dysfunction 정도를 비교하기 위하여 채취된 근육조직을 이용하여 single cell을 제조하였다. 즉 채취된 근육조직을 HBSS buffer (Hank's Balanced Salt Solution)를 가하여 지방, 힘줄, 근막 등을 제거한 다음 PBS (phosphate buffered saline, without CaCl_2 , MgCl_2)로 세척하였다. 세척한 근육조직을 단백질 분해효소인 콜라게네이즈(collagenase II, 500U/mL)와 CaCl_2 (250 mM)를 처리하여 1mm³ 크기로 절단한 뒤, 인큐베이터(37 $^{\circ}$ C, 1시간, 5% CO_2)에서 가수분해하였다. 가수분해된 근육 조직은 syringe plunger를 이용하여 가볍게 으깨고 PBS를 첨가하여 현탁하여 원심분리(400 \times g, 5 min)를 하였으며, 이를 3회 반복하여 단백질 분해효소를 완전히 제거하였다. 단백질분해효소가 제거된 조직에 PBS로

현탁시켜 cell strainer (40 μ m)로 여과한 다음, 얻어진 여액을 재차 원심분리(400 \times g, 5 min)시켜 single cell을 얻었다. 얻어진 single cell은 PBS를 현탁시켜 hemocytometer를 이용하여 cell counting하였다.

바. Mitochondrial membrane potential 측정

미토콘드리아의 membrane potential 측정은 JC-1 assay kit (Invitrogen, Molecular Probes, USA)를 이용하여 유세포분석기(Cytomics FC 500, Beckman Coulter, Inc., Germany)로 측정하였다. 즉 carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone(CCCP) 용액에 PBS로 현탁시킨 single cell을 혼합하여 배양기(37 $^{\circ}$ C, 5분, 5% CO₂)에서 1차 반응시킨 다음 JC-1 용액을 가하여 동일한 배양 조건에서 15분 동안 2차 반응을 시켰다. 이 반응 cell에 PBS를 가하여 세척한 후 원심분리(400g-force, 1분)하였다. 얻어진 cell을 PBS로 현탁시킨 다음 유세포분석기(excitation 488 nm, emission 529-590 nm)를 이용하여 미토콘드리아의 membrane potential를 측정하였다.

사. Mitochondrial membrane size 측정

미토콘드리아의 membrane size는 Mito Tracker Green FM (Invitrogen, Molecular Probes, USA)을 이용하여 유세포분석기(Cytomics FC 500, Beckman Coulter, Inc., Germany)로 측정하였다. 즉 각 식이군의 근육조직으로부터 얻어진 single cell을 원심분리(400 \times g, 5 min)한 다음, 분리된 cell에 PBS와 DMSO를 가한 다음 Mito Tracker Green FM probe에 혼합하여 5% CO₂ 배양기에서 37 $^{\circ}$ C로 10 min동안 반응시켰다. 이 반응 용액을 400 \times g로 5 min간 원심분리한 다음 얻어진 cell에 PBS로 현탁시킨 다음 유세포분석기(excitation 490nm, emission 516nm)를 이용하여 미토콘드리아의 membrane size를 측정하였다.

아. 세포내 ATP (adenosine triphosphate) 함량 측정

각 식이군의 ATP 함량은 ATP determination kit (Invitrogen, Molecular Probes, USA)를 이용하여 다표지생물시료측정장치(Wallac 1420 Victor3 V, PerkinElmer Life Sciences, US)에 의해 분석하였다. Luciferin과

luciferase가 포함된 standard reaction solution에 대한 ATP의 농도별 표준검정곡선을 그린 후, standard reaction solution과 각 식이군에서 만들어진 single cell과의 반응 값을 ATP 표준검정곡선에 의해 계산하였다.

카. ROS (reactive oxygen species) 생성 측정

각 식이군의 ROS 생성량은 Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma-Aldrich, USA)의 환원방법에 의해 측정하였다. 즉 근육조직의 single cell에 2% NBT가 함유된 DMEM을 처리한 다음 90분 동안 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 배양액에 100% acetic acid로 가하여 반응을 중지시킨 다음 12,000×g로 1분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 반응 cell에 50% acetic acid를 가하여 다음 UV/VIS spectrophotometer (HP-8452A, Hewlett Packard, Cheshire, UK)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 식이군의 ROS 생성량은 대조군에 대한 감소 비율로 나타내었다.

타. Western blotting

각 식이군의 근육조직을 lysis buffer [1% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NF, 10 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin, 10 mM Na₃VO₄ and 0.1 mg/ml aprotinin]로 homogenizing한 후, 4°C에서 2시간 동안 용해시켜 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 15 min)한 다음 상층액은 Bradford assay에 의해 단백질 함량을 정량하였다. 각 단백질 추출액을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane에 1시간 40분 동안 전이시켰다. 전이된 membrane을 3% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 0.05% Tween-20 (TBST) buffer에서 1시간 동안 blocking한 후, 인슐린신호전달에 관련된 단백질 분석을 위하여 primary antibody로 Anti-IRS-1 (rabbit polyclonal Ig G, Upstate, NY, USA)과 Anti-phospho-IRS-1 (Ser 307) (rabbit polyclonal Ig G, Upstate, NY, USA)에 처리하여 overnight 시켰다. Oxidative phosphorylation (OXPHOS)에 관여하는 단백질 분석의

primary antibody로는 COX1 (C-20) (goat polyclonal Ig G, Santa Cruz biotechnology, Inc., California, USA)와 COX3 (N-20) (goat polyclonal Ig G, Santa Cruz biotechnology, Inc., California, USA)을 처리하였고, mitochondrial dysfunction에 관여하는 단백질 분석에는 GRP78 (C-20) (goat polyclonal Ig G, Santa Cruz biotechnology, Inc., California, USA)를 처리하였다. Secondary antibody로 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Millipore, CA, USA)를 사용하여 1시간동안 반응시킨 후 luminol이 함유된 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액과 반응시켜 필름에 현상 했다.

카. 통계처리

본 실험결과의 통계처리는 SPSS(v 18.0)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 결과는 집단 간 차이는 One-way ANOVA와 사후검정 (Duncan's test)과 Independent samples t-test을 실시하였으며 이 때 분석 시 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하여 측정하였다.

타. 대사체분석

1) 뇨와 근육으로부터 metabolites 추출

소금의 종류를 달리하여 고염을 섭취한 실험동물의 뇨와 근육으로부터 대사물질들을 추출하여 본 실험에 사용하였다. 뇨는 0.1% sodium azide 200 μ L을 함유하고 있는 metabolic cage를 이용하여 24시간 동안 수집하였다. 시료의 normalization을 위해서 수집된 뇨는 동결건조한 후 다시 표준물질인 epicatechin이 함유된 distilled water (0.1% formic acid)로 녹인 후 원심분리하여 LC/MS로 분석하였다. 이때 사용한 뇨의 농도는 50 mg/mL이었다. 정상쥐에서 분리한 근육조직은 동결건조한 후 차가운 acetonitrile (ACN)로 혼합한 후 homogenizer로 추출하였다. 단백질을 침전시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 단백질이 제거된 시료를 건조시킨 후 표준물질 (caffeine과 4-acetoaminophenol)이 함유된 20% methanol 200 μ L로 다시 녹인 후 LC/MS로 분석하였다.

2) UPLC-Q-TOF MS를 이용한 대사체 분석

UPLC system (Waters, Milford, MA, USA)에 장착된 acquity UPLC BEH C18 column (2.1×50 mm, 1.7 μm; Waters)를 0.1% formic acid (FA)로 평행시킨 후 시료를 0.1% TFA를 함유한 ACN의 농도를 점진적으로 증가시키면서 유속 0.4 mL/min로 15분간 분리 분석하였으며 C18 column-UPLC로 분석되어 나온 eluent는 Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF) 질량분석기(Waters)로 분석하였다. Q-TOF는 ESI positive mode에서 분석하였으며, capillary와 sampling cone의 전압은 각각 3 kV와 30 V, desolation은 flow rate 700 L/h, 온도 300°C, source 온도는 110°C이다. TOF MS data는 scan time은 0.2 초, scan delay time 0.02 초에서 m/z 100-1000 범위에서 분석되었다. 분석의 정확도와 재현성을 높이기 위해 모든 분석에 200 pmole leucine-enkephalin (556.2771 Da in ESI positive mode)을 lack spray로 사용하였으며 quality control을 위해 모든 시료를 혼합한 시료를 10번 분석 때마다 한 번씩 분석하였다. 물질의 동정을 위해 10-30 eV의 collision energy ramp를 이용하여 MS/MS spectra를 얻었다. precursor와 fragment 이온들의 정확한 mass 값과 구성은 MassLynx 프로그램을 사용하여 계산하였으며 retention time, m/z, 이온 강도를 포함한 모든 MS data는 MarkerLynx (Waters, Milford, MA, USA)에서 분석하였다.

3) Data Process

노와 근육시료의 LC/MS data는 MarkerLynx 에 의해서 정렬되고 표준물질에 의해 normalization되었다. Peak는 5% 높이/1 초에서의 peak width, noise elimination 6, intensity threshold 50의 조건에서 collection되었으며 mass tolerance 0.04 Da, retention time window 0.15 조건에서 정렬되었다. 대사체의 동정은 authentic standards, elemental composition analysis software와 online-database [chemspider database (www.chemspider.com), human metabolome database(www.hmdb.ca), scripps center for metabolomics (<http://metlin.scripps.edu>)]를 이용하여 비교 분석하였다.

4) 통계분석

Data processing을 걸친 LC/MS data sets은 SIMCA-P+ version 12.0.1 (Umetrics, Umeå, Sweden)의 다변량 통계 분석 방법을 이용하여 분석되었다. 다변량 통계 분석 방법 중 partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) 방법이 사용되었으며 Hotelling's T² test는 PLS-DA로 분석된 data들 중 95% 신뢰구간에서 벗어나는 것들을 확인하기 위하여 사용되었다. PLS-DA models은 R²X, R²Y, Q²Y 세 parameter를 이용하여 분석된 모델의 quality를 측정하였다. 모델의 goodness는 R²X와 R²Y, 예측 가능성은 Q²Y 값으로 측정하며 모델의 validation을 위해 permutation test (n=200)를 갖는 7-fold cross validation이 PLS-DA models에 적용되었으며 모델의 신뢰성을 위해 p-value를 측정하였다. 시료 그룹간의 차이에 관여하는 대사체들을 찾기 위해서 VIP (variable importance in the projection) 값이 0.5이상인 모든 대사체들의 ion intensities는 one-way ANOVA를 이용하여 통계 분석하였으며 loading plot을 사용하여 차이에 관여하는 대사체를 시각화시켜줬다.

3. 결과 및 고찰

가. 식이섭취량, 물섭취량, 그리고 체중 변화

천일염(SS), 자죽염(PBS), 그리고 일반소금(RS)을 첨가된 고염(8% NaCl, w/w) 사료를 각각 정상쥐(Sprague-Dawley Dahl rat)에 4주 동안 섭취시켰다. 고염 식이동안 각 식이군 별 식이섭취량, 물섭취량, 그리고 체중 변화를 조사하였다. 그 결과(Table 1-1), 고염을 섭취한 식이군들의 경우 체중, 물섭취량, 그리고 식이 섭취량은 식이기간 동안 지속적인 증가하나 각 식이군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 고염 식이군은 대조군에 비해 물 섭취량은 높게 나타났다. 이는 선행 연구 결과와 유사하였다. 다만 선행 연구에서는 고염을 섭취하더라도 대조군과 유사하였으며, 정확한 이유는 알 수 없지만 선행 연구와 달리 체중은 고염 식이군이 대조군에 비해 높은 경향을 나타냈다.

Table 1-1. Changes of body weight, food intake, and water intake in rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks

Characteristic	Group	Diet period (week)				
		0	1	2	3	4
Body weight (g)	CON	144.4±2.2 ^{ns}	181.4±4.4 ^b	203.2±4.8 ^b	234.8±6.5 ^b	244.4±7.4 ^b
	RS	144.9±2.5	186.9±3.2 ^a	231.1±3.6 ^a	269.8±5.5 ^a	284.4±7.0 ^a
	SS	143.6±2.6	194.2±4.0 ^a	238.8±5.5 ^a	275.6±6.0 ^a	289.1±5.0 ^a
	PBS	144.0±2.5	194.6±3.7 ^a	239.2±4.7 ^a	280.2±5.8 ^a	295.3±6.8 ^a
Food intake (g/day)	CON	-	14.66±1.78 ^{ns}	14.14±0.86 ^{ns}	15.55±1.05 ^{ns}	15.50±1.74 ^{ns}
	RS	-	13.88±2.68	16.00±2.97	17.69±3.86	17.67±4.06
	SS	-	15.13±2.62	16.67±3.16	17.12±3.02	16.27±2.85
	PBS	-	15.45±2.79	16.81±3.05	17.54±3.04	17.32±3.48
Water intake (ml/day)	CON	-	24.47±0.86 ^b	35.27±0.78 ^b	35.09±0.87 ^b	27.35±1.60 ^b
	RS	-	66.08±4.32 ^a	72.54±5.06 ^a	72.31±5.98 ^a	69.93±5.70 ^a
	SS	-	70.32±4.35 ^a	75.63±5.11 ^a	72.82±4.79 ^a	71.11±4.54 ^a
	PBS	-	73.20±3.93 ^a	79.25±5.20 ^a	76.59±4.80 ^a	73.89±4.12 ^a

나. 정상쥐에서 국내산 천일염과 자죽염이 인슐린 신호전달에 미치는 영향
과다한 소금 섭취는 미토콘드리아의 기능 장애를 증가시키고 그로 인해 인슐린 저항성을 유발시키는 것으로 추정되었다. 본 연구팀의 선행 연구에 의하면, 소금의 종류에 따라 인슐린 저항성에 미치는 영향이 다르다는 사실을 밝혔다. 특히 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 천일염에 비해 인슐린 저항성을 줄여 주어 당뇨에 적게 영향을 준 것으로 시사되었다. 이러한 현상은 아마도 미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 없는 천일염에 비해 미토콘드리아의 기능 장애를 줄여 준 것으로 시사되었다. 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 기능 장애에 어느 정도 영향을 주는지 확인하고자 하였다. 그래서 미네랄이 풍부한 천일염(SS), 자죽염(PBS), 그리고 미네랄이 없는 일반소금(RS)을 각각 정상쥐(Sprague-Dawley Dahl rat)에 4주 동안 섭취시킨 다음, 포도당 부하 내성 검사 및 IRS-1의 발현량을 조사하였다.

1) 포도당 부하 내성 검사 결과

포도당 부하 내성 검사는 당뇨 진행 정도를 알 수 있는 지표 중 하나로, 체내 흡수된 포도당 이용율을 가늠할 수 있다. 그래서 미네랄이 풍부한 천일염(SS), 자죽염(PBS), 그리고 미네랄이 없는 일반소금(RS)을 각각 정상쥐(Sprague-Dawley Dahl rat)에 4주 동안 섭취시킨 다음, 포도당 부하 내성 검사를 실시하였다. 그 결과(Fig. 1-1), 대조군(Con)은 포도당 투여 후 30분에 최고 혈당 수치를 나타낸 다음 이후 지속적으로 감소하였으며, 고염을 섭취한 식이군들에 비해 포도당 투여 후 혈당이 빠르게 감소하는 경향을 보였다. 소금의 종류 간의 포도당 부하 내성 검사를 살펴보면, 자죽염식이군(PBS) > 천일염식이군(SS) > 일반소금식이군(RS)으로 나타났다. 이는 선행 연구에서 보였던 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 즉 고염 섭취가 그렇지 않은 소량의 소금 섭취보다 혈당이 서서히 감소하는 경향을 보여, 고염 섭취는 체내 포도당 이용율에 부정적인 영향을 줄을 재차 확인하였다. 또한 소금의 종류에 따라 포도당 부하 내성에 미치는 영향에 대해 그 차이가 있음을 재차 확인되었다. 미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 없는 일반소금보다 좋은 포도당 부하 내성 결과를 보였으며, 미네랄이 풍부한 천일염보다 자죽염이 더 좋은 포도당 부하 내성 결과를 나타냈다. 그러므로 자죽염이나 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 체내 각 조직에서 포도당

이용율에 영향을 적게 주는 것으로 해석되었다. 특히 과다 소금 섭취는 insulin receptor substrate-1의 serine phosphorylation 생성을 유도하여 인슐린 저항성을 생기게 하여 제2형 당뇨를 유발시킨다고 보고된 바 있다. 그러므로 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 insulin receptor substrate-1의 serine phosphorylation 생성을 줄여주고 인슐린 민감도를 개선함으로써 제2형 당뇨에 미치는 영향이 적을 것으로 해석되었다.

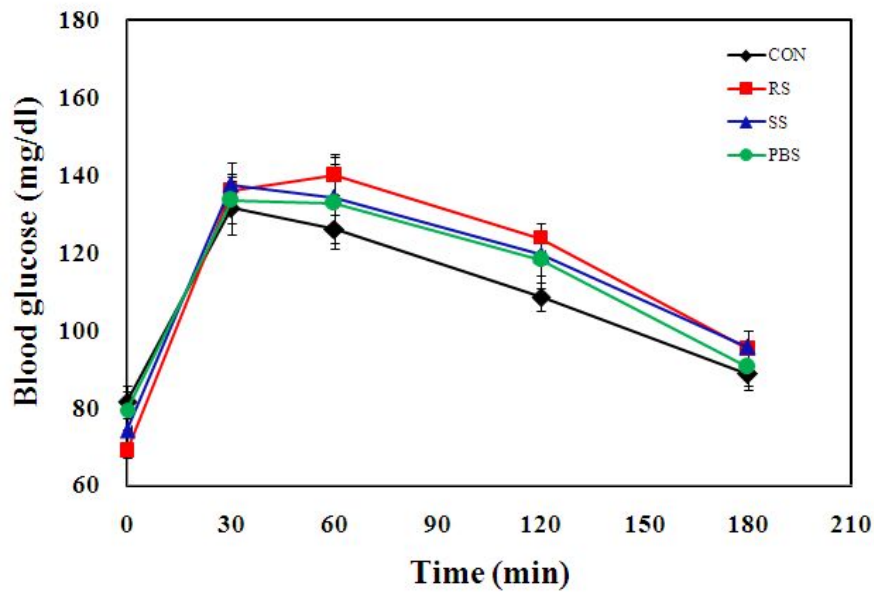


Fig. 1-1. Oral glucose tolerance test of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8).

2) 근육 조직에서 pIRS1의 발현량

본 연구팀의 선행 연구에 의하면, 과다한 소금 섭취는 인슐린신호전달에 있어서 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)의 serine를 phosphorylation (pIRS1^{ser307})화시켜 인슐린 신호전달을 저해함으로써 인슐린 저항성을 유발시킨다는 사실을 밝힌 바 있다. 또한 소금의 종류에 따라 pIRS1^{ser307}형성에 미치는 영향이 다르게 나타나는데, 미네랄이 없는 일반소금은 미네랄이 풍부한 천일염에 비해 IRS-1의 serine 인산화를 더욱 가속화시켰다. 그러므로 과다한 소금 섭취는 인슐린 신호전달에 있어서 IRS-1의 변형에 많은 영향을 주는 것으로 시사되었다.

그래서 미네랄이 없는 일반소금, 미네랄이 풍부한 천일염, 그리고 자죽염을 4주 동안 고염으로 섭취시킨 정상쥐의 근육조직을 대상으로 Western blotting에 의해 IRS-1의 발현량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 1-2), IRS-1의 발현량은 대조군에서 가장 높게 나타났으며, 고염을 섭취시킨 각 식이군들은 대조군에 비해 상대적으로 낮은 IRS-1의 발현량을 나타냈다. 이는 과도한 소금 섭취가 IRS-1의 변형을 유발시킨 것으로 해석되었다. 특히 본 연구팀의 선행 연구에서는 과도한 소금 섭취가 근육조직이나 지방조직에서 IRS-1의 serine이 인산화된 pIRS1^{Ser307}의 함량이 높았는데 이 결과와 유사한 경향을 보였다.

소금의 종류 간 IRS-1의 발현량을 살펴보면, 자죽염(PBS) > 미네랄이 풍부한 천일염(SS) > 미네랄이 없는 일반소금(RS) 순으로 낮았다. 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 IRS-1 발현량이 높았던 것은 아마도 과도한 소금의 섭취로부터 오는 pIRS1^{Ser307}과 같은 IRS-1의 변형이 적었던 것으로 시사되었다. 과도한 소금 섭취는 인슐린 저항성을 증가시키지만 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 인슐린 저항성을 줄여 주는 효과가 있음이 재차 확인되었다.

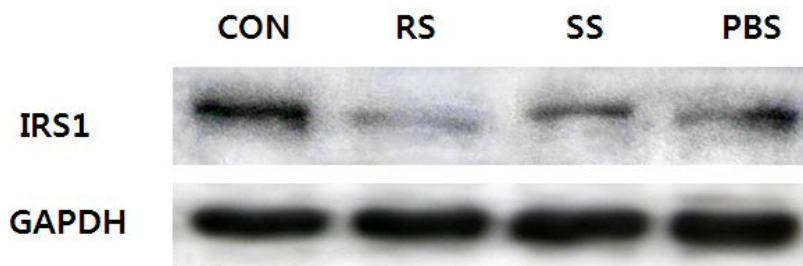


Fig. 1-2. Protein level of IRS1 in skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks.

다. 정상쥐에서 국내산 천일염과 자죽염이 산화 스트레스에 미치는 영향

1) Oxidized lipid products 함량

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐로부터 얻어진 혈장(plasma)을 대상으로 TBARS 방법을 이용하여 지질 산화물 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 1-3), 지질 산화물 함량은 자죽염식이군(PBS)과 미

네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)가 미네랄이 없는 일반소금에 비해 현저하게 낮았다 ($P < 0.05$). 이는 본 연구팀의 선행 연구에서 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 혈장, 근육조직, 그리고 지방조직에서 보였던 결과와 유사하였다.

2) Protein carbonyl 함량

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐로부터 얻어진 혈장(plasma)을 대상으로 protein carbonyl 함량을 조사하였다. 그 결과 (Fig. 1-4), 모든 식이군에서 유사한 protein carbonyl 함량을 나타냈으며 유의적인 차이는 관찰되지 않았다($P < 0.05$). 과도한 소금 섭취는 우리 몸에 산화 스트레스에 영향을 준다고 잘 알려져 있다. 본 연구팀의 선행 연구에 의하면, 과도한 소금 섭취가 혈장, 근육조직, 그리고 지방조직에서 높은 protein carbonyl 함량을 나타냈으나 본 연구 결과에서는 그 현저한 차이가 관찰되지 않았다.

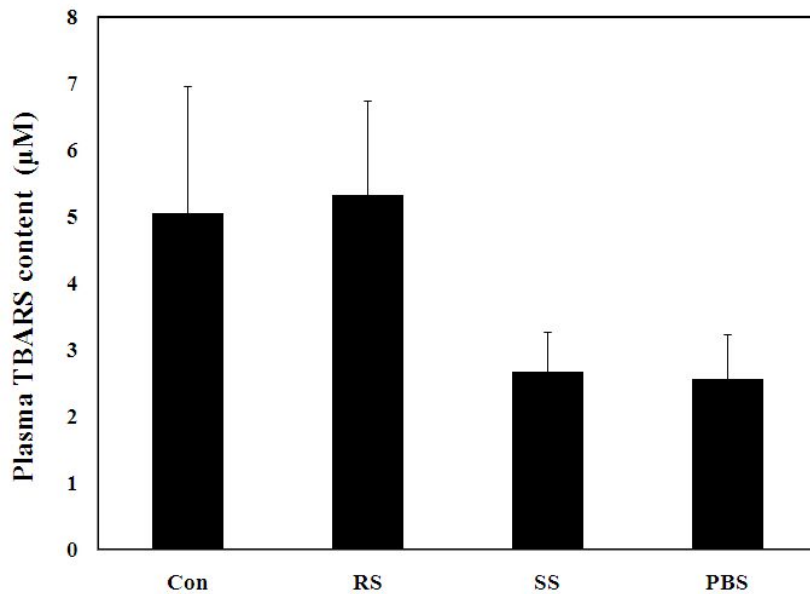


Fig. 1-3. TBARS content in the plasma of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8).

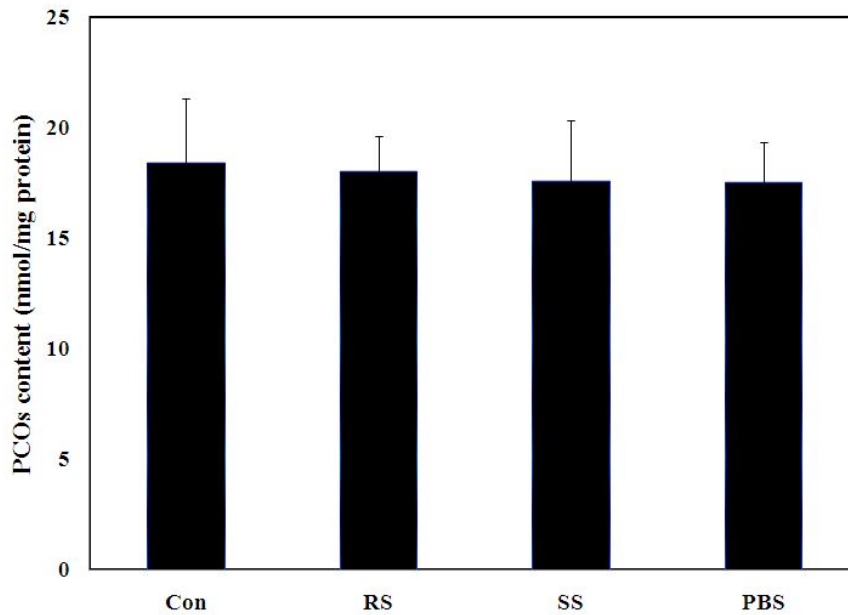


Fig. 1-4. Protein carbonyl content in the plasma of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8).

라) 정상쥐의 근육조직에서 국내산 천일염과 자죽염이 mitochondrial dysfunction에 미치는 영향

미토콘드리아는 세포내 ATP를 합성하는 중요한 기능과 동시에 신호전달, 세포분화, 세포사멸, 세포주기 및 세포성장의 조절 등 모든 대사에 관여하는 세포내 소기관이다. 미토콘드리아 내막에서 일어나는 전자전달계를 통해 complex I, III 및 IV는 H⁺을 미토콘드리아 밖으로 내보냄으로서 미토콘드리아 내막의 proton의 전위차를 유발하게 되고, 이 전위차를 이용하여 ATP synthase가 ATP를 생성하게 된다. 이 과정에서 활성산소(ROS, Reactive oxygen species)가 발생되기도 하는데, 이를 SOD (superoxide dismutase)와 glutathione 등의 항산화 방어시스템이 제거시켜 산화 스트레스를 줄여주어 항상성을 유지시킨다. 그러나 인슐린 저항성이 있을 경우, 미토콘드리아 내에서 산화적 인산화 관련 효소들의 발현량이 감소하고, 미토콘드리아의 크기나 양이 감소하며, ATP 생성량이 줄고, ROS가 증가하여 미토콘드리아의 기능 장애를 유발시킨다고 보고되고 있다. 과도한 소금 섭취로부터 오는 인슐린 저항성은 아마도 미토콘드리아의 기능 장애로 인한 것으로 시사되었다. 그래서 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 기능 장애에 얼마나 영향을 주

는지 알아보고자, 미네랄이 없는 일반소금, 미네랄이 풍부한 천일염, 그리고 자죽염을 4주 동안 고염으로 섭취시킨 정상쥐의 근육조직을 대상으로 미토콘드리아의 막위 전위차와 크기, ATP 생성, 그리고 ROS 생성량을 조사하였다.

1) 미토콘드리아의 막내 전위차

미토콘드리아의 내막 전위차 손실은 세포 사멸 초기 단계에 생기는데, 막 전위차 변화를 통해 세포 사멸이 얼마나 일어나고 있는지 그 정도를 예측할 수 있다. 즉 정상 세포에서는 막 전위차로 인해 미토콘드리아 내에 JC-1 dye가 들어가 집합체 형태로 나타난다. 그러나 막 전위차가 손실된 세포에서는 탈분극화 되는데, JC-1 dye는 단량체 형태로 바뀌면서 미토콘드리아 내에서 세포 전체로 분산되어져 관찰된다. 따라서 집합체와 단량체 형태에 따라 형광 파장이 달라지기 때문에 그 발광 정도의 차이를 이용하여 미토콘드리아의 막 전위차 손실 여부를 확인할 수 있다.

그래서 소금의 종류를 달리하여 고염을 섭취시켰을 때 정상쥐의 근육조직 내의 미토콘드리아의 내막 전위차에 어느 정도로 영향을 주지는 알아보고자, 미네랄이 없는 일반소금, 미네랄이 풍부한 천일염, 그리고 자죽염을 4주 동안 고염으로 섭취시킨 정상쥐의 근육조직으로부터 얻어진 single cell을 대상으로 JC-1 assay kit를 이용한 유세포분석기에 의해 미토콘드리아의 막내 전위차를 측정하였다. 그 결과, 정상 식이를 한 대조군(Con)의 근육 세포에서는 대부분 집합체 형태로 관찰되었다(Fig. 1-5). 그러나 소금 종류에 따라 JC-1의 집합체 형태는 대조군과 다르게 나타났다. 즉 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)은 대조군과 가장 유사한 집합체 형태를 나타냈으며, 그 다음으로는 자죽염식이군(PBS)이었다. 미네랄이 없는 일반소금식이군(RS)은 대조군에 비해 넓게 분산된 단량체 형태로 관찰되어 미토콘드리아의 막내 전위차 손실이 큰 것으로 해석되었다. 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 소금에 비해 미토콘드리아의 막내 전위차 손실을 줄여 주는 경향을 보였다. 그러나 각 식이군 간에 통계적으로 현저한 차이는 보이지 않았다(Fig. 1-6).

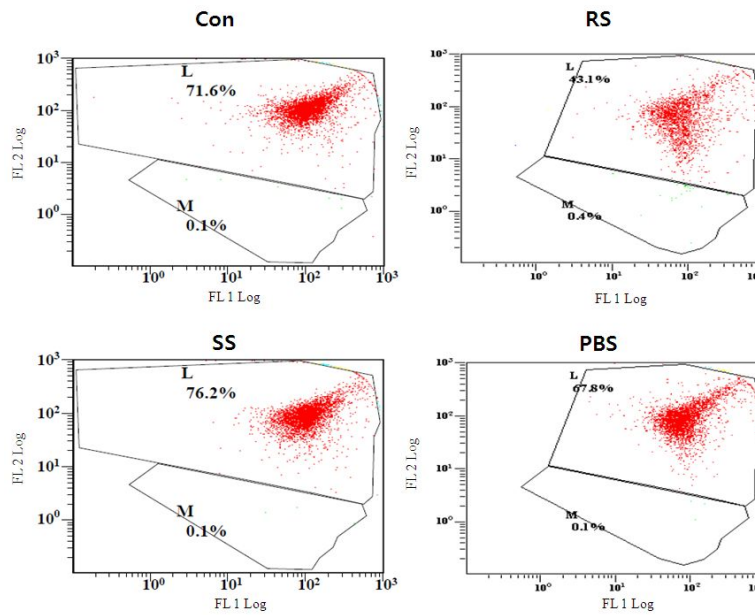


Fig. 1-4. Representative fluorescence intensity diagram of mitochondrial membrane potential in the skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The mitochondrial membrane potential was measured by flowcytometer using MitoProbe[™] JC-1 assay kit.

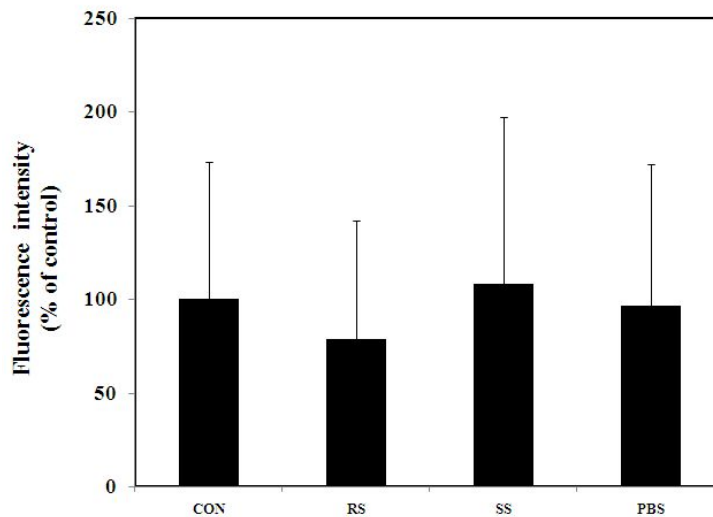


Fig. 1-6. Mitochondrial membrane potential measured by flowcytometer using MitoProbe[™] JC-1 assay kit in the skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8).

2) 미토콘드리아의 크기

미토콘드리아는 자신의 DNA와 리보솜을 가지고 있어 박테리아처럼 복제가 가능하며, 미토콘드리아의 크기가 많이 커지게 될 때는 분열을 시도하기도 하고, 손상이 되거나 노쇠한 미토콘드리아는 자가식작용에 의해 조절된다. 최근 당뇨병과 관련하여 인슐린 저항성과 미토콘드리아의 관계를 규명하는 연구에 의하면, 미토콘드리아의 형태학적 연구에서 인슐린 민감도와 미토콘드리아의 크기가 매우 밀접한 관계가 있고, 비만인 경우 그 크기가 유의적으로 작다는 보고가 있다. 또한 미토콘드리아의 mtDNA의 양은 인슐린 저항성 지표인 AUC insulin, HOMA-IR, 그리고 공복 혈중 인슐린 농도와 유의적인 양의 상관관계를 보인 반면, 공복 혈당과 인슐린 농도 비율과는 유의적인 양의 상관관계를 보인 것으로 보고되고 있다. 이와 같이 미토콘드리아의 용적(크기)이나 수 역시 막전위 손실과 같은 미토콘드리아 기능 장애의 하나의 지표가 될 수 있다.

이에 각 식이군들의 미토콘드리아 용적을 알아보기 위하여 MitoTracker® Green FM을 이용하여 유세포 분석을 실시하였다. MitoTracker® Green FM도 앞서 설명한 JC-1과 동일하게 미토콘드리아 막전위차에 의해 내부로 침투되어 미토콘드리아의 막부분에 축적되고 미토콘드리아의 막부분을 녹색으로 염색시켜 그 intensity를 측정함으로써 미토콘드리아의 크기와 수, 즉 세포내 미토콘드리아의 전체적인 용적을 알 수 있다.

4주간 8%의 고염식을 한 각 식이군의 미토콘드리아 용적에 대한 intensity를 히스토그램으로 나타낸 결과(Fig. 1-7.), 정제염식이군의 intensity가 가장 낮았고, 대조군의 intensity가 다소 높게 나왔으며, 나머지 식이군들의 intensity는 비슷한 수준의 intensity를 나타냈다. 그래프의 붉은 선을 기준으로 히스토그램이 좌측으로 이동할수록 낮은 intensity를 나타내고 이는 미토콘드리아의 용적이 작아짐을 의미하며 미토콘드리아의 기능 장애를 나타내는 지표가 된다. 이를 다시 대조군에 대한 증감비율로 나타낸 결과(Fig. 1-8), 그룹 간의 통계적 유의성은 없었으나 히스토그램 결과와 마찬가지로 정제염의 미토콘드리아 손상이 다른 식이군에 비하여 더 큰 것으로 확인되었다.

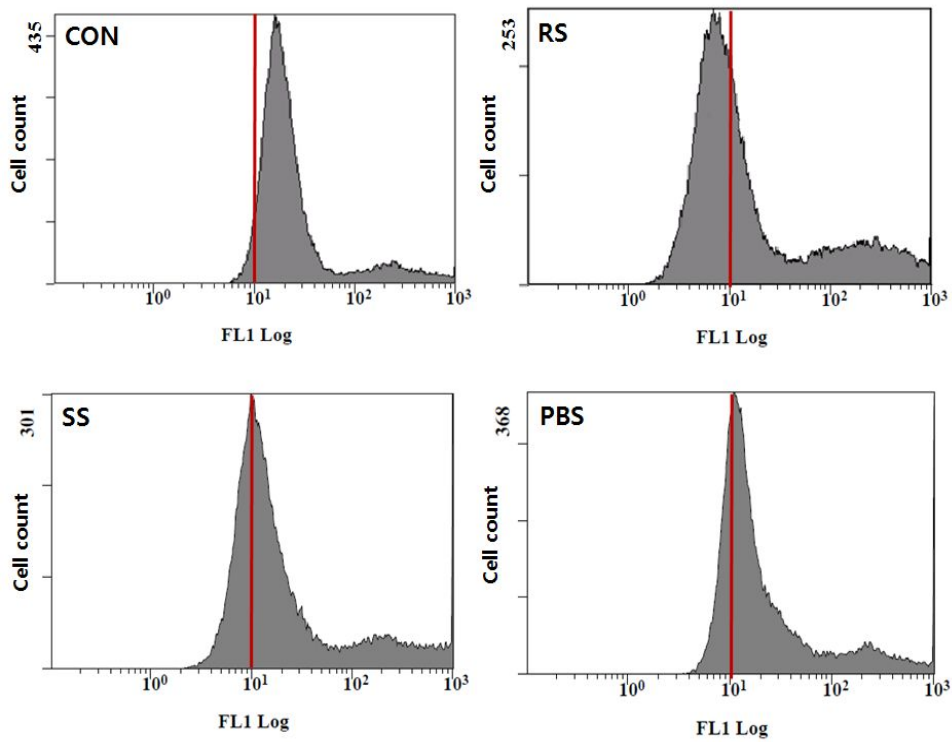


Fig. 1-7. Representative fluorescence histogram of mitochondrial size in the skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. Mitochondrial size was measured by flowcytometer using MitoTracker® Green FM.

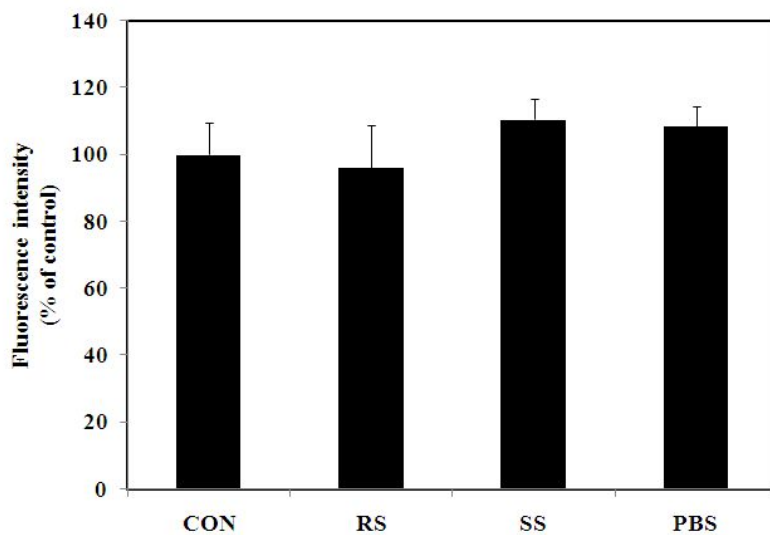


Fig. 1-8. Mitochondrial size in the skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8).

3) ATP 생성량

소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 막내 전위차 손실 및 크기 감소에 어느 정도 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한 미토콘드리아의 막내 전위차 손실 및 크기 감소와 함께 ATP 생성량도 줄어들어 미토콘드리아의 기능 장애가 생긴다. 그래서 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 ATP 생성에도 영향을 주는지 알아보려고, 소금의 종류를 달리하여 4주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐의 근육조직으로부터 얻어진 single cell을 대상으로 ATP determination kit를 이용하여 다표지생물시료측정장치에 의해 측정하였다. 그 결과(Fig. 1-9), 소금식이군은 대조군에 비해 현저하게 낮은 ATP 생성량을 나타냈다. 또한 소금의 종류에 따른 ATP 생성량은 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 막내 전위차 손실 및 크기 감소에서 다소 차이를 보였던 결과와 다르게 차이를 보이지 않았다. 다만 자축염식이군(PBS)과 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)이 미네랄이 없는 일반소금식이군(RS)보다 약간 더 많은 ATP를 생성하였다. 세포에서 미토콘드리아는 대부분의 ATP를 생성하는데, 미토콘드리아의 손상이 생길 경우 ATP 감소는 세포사멸과 괴사를 유발시킨다. 과다한 소금 섭취는 미토콘드리아를 손상시키고 그로 인해 ATP 생성을 감소시키는 것으로 해석되었다. 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 막내 전위차 손실 정도 및 크기에는 미미하게 차이를 보였으나 ATP 생성에는 큰 차이를 보이지 않았다.

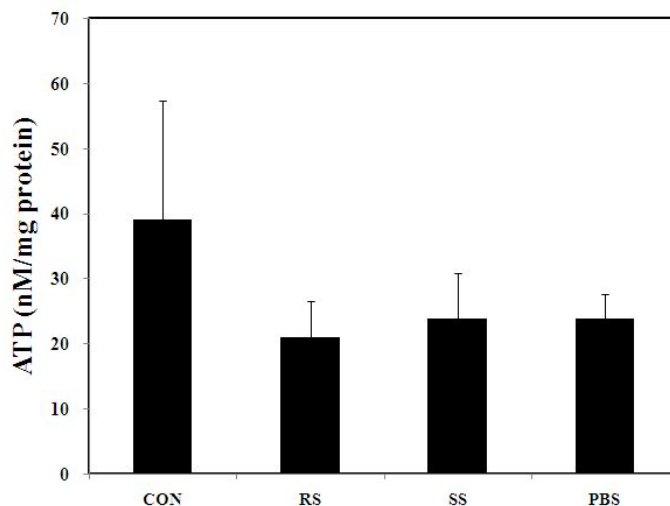


Fig. 1-9. ATP content in the skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8).

4) ROS 함량

인슐린 저항성 조건의 경우 미토콘드리아의 호흡 단계에 있어서 cytochrome oxidase의 활성이 감소할 경우 전자 흐름을 방해하고 그로 인해 활성 산소(reactive oxygen species)는 증가하게 된다고 알려져 있다. 그래서 소금의 종류에 따라 세포에서 ROS 생성에 어느 정도로 영향을 주는 지 알아보고자, 소금의 종류를 달리하여 4주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐의 근육조직으로부터 얻어진 single cell을 대상으로 Nitro Blue Tetrazolium을 이용한 환원 방법에 의해 측정하였다. 그 결과(Fig. 1-10), 각 식이군 간의 유의적 차이는 없었으나 ROS 함량은 미네랄이 없는 일반소금식이군(RS)에서 가장 높았으며, 그 다음으로는 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)과 자죽염식이군(PBS)이었으며, 대조군에서 가장 낮게 나타났다. 이는 과도한 소금 섭취가 세포내에서 ROS 생성을 증가시킬 것으로 예상되었다. 소금의 종류 간의 ROS 생성량을 비교해 보면, 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)과 자죽염식이군(PBS)이 미네랄이 없는 일반소금식이군(RS)에 비해 낮은 ROS 생성을 나타냈다. 이는 과도한 소금 섭취가 ROS 생성을 증가시키는 것은 분명하나 소금의 종류에 따라 ROS 생성량이 차이를 보였던 것으로 보아 미네랄이 풍부한 천일염과 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 ROS 생성에 적게 영향을 주는 것으로 시사된다.

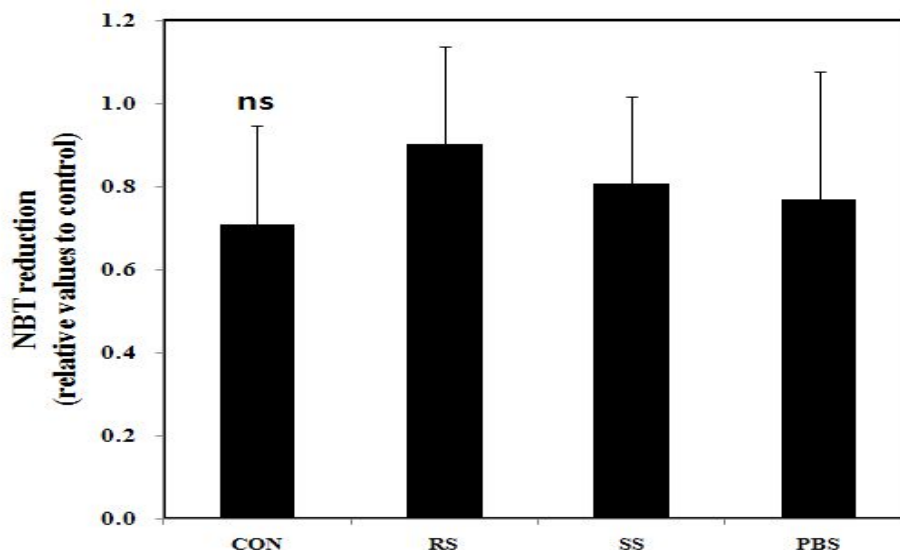


Fig. 1-10. ROS contents in the skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8).

5) Cytochrome c oxidase의 발현량

정상 세포에서 Cytochrome c는 complex III와 IV 사이에서 전자운반체로 작용한다고 알려져 있다. 그러나 세포가 괴사되어질 경우 미토콘드리아로 전이된 Bax는 미토콘드리아 막 투과성을 증가시켜 cytochrome c를 고갈시킴으로써 미토콘드리아 호흡연쇄의 손상을 유발한다. 그래서 고염섭취가 세포 내에서 oxidative phosphorylation에 관여하는 단백질들 (Cytochrome oxidase subunit I 과 III, COX I and III, respectively)의 발현량에 어느 정도로 영향을 주는지 알아보려고 하였다. COX I 과 III는 인슐린저항성이 있을 경우 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다. 소금의 종류를 달리하여 4주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐의 근육조직을 대상으로 western blotting에 의해 oxidative phosphorylation에 관여하는 단백질들 (COX I 과 III)의 발현량을 조사한 결과 COX III의 경우 인슐린 저항성이 적거나 거의 없는 대조구와 자축염그룹에서 발현이 증가하는 것으로 보이나 뚜렷하게 비교하기가 어려웠다. 그리고 COX I의 경우 발현량을 검출하는데는 실패하였다 (Fig. 1-11). 아마 이 들이 membrane protein이고 발현이 많지 않아서 그런 것이 아닌가 사료된다.

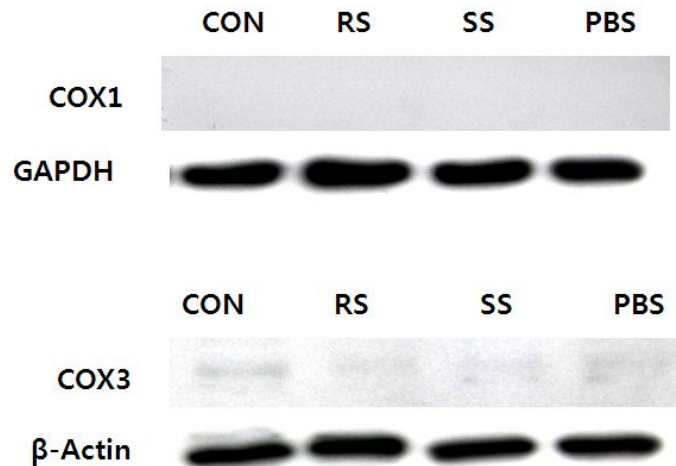


Fig. 1-11. Immunoblotting of cytochrome c oxidase proteins (Cytochrome oxidase subunit I 과 III, COX I and III, respectively) in the skeletal muscle tissues of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks.

마. 대사체 분석(metabolomic analysis)

(1) 다양한 소금 섭취 쥐의 뇨 대사체 분석

(가) 뇨 대사체 분석

미네랄이 없는 일반소금(PS), 미네랄이 풍부한 천일염(SS), 죽염 (PBS)을 4주 동안 섭취시킨 정상쥐로부터 얻어진 뇨를 대상으로 LC/MS에 의해 대사체를 다음 PLS-DA를 이용하여 통계 분석을 행하였다. 그 결과, 각 식이군은 PLS-DA scores plots 상에서 유의적으로 분리되는 것을 확인하였다 (Fig. 1-12). 이때 scores plot의 fitting 정도를 보여주는 parameters인 R²X와 R²Y값이 각각 0.465과 0.862로 높으며 미지의 시료를 예측할 수 있는 Q² 값도 0.651로 높은 수치를 보여주는 것을 확인하였다 (Table 2). 또한 overfit이 되는지를 확인하기 위하여 permutation test (n=200)를 갖는 7-fold cross validation을 통해 R intercept과 Q intercept를 확인한 결과 각각 0.578과 -0.269을 보여 전혀 overfit이 일어나지 않았으며 미지의 시료를 예측하는데 있어서 문제가 되지 않는 것으로 확인하였다 (Fig. 1-12). 이때의 p-value는 1.55e-5임을 확인하였다 (Table 2). 보다 상세하게 비교를 위하여 두 그룹씩 따로 비교했을 때 모든 비교 그룹들이 PLS-DA scores plots 상에서 뚜렷하게 구분되는 것을 관찰하였다 (Fig. 1-12). 이때 PS-SS, PS-PBS, SS-PBS models의 scores plot parameters 중 R²X와 R²Y 값은 각각 0.484-0.594, 0.905-0.995로 높으며 P-value인 경우 PS-SS와 PS-PBS는 각각 0.004와 0.04로 유의적인 차이를 보였지만 SS-PBS인 경우 0.091로 보아 비록 SS와 PBS가 scores plot 상에서 뚜렷하게 구별되는 것처럼 보였지만 scores plot parameters 분석 결과 두 그룹간의 유의적인 차이를 확인할 수 없었다(Table 2).

Table 2. Parameters for quality of PLS-DA models

Models	No. ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^b	Q ² Y _{cum} ^b	P ^d
PS-SS-PBS	3	0.465	0.862	0.651	1.55e-5
PS-SS	3	0.484	0.995	0.910	0.004
PS-PBS	2	0.419	0.905	0.646	0.040
SS-PBS	4	0.594	0.995	0.823	0.091

^aNo. is the number of components. ^bR²X_{cum} and R²Y_{cum} are the cumulative modeled variation in X and Y matrix, respectively, and Q²Y_{cum} is the cumulative predicted variation in Y matrix. ^cR and Q intercepts were obtained after permutation test (n = 200). ^dP is P-value obtained from cross validation ANOVA of PLS-DA.

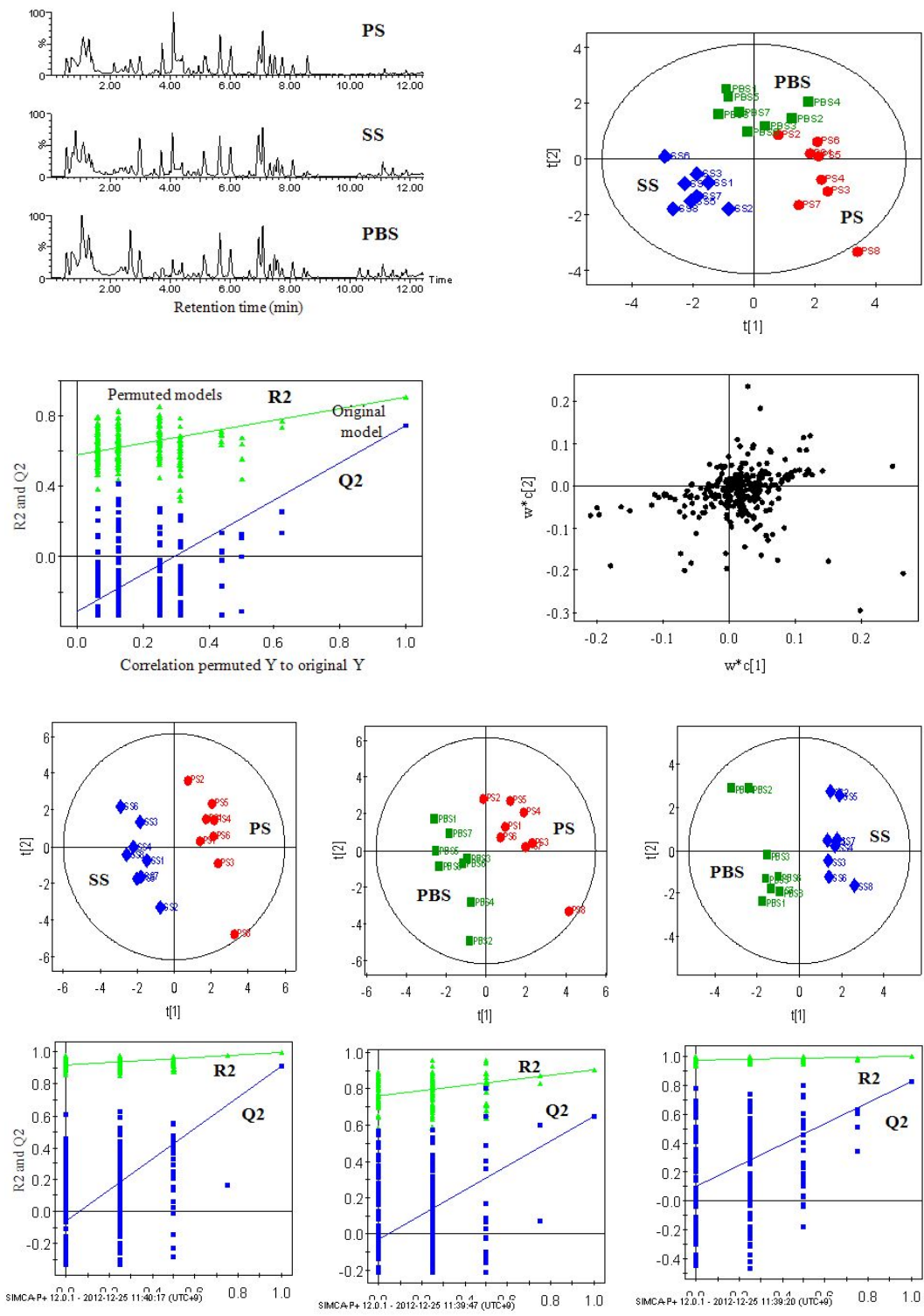


Fig. 1-12. PLS-DA plots of metabolites in the urines of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks by LC/MS analysis.

(나) 다양한 소금 섭취 쥐 뇨 대사체의 정성 정량 분석

Scores plots 상에서 각 식이군의 차이에 관여하는 대사체들을 동정하기 위하여 UPLC-Q-TOF MS로 분석한 총 665개 (fragments 포함)의 대사체들을 one way ANOVA와 Duncan's test를 통해 유의적으로 (p -value < 0.05) 차이가 나며 VIP value > 0.5인 대사체들을 추출한 후 LC/MS를 이용하여 MS/MS 하였다. LC/MS로 분석된 대사체들 중 소금의 종류에 따라 유의적으로 차이가 있는 13개 대사체들 (cytosine, formylmethionine, hippuric acid, homocysteine, methionine, methylcytosine, methylhistidine, oxoglutaric acid, phenylalanine, thymine, tryptophan, uridine, xanthurenic acid)을 동정되었다. 또한 유의적인 차이는 없었지만 뇨에서 다양한 지표가 되는 creatinine과 kynurenic acid도 동정하였다. 동정된 대사체들을 Heat-map을 통해 clustering을 분석한 결과 세 그룹이 다소 혼재되어 있기는 하지만 세 그룹이 다소 떨어져 있는 것을 확인할 수 있었으며 특히 PBS인 경우 다른 그룹과 분리되는 것이 관찰되었다 (Fig. 1-13). 이들 대사체들의 함량을 비교한 결과 Fig. 1-14에서 보는 바와 같이 cytosine, formylmethionine, homocysteine, methylcytosine, phenylalanine, tryptophan, uridine, xanthurenic acid의 함량은 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 죽염식이군이 낮게 나온 반면 미네랄이 풍부한 천일염식이군은 cytosine, methylcytosine, uridine만 줄어들었다. 반면 hippuric acid와 thymine인 경우 죽염식이군이 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 다소 증가하는 결과를 보였다. 비록 대사체 동정에 대한 더 많은 연구가 필요하지만 지금까지의 뇨 대사체 분석 결과는 주로 tryptophan metabolism에 관련된 물질들 (tryptophan, kynurenic acid, xanthurenic acid)이 죽염에 의해서 감소하는 경향을 보였다.

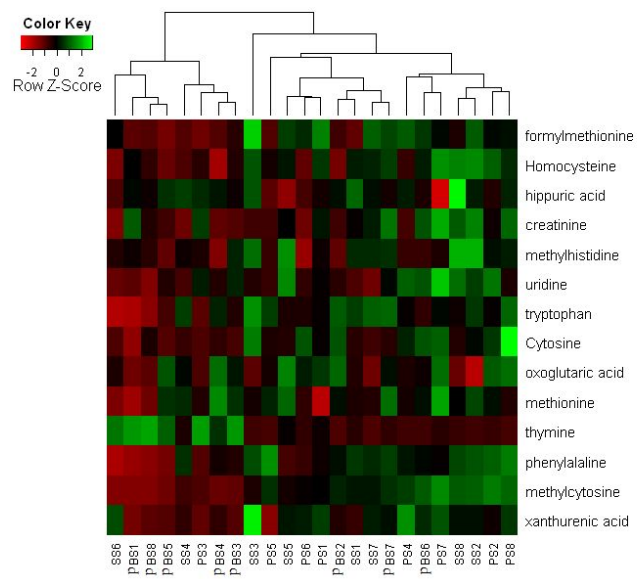


Fig. 1-13. Heat-map of metabolites identified in the urines of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks by LC/MS analysis.

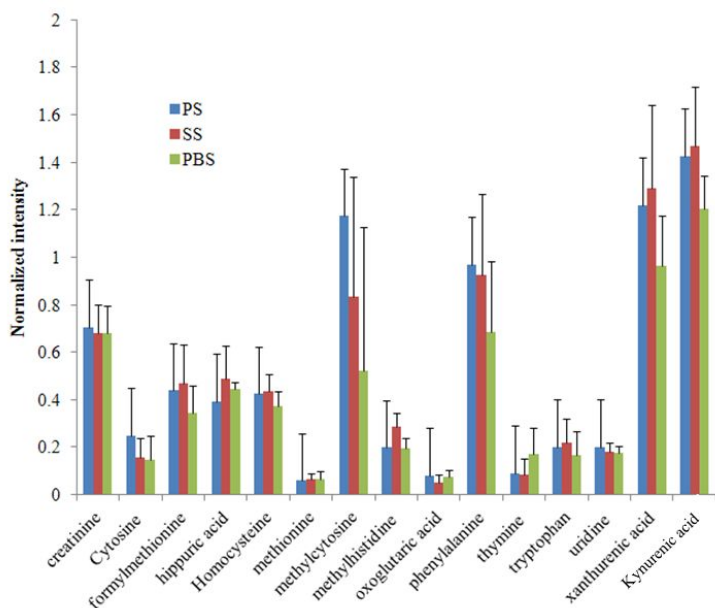


Fig. 1-14. Comparison of normalized intensity of metabolites identified in the urines of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks by LC/MS analysis.

(2) 다양한 소금 섭취 쥐의 근육 대사체 분석

(가) 근육 대사체 분석

미네랄이 없는 일반소금(PS), 미네랄이 풍부한 천일염(SS), 죽염 (PBS)을 4주 동안 섭취시킨 정상쥐로부터 얻어진 대사체를 LC/MS로 분석한 결과 노 대사체 프로파일과는 달리 상당히 적은 수 (102개)의 대사체들만이 분석되었으며 (Fig. 1-15) PLS-DA를 이용하여 통계 분석한 결과 소금 종류에 따른 노 대사체 분석과는 달리 세 그룹은 PLS-DA scores plots 상에서 유의적으로 분리되지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 1-16). Scores plots 상에서 세 그룹이 서로 유의적으로 분리되는 것처럼 보이지만 scores plot의 fitting 정도를 보여주는 parameters인 R2X, R2Y, Q2 값이 높지 않으며 permutation test를 이용한 7-fold cross validation 한 결과 R2와 Q2의 초기 값이 높은 것으로 보아 PLS-DA models이 overfitting이며 미지의 시료를 예측하는데 적당하지 않을 뿐만 아니라 p-value도 0.078로 다소 높았다. 자세하게 비교하기 위하여 두 그룹씩 따로 비교한 결과 노 대사체 결과와는 달리 PS와 SS 그룹만이 서로 유의적으로 차이가 있는 것으로 확인되었다. 두 그룹의 차이에 관여하는 대사체들의 동정은 현재 진행 중에 있다.

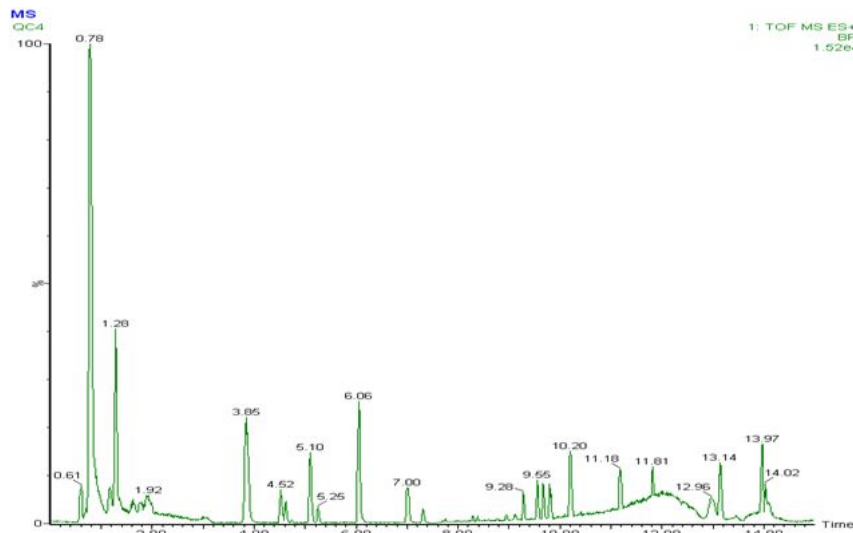


Fig. 1-15. LC/MS profile of metabolites in the skeletal muscle tissue of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks by LC/MS analysis.

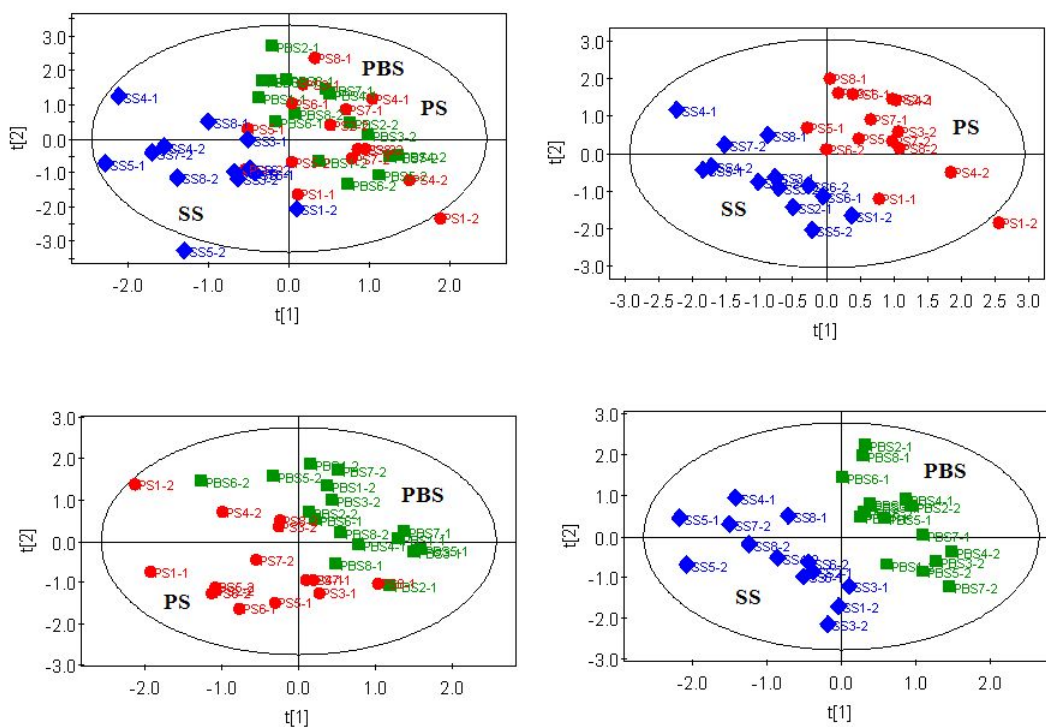


Fig. 1–16. PLS-DA plots of metabolites in the urines of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks by LC/MS analysis.

Table 3. Parameters for quality of PLS-DA models

Models	No. ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^b	Q ² Y _{cum} ^b	P ^d
PS-SS-PBS	2	0.289	0.359	0.078	1
PS-SS	2	0.284	0.837	0.433	0.042
PS-PBS	2	0.306	0.663	0.160	0.441
SS-PBS	4	0.456	0.963	0.552	0.073

^aNo. is the number of components. ^bR²X_{cum} and R²Y_{cum} are the cumulative modeled variation in X and Y matrix, respectively, and Q²Y_{cum} is the cumulative predicted variation in Y matrix. ^cR and Q intercepts were obtained after permutation test (n = 200). ^dP is P-value obtained from cross validation ANOVA of PLS-DA.

이상의 결과를 요약해 보면, 다음과 같다.

천일염의 인슐린 저항성 개선 효과와 미토콘드리아 기능 장애, endoplasmic reticulum stress와의 연관성을 밝히고자, 동물실험에서 인슐린 신호전달, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress 및 산화적 스트레스에 관여하는 인자들을 조사하고, 에너지에 관련된 대사체 (metabolites)을 조사하였다.

미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 없는 일반소금보다, 미네랄이 풍부한 천일염보다는 자죽염이 더 좋은 포도당 부하 내성 결과를 나타냈다. 또한 고염을 섭취시킨 각 식이군들은 대조군에 비해 상대적으로 낮은 IRS-1의 발현량을 나타냈으나 자죽염(PBS)과 미네랄이 풍부한 천일염(SS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 낮은 IRS-1의 발현량을 나타냈다. 본 연구팀의 선행 연구에서는 과도한 소금 섭취가 근육조직이나 지방조직에서 IRS-1의 serine이 인산화된 pIRS1^{Ser307}의 함량이 높았는데 이 결과와 유사한 경향을 보였다. 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 IRS-1 발현량이 높았던 것은 아마도 과도한 소금의 섭취로부터 오는 pIRS1^{Ser307}과 같은 IRS-1의 변형이 적었던 것으로 시사되었다. 그러나 근육 조직에서 과다 소금 섭취로부터 오는 산화적 스트레스로 인해 생성된 지질 혹은 단백질 산화물 함량은 소금의 종류 간의 현저한 차이를 보이지 않아 본 연구팀의 선행 연구 결과와 다소 차이를 보였다. 과도한 소금 섭취는 인슐린 저항성을 유발시키지만 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 인슐린 저항성을 줄여 주는 효과가 있음이 재차 확인되었다.

미토콘드리아의 기능 장애와 관련된 인자들의 경우에 있어서, 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)과 자죽염식이군(PBS)는 대조군과 유사한 JC-1의 집합체 형태를 나타냈으나 미네랄이 없는 일반소금식이군(RS)은 대조군에 비해 넓게 분산된 JC-1의 단량체 형태로 관찰되었다. 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 소금에 비해 미토콘드리아의 막내 전위차 손실을 미약하나 줄여 주는 경향을 보였다. 또한 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 크기도 막내 전위차와 유사한 경향을 보였으나 ATP 생성량의 경우는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 과도한 소금 섭취는 ROS 생성을 증가시켰으나 소금의 종류에 따라 ROS 생성량은 차이를 보였다. 즉 미네랄이 풍부한 천일

염과 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 ROS 생성이 적었다. 본 연구에서 보고자 했던 oxidative phosphorylation에 관여하는 단백질들 (COX I 과 III)의 발현량을 이들 단백질의 항체를 이용하여 조사하였는데 이들 단백질이 너무 미량으로 검출되어 정확한 비교가 어려웠다. 전체적으로 과다한 소금 섭취는 미토콘드리아의 막내 전위차에 손실을 주고 크기도 줄어들며 또한 ATP 생성량은 줄어들고 ROS 생성량을 증가시켜 미토콘드리아의 기능 장애를 생기게 하는 것으로 해석되었다. 소금의 종류에 따라 미토콘드리아의 기능 장애에 미치는 영향에 다소 차이를 보였다. 이 결과만으로 미네랄이 풍부한 천일염과 자죽염이 일반소금에 비해 미토콘드리아의 기능 장애를 줄여 준다고 단정할 수 없다. 이에 대한 현저한 차이를 입증하기 위해서는 현재 고염 식이 기간보다 매우 긴 장시간 식이를 통한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

또한 미네랄이 없는 일반소금(PS), 미네랄이 풍부한 천일염(SS), 죽염(PBS)을 4주 동안 섭취시킨 정상쥐로부터 얻어진 뇌와 근육조직을 대상으로 대사체 분석을 실시하였다. 뇌의 대사체 분석 결과에서는 소금의 종류 간에 확연한 그룹이 형성되는 것으로 보아 대사의 차이가 있음이 예측된다. 이 중 소금의 종류에 따라 유의적으로 차이가 있는 13종의 대사체들은 cytosine, formylmethionine, hippuric acid, homocysteine, methionine, methylcytosine, methylhistidine, oxoglutaric acid, phenylalanine, thymine, tryptophan, uridine, xanthurenic acid로 동정되었다. 이 중 cytosine, formylmethionine, homocysteine, methylcytosine, phenylalanine, tryptophan, uridine, xanthurenic acid의 함량은 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 죽염식이군이 낮았으며 미네랄이 풍부한 천일염식이군은 cytosine, methylcytosine, uridine만 그 함량이 줄었다. 반면에 hippuric acid와 thymine인 경우 자죽염식이군이 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 다소 증가하였다. 근육조직의 대사체 분석 결과에서는 소금의 종류 간에 확연한 차이는 관찰되지 않았으나 두 그룹 간 비교에서 PS와 SS 그룹 간 유의적으로 차이가 확인되었다. 소금의 종류에 따라 유의적으로 차이가 있는 대사체들은 현재 동정 중에 있다.

제 2장 죽염 섭취가 Alzheimer's disease 예방 및 뇌 건강에 미치는 영향

1. 연구의 필요성

우리나라를 포함한 모든 국가에서는 평균수명이 증가하고, 노인 인구의 증가와 함께 의학적 및 복지적 차원에서 노인에 대한 관심이 고조되고 있다. 특히 노인 인구의 급증으로 인해 노인성 질환이 증가하고 있어 사회적 문제가 되고 있는데, 그에 따른 의료비가 국가 예산에 큰 비중을 차지하고 있다. 노인성 질환 중 당뇨, 혈압, 뇌졸중 등의 대사증후군뿐만 아니라 인지기능 노화(aging)와 퇴행성 신경장애(neurodegenerative disorder)에 관련된 질환도 크게 증가하고 있는 추세이다. 이 중 퇴행성 신경장애는 뇌신경 세포의 기능 감소와 소실에 의해 인지기능, 지각기능, 감각기능, 운동조절능력에 문제가 발생되는데, 주된 질환으로는 Alzheimer's disease, 파킨슨병 (Parkinson's disease), 그리고 헌팅톤병 (Huntington's disease)이다. 이 중 Alzheimer's disease는 인지기능 장애로, 노인성치매의 주요 증상이며, 세계적으로 가장 빠르게 환자가 증가하고 있는 질환이다. Alzheimer's disease는 amyloid β aggregation, acetylcholine 함량 감소, neurofibrillary tangle 형성 등이 주요 원인 인자로 보고되고 있다. 이러한 질병은 유전, 환경, 생활습관이 관여한다고 제기되고 있지만, 아직 그 발병 원인에 대해서는 불분명하다. 그래서 이러한 질병을 예방하기 위해서는 생활 습관과 같은 환경요인의 조절이 매우 중요하다고 생각된다. 특히 매일 섭취하고 있는 식품 또한 Alzheimer's disease에 크게 영향을 줄 것으로 생각된다.

소금은 우리 몸에서 혈압 조절, 영양소 운반, 신경전달 등의 생리 기능을 하는 매우 중요한 성분이다. 그러나 과도한 소금 섭취는 체내 산화적 스트레스를 주고 당뇨와 혈압 등의 대사증후군에 크게 영향을 준다는 다수의 논문이 발표되었다. 한편 지나친 소금 섭취 제한(5 g 이하)은 고지혈증, 대사체 변형[레닌과 인슐린 저항성 상승, aldosterone과 noradrenalin 등의 호르몬 농도 변화], 그리고 심혈관 질환에 의한 사망률 증가 등이 생긴다는 상반된 결과도 보고되고 있다.

우리가 매일 섭취하는 소금은 암염, 천일염, 재제염, 정제염 등으로 크게 구분되는데, 소금의 종류에 따라 우리의 건강에 도움을 주는지 극히 일부만이 밝혀져 있다. 특히 미네랄이 풍부한 천일염과 죽염이 미네랄이 없는 일반소

금에 비해 산화 스트레스가 적고 혈압과 당뇨 등의 대사증후군에 미치는 영향이 적다는 사실이 밝혀지는 가운데, 소금의 종류에 따라 건강에 미치는 영향이 다를 것으로 시사된다.

앞서 언급한 바와 같이 전 세계에서 매일 섭취하고 있는 다양한 소금의 종류 중 우리나라에는 미네랄이 없는 일반소금에 비해 건강에 도움이 되는 미네랄이 풍부한 천일염과 이를 열처리하여 만든 가공염이 있다. 이 중 자죽염과 죽염과 같은 열처리가공소금은 국내산 천일염과 대나무 등의 부재료와 함께 고온에서 태우거나 용융하여 만든 것으로, 우리나라에서만 유일하게 생산되고 오래전부터 섭취해 왔던 소금이며 강한 황 냄새를 지닌다. 죽염은 미네랄이 풍부한 천일염을 이용함에도 불구하고도 제조과정 중 미네랄이 풍부한 천일염보다 염도가 높고 마그네슘, 칼슘, 칼륨 등을 포함한 대다수 미네랄 성분 함량은 낮다. 예로부터 이 소금들은 항염증, 위궤양, 항당뇨 등의 치료 목적으로 널리 이용하여 왔으며 최근 과학자들에 의해 항산화, 항염증, 항바이러스, 그리고 항암 등의 다양한 생리활성이 밝혀지고 있다.

본 연구팀은 최근 동물실험을 통하여 좋은 소금인 천일염보다 죽염이 산화 스트레스를 적게 주고 인슐린 신호전달에 있어 인슐린 저항성이 낮음을 밝혔다. 또한 죽염은 일반소금이나 미네랄이 풍부한 천일염에 비해 VEGF와 NO 생성을 증가시켜 소금 섭취로부터 오는 혈압 상승을 줄여주는 효과가 있음을 밝혔다. 그리고 타 연구팀의 보고에 의하면, 죽염을 첨가하여 제조한 우리나라의 전통발효식품(김치, 된장)이 천일염을 이용하여 제조된 전통발효식품보다 항암 등의 생리활성이 우수하다고 하였다.

최근 본 연구팀은 자죽염을 아스피린과 함께 쥐에 단독으로 투여할 경우 아스피린으로부터 유발될 수 있는 출혈, 염증, 궤양, 그리고 점막손상 등의 위 손상을 현저하게 감소시키는 위 손상 예방 효과가 있음을 밝혔다. 특히 혈관과 세포 간의 K_{ATP} 채널에 길항물질인 글리벤향크라미드와 함께 처리할 경우 위 손상 예방 효과를 나타내지 않아 자죽염은 K_{ATP} 채널의 활성화를 통하여 위 손상 예방 효과를 발휘하는 것으로 판단된다. 그에 더하여 자죽염에 특이적으로 황화수소를 생성하는 물질들이 존재하여 위 손상 예방 효과에 기여한다는 사실을 밝혔다.

특히 흥미로운 것은 자죽염에서만 특이적으로 황화수소(H_2S)가 생성되고 일반소금과 천일염 등에서는 그 물질 함량이 매우 낮았으며 일반 죽염도

그 함량이 매우 낮았다. 이는 죽염의 종류에 따라 황화수소 함량 차이가 있었던 것으로 고려해 볼 때, 죽염의 제조방법에 기인하는 것으로 시사된다.

황화수소는 과량의 섭취 시 인체에 유해하나 소량 섭취할 경우 NO와 CO와 유사하게 신호전달물질(gaseous transmitter)로 작용한다고 밝혀지고 있다. 특히 소량의 황화수소는 혈관확장, 항염증, 항고혈압, 세포 간 신호전달, 치매(Alzheimer's disease 및 기억력 장애)억제, 그리고 항위궤양 효과 등의 다양한 생리기능을 갖고 있어 현재 많은 과학자들에게 주목받고 있다. 이로 인해 2010년에 WHO는 황화수소가 함유된 식품 섭취를 권장하고 있다. 현재 식품 및 의약품 관련 회사나 과학자들은 황화수소를 함유한 식품 혹은 소재를 찾으려는 노력이 활발히 진행되고 있으나 마늘, 유제품, 육류 등 극히 일부에 불과하다.

특히 황화수소의 다양한 생리활성 중 황화수소가 신경성치매를 유발하는 인자인 β -secretase (BACE) 활성을 저해하여 Alzheimer's disease 예방 효과가 있다고 보고된 바 있다. 황화수소를 생성하는 죽염 혹은 자죽염은 Alzheimer's disease 예방 및 기억력 감소 억제 효과가 있을 것으로 시사된다. 소금은 전 세계사람 누구나 매일 섭취하여야만 하나 아직 누구도 소금이 Alzheimer's disease에 어떻게 영향을 미치는지 보고한 적이 없다.

자죽염의 Alzheimer's disease 예방 및 기억력 감소 억제 효과가 입증되어 진다면, 많은 사람들이 두려워하는 치매의 71%가 Alzheimer 병에 의해 발병되는 것을 고려해 볼 때 한국산 천일염의 가공염인 죽염을 세계적으로 부각시키는데 매우 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

Alzheimer's disease는 amyloid β aggregation, acetylcholine 함량 감소, neurofibrillary tangle 형성 등이 주요 원인 인자로 보고되고 있다. 이 중 amyloid β aggregation은 Alzheimer's disease를 생기게 하는 주된 원인으로 알려져 있다. Alzheimer's disease에 관련된 주된 인자 중 하나인 Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거에 관여하는 주요 단백질들을 살펴보면 다음과 같다.

(1) Amyloid- β 펩타이드의 생성에 관여하는 단백질들

Amyloid- β 펩타이드는 인간을 포함한 포유동물의 세포에서 분비되며 혈

장과 뇌척수액에서 발견되었다. 뇌 신경세포에서 Amyloid- β 펩타이드는 막 수용체 단백질인 Amyloid Precursor Protein (APP)이 β -secretase (BACE 1) 또는 γ -secretase의 작용으로 분해되어 생성된다. 단량체인 Amyloid- β 펩타이드는 올리고머 또는 섬유 형태로 변형되고 결집(plaque) 되어 독성을 유발한다. Amyloid- β 펩타이드는 A β 40과 A β 42 isoform이 있으며, A β 42가 Amyloid- β 의 결집체를 더 쉽게 형성한다고 한다.

(2) Amyloid- β 펩타이드의 제거에 관여하는 단백질들

Amyloid- β 펩타이드의 제거에 관여하는 단백질들은 neprilysin (NEP), endothelin converting enzyme, angiotensin converting enzyme (ACE), 그리고 insulin degrading enzyme (IDE) 등이 알려져 있다. 이들 단백질은 뇌 조직에서 Amyloid- β 펩타이드를 제거함으로써 뇌에서 Amyloid- β 펩타이드 함량을 일정하게 유지시켜 준다. 특히 IDE는 당뇨와 Alzheimer's disease 간의 관련성이 있음이 최근 밝혀지고 있는데 IDE 기능이 상실하게 되면 혈장의 인슐린과 Amyloid- β 펩타이드 함량이 증가한다고 보고되고 있다.

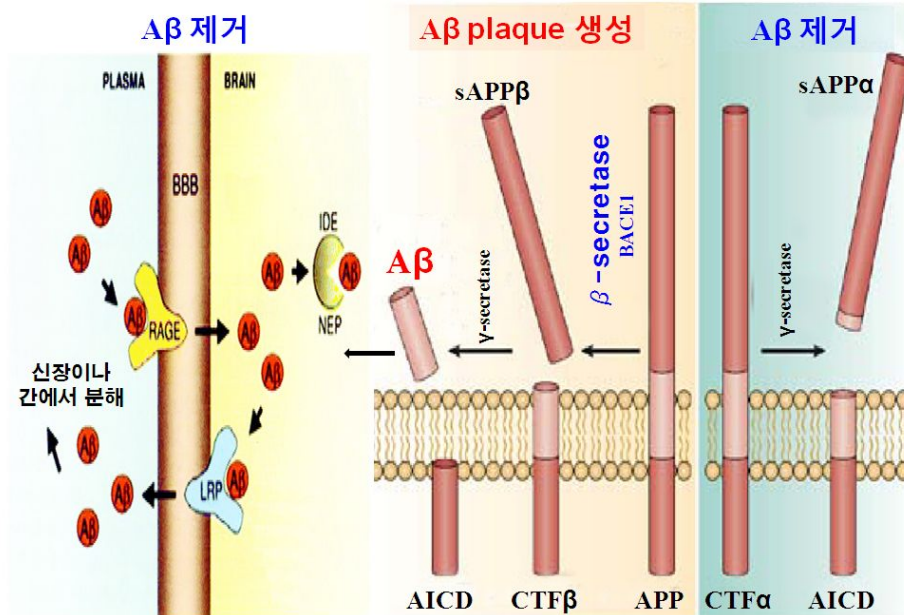
(3) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)

RAGE는 immunoglobulin superfamily에 속하는 multi-ligand receptor로, 수용성 Amyloid- β 펩타이드와 같은 단백질과 결합하여 신경세포 반응을 매개한다고 알려져 있다. 또한 혈관 내에 glycation이나 산화에 의해 변형 되어 축적된 Advanced glycation end products와 Amyloid- β 펩타이드가 증가하게 되면 뇌혈관이나 신경세포에서 RAGE의 발현이 크게 증가하게 되는데, Amyloid- β 펩타이드와 결합한 RAGE는 세포의 산화 손상과 염증을 유발시켜 신경세포 사멸을 유도한다.

(4) Low density lipoprotein receptor related protein (LRP)

LRP는 LDL receptor family로, blood-brain barrier에서 Amyloid- β 펩타이드를 제거하는데 관여하는 중요한 수용체로 알려져 있다. 즉 LRP는 뇌 조직으로부터 Amyloid- β 펩타이드를 제거하는 첫 단계의 기능을 하는데,

정상 노화나 Alzheimer's disease 환자에서는 LRP 발현량이 줄어든다고 하였다.



< Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거 기작 >

앞서 언급한 바와 같이 Alzheimer's disease는 유전, 환경, 생활습관이 관여한다고 제기되고 있지만, 아직 그 발병 원인에 대해서는 불분명하다. 그래서 이러한 질병을 예방하기 위해서는 생활습관과 같은 환경요인의 조절이 매우 중요하다고 생각된다. 특히 매일 섭취하고 있는 식품은 Alzheimer's disease에 크게 영향을 줄 거라 생각된다. 또한 과도한 소금 섭취는 체내 산화 스트레스와 염증을 주고 당뇨와 혈압 등의 대사증후군에도 크게 영향을 준다는 보고와 같이 Alzheimer's disease에도 영향을 줄 것으로 판단된다. 특히 황화수소를 생성하는 자숙염은 미네랄이 없는 일반소금과 건강 기능성이 우수한 미네랄이 풍부한 천일염보다 산화 스트레스가 적고 인슐린 저항성을 줄여 주는 것으로 밝혀지고 있다.

그래서 본 연구에서는 황화수소를 생성하는 자숙염이 일반소금에 비해 Alzheimer's disease에 미치는 영향이 적은지를 알아보고자, 다음과 같은 Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거에 관여하는 주요 인자들을 조사하고 산화 스트레스에 관여하는 인자들 또한 조사하였다.

※ Amyloid β 생성에 관여하는 단백질

- β-secretase (BACE 1), Presenilin 1 (γ-secretase),

- Amyloid β 생성물 ($A\beta_{1-40}$ 과 $A\beta_{1-42}$)
- ※ Amyloid β 제거에 관여하는 단백질
 - LRP1, RAGE, NEP, IDE.
- ※ 산화 스트레스에 관여하는 인자들
 - 뇌 조직에서 단백질 산화 화합물(PCO) 함량
 - TNF- α 와 NF- κ B p6의 발현량

2. 연구내용

가. 재료 및 시약

본 연구에 사용한 미네랄이 풍부한 천일염은 전라남도 신안군 (주)태평염 전으로부터, 자죽염은 전라남도 무안군 (주)청수식품으로부터, 미네랄이 없는 일반소금은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 또한 Anti-BACE1 rabbit monoclonal antibody과 anti-LRP1 antibody는 Epitomic, Inc. (USA)에서, Anti-P65 NF- κ B polyclonal antibody과 anti-Nepriylsin (NEP) polyclonal antibody은 Upstate Biotech, Inc (NY, USA)에서 구입하였다. Anti-RAGE rabbit polyclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)에서, Anti-IDE rabbit polyclonal antibody는 Abcam (England)에서, Anti-GAPDH rabbit polyclonal antibody 와 anti-beta-actin rabbit polyclonal antibody는 Ab Frontier (Seoul, Korea)에서, Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G는 Millipore (MA, USA)에서 구입하였다. RAT TNF- α ELISA kit와 pink-ONE는 Koma Biotech Inc. (Korea)에서, Human/Rat Amyloid (40) ELISA kit와 Human/RAT Amyloid (42) ELISA kit는 Wako Pure Chemical, Inc. (Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 trichloroacetic acid, malondialdehyde (MDA), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약은 특급 이상을 구입하여 사용하였다.

나. 황화수소 함량 측정

시료(10.0 g)을 각각 증류수(1 L)로 용해한 다음 2분 동안 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 시료용액을 제조하였다. 제조된 시료용액(430 μ L)에 생리식염수 50 μ L을 혼합하였다. 여기에 1% zinc acetate 용액 250 μ L과 증류수 250 μ L를 가한 다음 7.2 M HCl 용액에 용해된 20 mM *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine sulfate 용액 133 μ L과 1.2 M HCl 용액에 용해된 30 mM FeCl₃ 용액 133 μ L을 첨가한 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 이 반응용액을 96 웰 마이크로플레이트 리더(96 well microplate reader)를 이용하여 670 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 표준물질 NaHS (3.125-200 μ M)으로 표준곡선을 작성한 다음 이를 이용하여 소금으로부터 생성되는 황화수소 함량을 구하였다.

다. 실험동물

동물실험에 사용한 사료는 AIN-93G 기준으로 일반사료를 제조하였다. 실험군은 미네랄이 없는 일반소금 처리군(RS), 미네랄이 풍부한 천일염 처리군(SS), 그리고 자죽염 처리군 (PBS)으로 하였다. 이때 사료에 첨가된 소금 농도는 8% (w/w) NaCl 함량이 되도록 맞추어 사료를 각각 제조하였다.

본 실험에 사용된 실험동물은 Male Sprague-Dawley (SD) rats (4 week old, 체중 120-130 g) 로 Damool Science Co. (Daejeon, Korea)로 구입하여 사용하였다. 쥐들은 상대습도 55 \pm 5%, 온도 25 \pm 1 $^{\circ}$ C 12 h light-dark cycle로 한 사육실에서 일반 사료로 1주일 동안 적응시킨 후 체중을 측정하한 다음 난피법에 의해 각각의 실험군을 n=8로 나누었다. 자죽염이 Alzheimer's disease에 관련된 amyloid β 생성을 억제하거나 제거하는 효과가 있는지 알아보하고자, 각 소금에 대한 식이 기간을 달리하여 그 인자의 발현량을 조사였다. 즉 미네랄이 없는 일반소금(RS), 미네랄이 풍부한 천일염(SS), 그리고 자죽염(PBS)가 함유된 사료를 쥐에게 4주간 섭취시켰다. 또한 미네랄이 없는 일반소금(RS)과 자죽염(PBS)가 함유된 사료를 쥐에게 11주 동안 섭취시켰다. 이때 물과 식이는 *ad libitum*으로 섭취하도록 하였다.

실험동물은 희생 전 12시간 절식시킨 다음 에테르로 마취한 후 서두를 절단하여 희생시켰다. 이어 희생시킨 머리로부터 whole brain을 Guillotine 방법에 의한 분리하였으며, 분리된 whole brain은 바로 -80 $^{\circ}$ C의 deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였다.

라. 체중, 물 섭취량, 식이 섭취량 측정

각 쥐의 체중은 안정화기간이 끝난 시점을 초기 체중으로 하여 1주 1회 측정하였다. 식이 섭취량은 식이공급량에 대한 잔여량 및 흘린 양을 제외하고 계산하였으며 물섭취량은 주1회 총4주간 측정하였다.

마. Western blotting에 의한 뇌에서 단백질 발현량 측정

각 식이군으로부터 얻어진 whole brain에서 BACE1, P65 NF- κ B, LRP1, RAGE, NEP, and IDE의 단백질 발현량은 western blotting에 의해 측정하였다. 즉 분리한 whole brain 조직(0.3 g)에 0.05% triton x-10, 0.2 M HEPES (pH 7.4), 0.01 M NaF, 0.01M EDTA (pH 7.4), 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.01 M sodium pyrophosphate, 1 μ g/ml pepstain, 1 μ g/ml leupeptin, 그리고 0.1 μ g/ml aprotin을 조제된 lysis buffer 1 ml를 가한 다음 ice 상에서 Polytron (PT1200E, Kinematicca AG, Switzerland)으로 균질화시켰다. 균질화된 용액은 4°C에서 1시간 동안 서서히 교반시킨 다음 4°C에서 15,000xg으로 20분 동안 원심분리한 다음 상층액을 얻었다. 각 처리군의 단백질 함량은 Bradford 법으로 측정하였다. 각 식이군에 대한 동일한 단백질 용액 (100 μ g, 10 μ L)에 2 x Tricine sample buffer (Biorad) 10 μ L을 가하여 95°C에서 5 분 동안 denaturation 한 다음 이 용액을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하였다. 전개된 단백질들은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane I를 이동시킨 다음 이 membrane를 Tris-Buffer-Saline로 세척한 후 3% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 0.05% Tween-20 (TBST) buffer로 1시간동안 blocking 하였다. 이어 TBST 용액으로 5 분씩 3회 반복 세척된 membrane를 primary antibody들이 함유된 lypophilized buffer에 넣고 상온에서 서서히 교반시키면서 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane를 TBST 용액으로 5 분씩 3회 반복 세척한 다음 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G로 가하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후 세척된 membrane은 luminol이 함유된 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액과 반응시켰다. Primary antibody들은 BACE1 (1:1,000), P65 NF- κ B (1:1,000), LRP1 (1:1,000),

RAGE (1:1,000), NEP (1:1,000), IDE (1:1,000), beta actin (1:1,000), 그리고 GPADH (1:1,000)로 각각 희석한 lypophilized buffer를 사용하였다.

바. Amyloid beta 함량 측정

각 시료군의 뇌 조직에서 A β (1-40)과 A β (1-42) 함량은 Wako Human/rat amyloid 40 and 42 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 상기 western blotting에서 제시한 방법과 동일한 방법에 의해 각 뇌 조직으로부터 얻어진 단백질 용액(100 μ L)을 각각의 ELISA kit에 가한 다음 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 다음 상층액을 제거하고 세척하였다. 이 반응 kit에 100 μ l HRP-conjugated antibody 용액을 가하여 4°C에서 1-2시간 동안 반응시킨 다음 antibody 용액을 제거하고 세척한 kit에 100 μ l TMB 용액을 가하여 상온에서 암 조건으로 30 min 동안 반응시켰다. 이 반응 kit에 100 μ l의 stop 용액을 첨가한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료군의 뇌 조직에서 A β (1-40)과 A β (1-42) 함량은 표준물질[A β (1-40) (1-100 pmol/l)와 A β (1-42) (0.1-20 pmol/l)]을 이용하여 작성한 표준 곡선을 이용하여 구하였다.

사. TNF- α 함량 측정

각 시료군의 뇌 조직에서 TNF- α 함량은 rat TNF- α 용 ELISA kit (KOMA BIOTECH INC.)을 이용하여 측정하였다. 상기 western blotting에서 제시한 방법과 동일한 방법에 의해 각 뇌 조직으로부터 얻어진 단백질 용액(100 μ L)을 각각의 ELISA kit에 가한 다음 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 용액을 제거하고 세척하였다. 이어 이 반응 kit에 antibody (0.1 μ g/ml) 용액 100 μ l을 가하여 상온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 antibody 용액을 제거하고 세척하였다. 이 kit에 발색 용액 100 μ l 용액을 가하여 상온에서 30 min 동안 반응시켰다. 이 반응 kit에 100 μ l의 stop 용액을 첨가한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 식이군의 뇌 조직에서 TNF- α 함량은 표준물질 TNF- α 로 작성된 표준 곡선을 이용하여 구하였다.

아. 지질과산화물 함량 측정

각 식이군의 뇌 조직의 지질과산화물 함량은 TBARS 법에 의해 측정하였다. 즉, plasma 0.1 mL을 20% trichloroacetic acid가 함유된 0.6 M HCl 용액 0.5 mL와 0.67% thiobarbituric acid가 함유된 1 M NaOH 용액 0.3 mL를 가하여 혼합한 다음 95°C에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응용액을 냉각시킨 다음 *n*-butanol 0.8 mL로 분배하여 1500×g로 10 분 동안 원심 분리하였다. 얻어진 *n*-butanol 층의 흡광도는 532 nm에서 측정하였으며 이들 흡광도값은 작성된 표준용액 (malonaldehyde, MDA)의 표준곡선을 이용하여 혈장에서의 지질과산화물 함량으로 환산하였다.

자. 단백질 카르보닐화 화합물(PCOs) 함량 측정

Protein carbonyl 함량은 Reznick 와 Packer (1994) 등의 방법에 의해 측정하였다. 상기 western blotting에서 제시한 방법과 동일한 방법에 의해 뇌 조직으로부터 얻어진 단백질 2 mg에 10 mM DNPH가 함유된 2 M HCl 용액 100 µL에 가한 다음 상온 및 암실에서 1시간 동안 반응시켰으며 이때 15분 간격으로 vortex하였다. 이 반응용액에 얼음으로 냉각시킨 10% trichloroacetic acid (w/v) 1 mL를 가하여 혼합한 다음 3000×g로 10 분 동안 원심분리하였다. 얻어진 단백질 펠렛(pellet)을 ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) 용액 2 mL로 3회 반복하여 세척한 다음 이를 6 M guanidine hydrochloride (pH 2.3) 1.5 mL로 용해시켜 37°C에서 10 분 동안 반응시킨 후 370 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도값에 대한 DNPH의 molar extinction coefficient ($\epsilon = 2.2 \times 10^4 / \text{cm} \cdot \text{M}$)를 나누어 뇌 조직의 protein carbonyl 함량으로 환산하였다.

차. 통계처리

본 실험결과의 통계처리는 SPSS(v 18.0)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 결과는 집단 간 차이는 One-way ANOVA와 사후검정 (Duncan's test)과 Independent samples t-test을 실시하였으며 이 때 분석 시 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 소금의 종류에 따른 황화수소 함량 확인

황화수소(H_2S)는 NO와 CO와 같은 새로운 기능성 가스신호전달물질(gaseous transmitter)로, 혈관확장, 항염증, 항고혈압, 그리고 위궤양 등의 다양한 생리기능을 발휘한다. 특히 황화수소(H_2S)는 β -secretase 활성을 저해하는 효과가 밝혀져 Alzheimer's disease 예방 효과가 기대된다고 보고된 바 있다. 특히 본 연구팀의 선행 연구에 의하면, 우리가 매일 섭취하는 소금들 중 자죽염이 황화수소를 생성한다는 사실을 항위궤양 활성 검정에 의해 최근 밝혔다. 즉 황화수소를 생성하는 물질을 함유하고 있는 소금은 Amyloid beta 펩타이드의 생성에 관여하는 β -secretase 활성을 저해하는 효과가 있을 것으로 판단되었다. 그래서 자죽염(PBS), 천일염(SS), 그리고 일반소금(RS)을 대상으로 황화수소 함량을 조사한 결과(Fig. 2-1), 자죽염은 소금 1 kg 당 1450 mg NaHS eq.로 측정되어, 천일염과 일반소금에 비해 현저하게 높은 황화수소 함량을 나타냈다. 이는 본 연구팀의 선행 연구 결과와 일치함을 재차 확인하였다. 본 실험에 사용하고자 하는 자죽염의 경우 염도는 96.5%이고, Mg은 2,425 ppm, K은 3,849 ppm, 그리고 Ca은 1.422 ppm이었다.

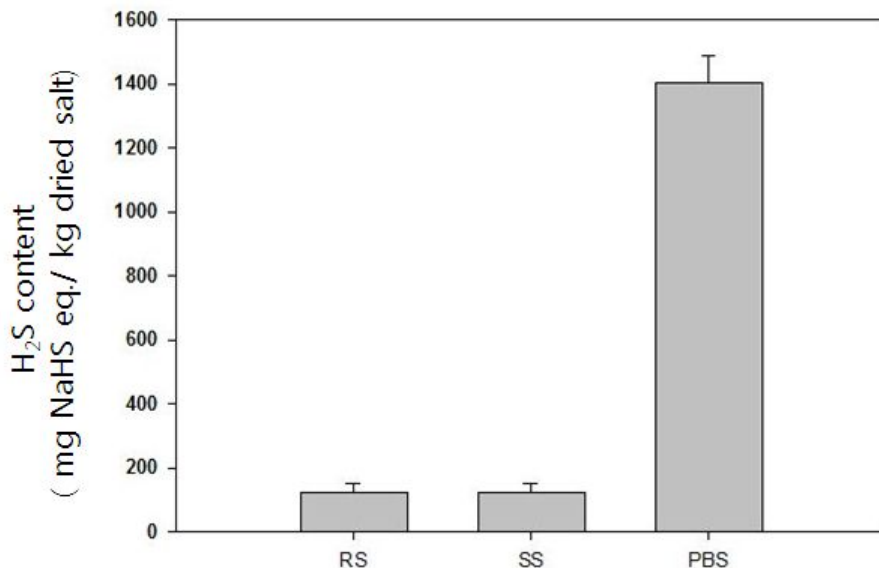


Fig. 2-1. Hydrogen sulfide (H_2S) contents of reagent salt (RS), solar sea salt (SS), and purple bamboo salt (PBS).

나. Guillotine에 의한 뇌 수집 방법 확립

동물실험을 통한 소금의 Alzheimer's disease을 평가하기 위해서는 쥐머리로부터 손상없이 신속하게 뇌를 수집하기 위한 숙련된 기술이 요구되었다. 그래서 Fig. 2-2에 제시한 바와 같이 Guillotine 방법에 의해 다수의 쥐를 희생시켜 반복 수행을 통해 뇌 분리 기술을 확립하였다.

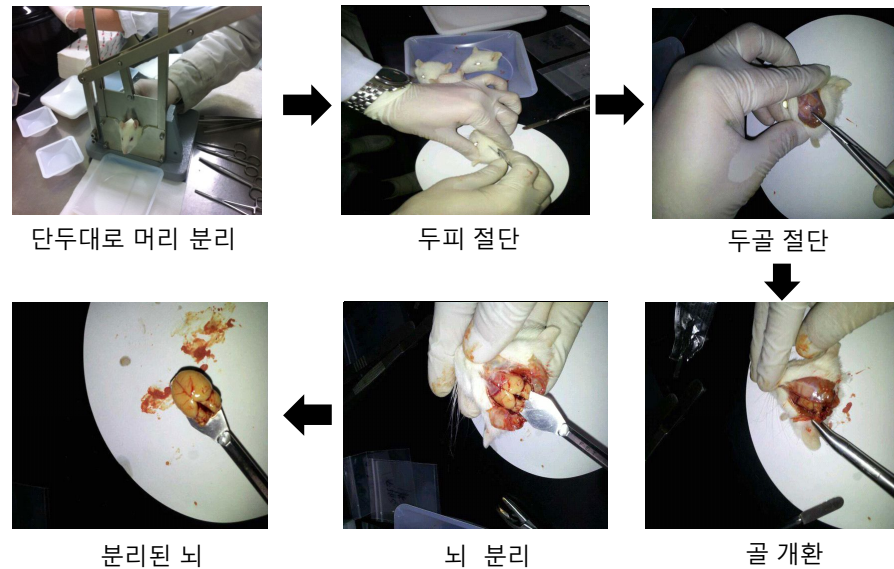


Fig. 2-2. Separation procedure of whole brain in rats by Guillotine method.

다. 4주간 고염을 섭취시킨 정상쥐에서 죽염이 Alzheimer's disease 및 뇌 건강에 미치는 영향

1) 식이섭취량, 물 섭취량, 그리고 체중 변화

황화수소를 생성하는 자죽염 (purple bamboo salt)의 Alzheimer's disease을 평가하고자, 일반소금(reagent salt, 99% 이상의 NaCl)와 미네랄이 풍부한 천일염(solar sea salt)을 비교군으로 한 동물실험을 실시하였다. 즉 자죽염(PBS), 천일염(SS), 그리고 일반소금(RS)을 첨가된 고염(8% NaCl, w/w) 사료를 각각 4주령의 정상쥐(Sprague-Dawley Dahl rat, 각 그룹 당 8 마리)에 4주 동안 섭취시켰다. 고염 식이동안 각 식이군 별 식이섭취량, 물섭취량, 그리고 체중 변화를 조사하였다. 그 결과(Table 2-1), 고염을 섭

취하는 동안 물 섭취량, 식이 섭취량 그리고 체중은 식이기간 동안 지속적인 증가하나 각 식이군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 선행 연구 결과와 유사하였다.

Table 2-1. Changes of body weight, food intake, and water intake in rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks

Groups		Diet period (week)			
		1	2	3	4
Food intake (g/day)	RS	15.1±2.9	17.9±0.7	19.9±0.3	19.5±1.3
	SS	14.4±2.8	17.9± 0.6	19.7±1.1	19.0±0.1
	PBS	14.6±3.9	19.4±1.2	20.5±0.9	20.3±0.0
Water intake (ml/day)	RS	83.2±9.9	89.2±3.1	92.8±7.9	96.2±1.6
	SS	90.6±2.1	93.4±4.3	98.4±2.5	94.0±2.8
	PBS	89.2±15.1	93.3±1.0	96.9±4.1	97.9±3.1
Body weight (g)	RS	220.2±9.7	263.1±10.0	302.3±10.8	311.7±12.6
	SS	208.8±14.6	263.6±9.5	309.1±10.1	318.1±13.4
	PBS	221.0±16.3	269.1±18.3	313.1±18.3	328.9±16.1

2) Amyloid β 의 생성에 관여하는 인자들에 미치는 영향

가) BACE-1 (β -secretase)의 발현량 비교

자죽염(PBS), 천일염(SS), 그리고 일반소금(RS)을 첨가된 고염(8% NaCl, w/w) 사료를 각각 Sprague-Dawley Dahl rat에 4주동안 섭취시켜 얻어진 whole brain을 대상으로 BACE-1 발현량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-3), 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)와 자죽염식이군(PBS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 BACE의 발현량을 나타냈다($P < 0.05$). 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)와 자죽염식이군(PBS) 간의 BACE의 발현량은 유의적인 차이가 관찰되지 않았다($P < 0.05$). 소금이 뇌 조직에서 BACE-1 발현에 얼마나 영향을 주는지는 아직 조사된 바 없으나 소금의 종류에 따라 BACE-1 발현에 차이가 있음을 알 수 있었다. 특히 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 BACE-1 발현량이 낮았던 것으로 보아 소금에 함유된 미네랄이 BACE-1 발현을 줄여주는데 기여한

것으로 시사되었다. 황화수소는 BACE-1 발현을 저해하여 Amyloid β 생성을 억제한다고 보고된 바 있다. 황화수소를 다량 생성하는 자족염은 미네랄이 풍부한 천일염에 비해 낮은 BACE-1 발현량을 나타낼 것으로 예상되었다. 그러나 자족염식이군은 미네랄이 풍부한 천일염식이군에 비해 약간 낮은 BACE 발현량을 보였을 뿐 두 식이군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 소금을 섭취시킨 식이 기간이 짧았기 때문인 것으로 여겨진다.

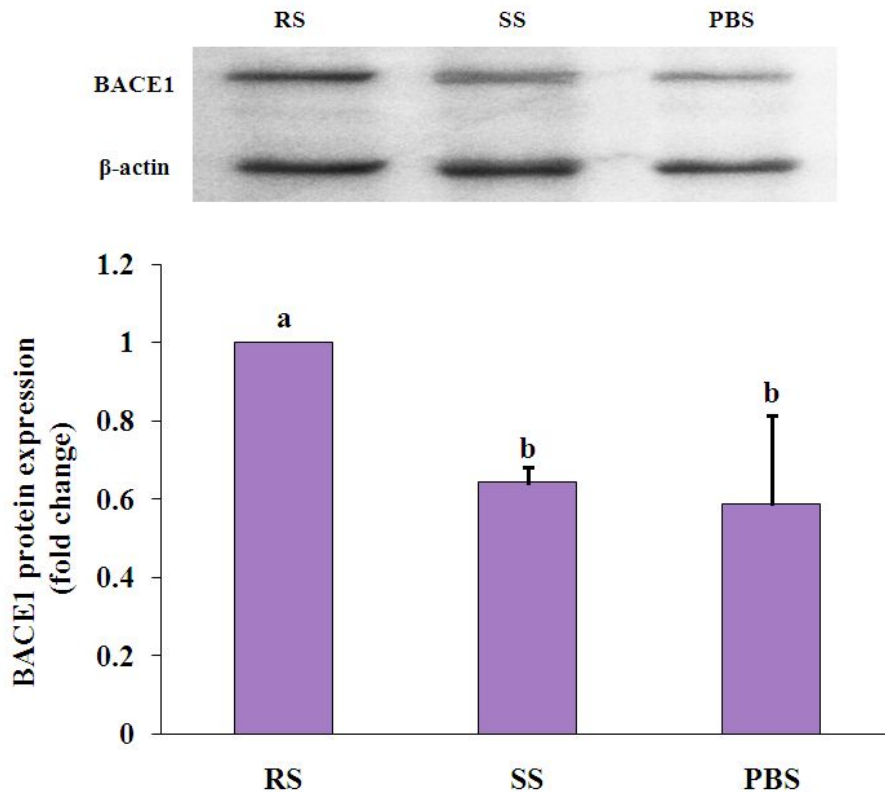


Fig. 2-3. Expression levels of BACE1 protein in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference among them at $p < 0.05$ (a>b).

나) Amyloid β 의 함량

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 A β 1-40과 A β 1-42 등의 Amyloid β 의 함량을 조사하였다. 그 결과 (Fig. 2-4), A β 1-40과 A β 1-42 등의 Amyloid β 의 함량은 미네랄이 없는 일반소금(RS) > 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS) > 자족염식이군(PBS)의

순으로 낮게 나타났다. 이는 BACE-1의 발현량에서 보였던 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 그러나 각 식이군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 ($P < 0.05$). 자죽염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 Amyloid β 생성을 줄여주는 효과가 있을 것으로 기대되나 소금 섭취 기간이 짧아 현저한 차이를 관찰하는 데는 실패하였다.

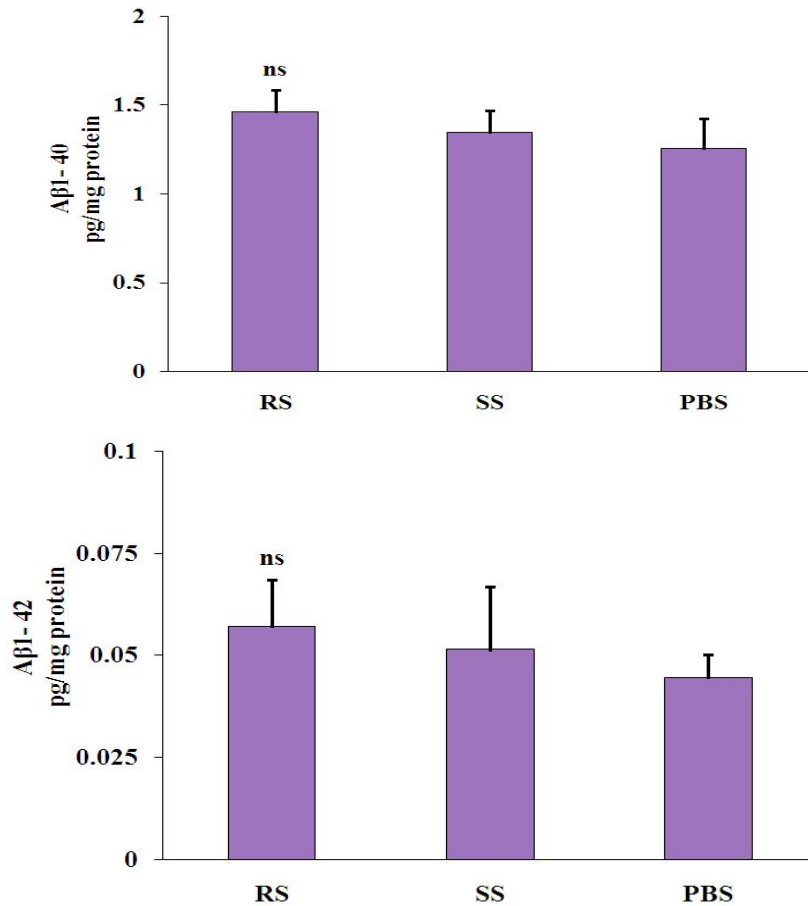


Fig. 2-4 Contents of A β 1-40 and A β 1-42 in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

3) Amyloid β 의 제거에 관여하는 인자들에 미치는 영향

가) RAGE의 발현량 비교

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 RAGE의 발현량을 조사한 결과(Fig. 2-5), 미네랄이 풍부한 천일염식

이군(SS)과 자숙염식이군(PBS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 RAGE의 발현량을 나타냈다($P < 0.05$). 그러나 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)과 자숙염식이군(PBS) 간의 RAGE의 발현량은 유의적인 차이가 관찰되지 않았다($P < 0.05$). 이는 소금의 종류에 따른 BACE 발현량 차이를 나타냈던 결과와 일치하였다. 혈액 내 Amyloid β 함량이 높을 경우 blood-brain barrier에 존재하는 RAGE의 발현량이 증가한다고 알려져 있다. 미네랄이 풍부한 천일염과 자숙염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 낮은 RAGE 발현량을 보였던 것으로 보아 뇌 조직 외 타 조직에서 Amyloid β 분비량이 적어 혈액에 존재하는 Amyloid β 함량도 낮았을 것으로 추정된다. 그러나 자숙염은 미네랄이 풍부한 천일염에 비해 RAGE 발현량이 낮은 경향을 보였으나 두 식이군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 소금의 종류에 따른 BACE-1 발현량 차이를 나타냈던 결과와 마찬가지로 소금 섭취 기간이 짧았기 때문인 것으로 여겨진다.

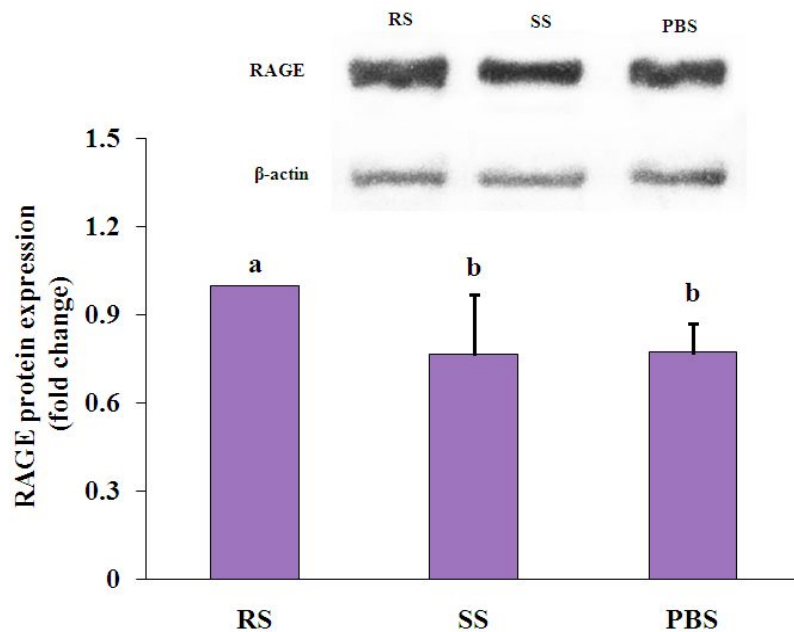


Fig. 2-5. Expression levels of RAGE protein in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

나) LRP1의 발현량 비교

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상

으로 LRP1의 발현량을 조사한 결과(Fig. 2-6), LRP1의 발현량은 자숙염식이군(PBS) > 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS) > 미네랄이 없는 일반소금(RS) 순으로 나타났으나 각 식이군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 ($P < 0.05$). LRP1는 blood-brain barrier에 존재하는 단백질로, 뇌 조직에 있는 Amyloid β 를 조직 밖으로 제거하는데 관여한다. 미네랄이 풍부한 천일염과 자숙염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 LRP1 발현량이 높았던 것으로 보아 뇌 조직 내에 있는 Amyloid β 를 줄여주는데 긍정적인 영향을 준 것으로 시사된다.

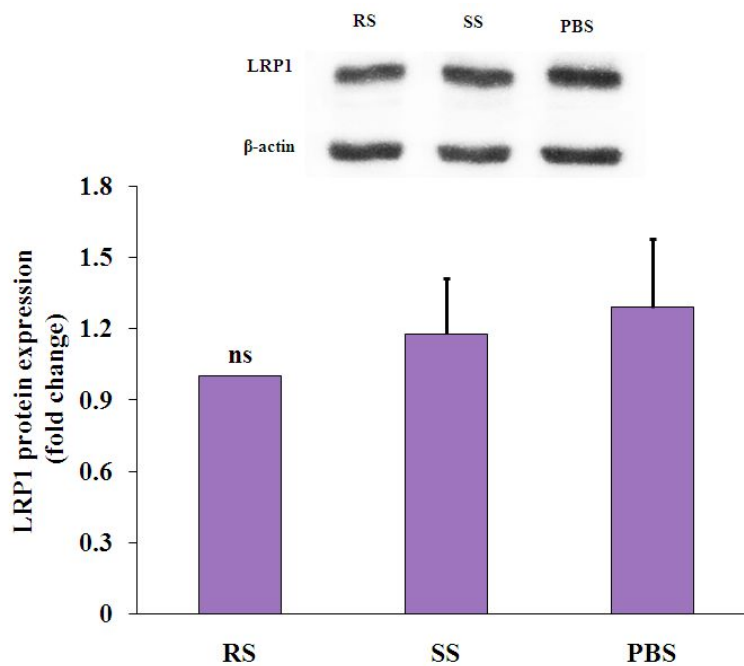


Fig. 2-6. Expression levels of LRP1 protein in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD ($n=8$). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ ($a > b$).

4) 산화 스트레스에 미치는 영향

가) Protein carbonyl 함량

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 protein carbonyl 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-7), protein carbonyl 함량은 자숙염식이군(PBS)가 약간 낮았으나 각 식이군 간의 유의

적인 차이는 관찰되지 않았다($P < 0.05$). 과도한 소금 섭취는 우리 몸에 산화 스트레스에 영향을 준다고 잘 알려져 있다. 본 연구팀의 선행 연구에 의하면, 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 4주간 고염 식이를 한 쥐의 근육조직이나 지방조직에서 낮은 protein carbonyl 함량을 나타냈으며 자축염은 미네랄이 풍부한 천일염 보다 더 낮은 protein carbonyl 함량을 보였다. 그러나 4주간 고염 식이를 한 정상쥐의 뇌 조직에서는 소금의 종류에 따라 현저한 protein carbonyl 함량 차이를 보이지 않았던 것으로 보아 뇌 조직은 지방조직이나 근육조직 등의 타 조직에 비해 과도한 소금섭취로부터 오는 산화 스트레스를 빠르게 대응한 것으로 추정되며, 이로 인해 단백질 산화물인 protein carbonyl 함량이 낮았던 것으로 시사되었다. 뇌 조직에서 소금의 종류에 따라 산화 스트레스로부터 유도되는 protein carbonyl 함량에 영향을 주는지 알아보기 위해서는 장시간 소금 섭취를 통한 실험이 요구된다.

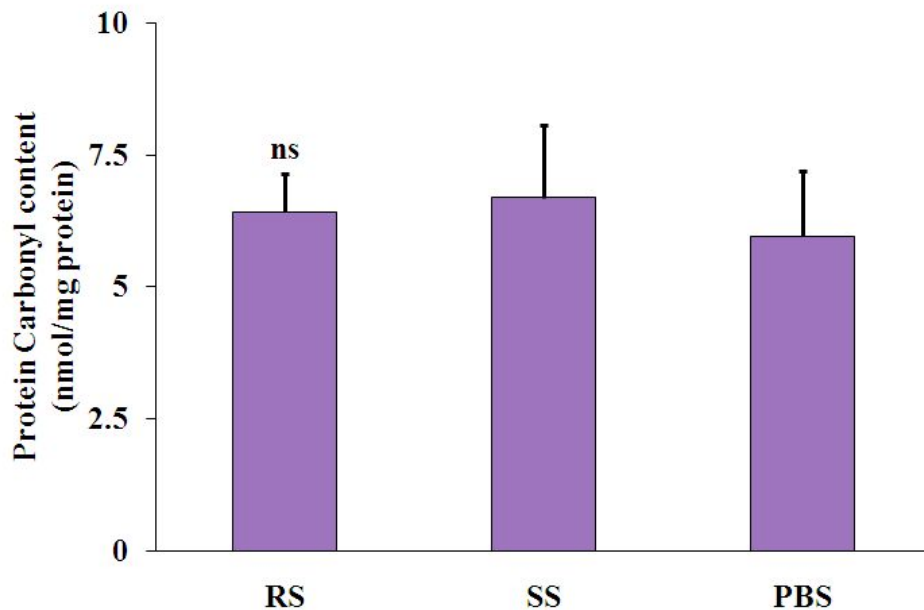


Fig. 2-7. Protein carbonyl contents in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD ($n=8$). The different characters indicate significant difference at $p<0.05$ ($a>b$).

나) TNF- α 함량

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대

상으로 TNF- α 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-8), 자숙염식이군(PBS)과 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)는 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 TNF- α 함량을 나타냈다($P < 0.05$). 과도한 소금 섭취는 우리 몸에 산화 스트레스를 주고 염증 반응에 관여하는 TNF- α 함량을 증가시킨다고 알려져 있다. 이는 본 연구팀의 선행 연구에서 밝힌 바와 같이 자숙염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 4주간 고염식을 한 쥐의 근육조직이나 지방조직에서 낮은 TNF- α 함량을 나타낸 결과와 일치하였다. 자숙염은 미네랄이 풍부한 소금에 비해 산화 스트레스를 크게 줄여 준다는 선행 연구 결과로부터 자숙염이 미네랄이 풍부한 소금 보다 매우 낮은 TNF- α 함량을 보일 것으로 예상하였다. 그러나 두 식이군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

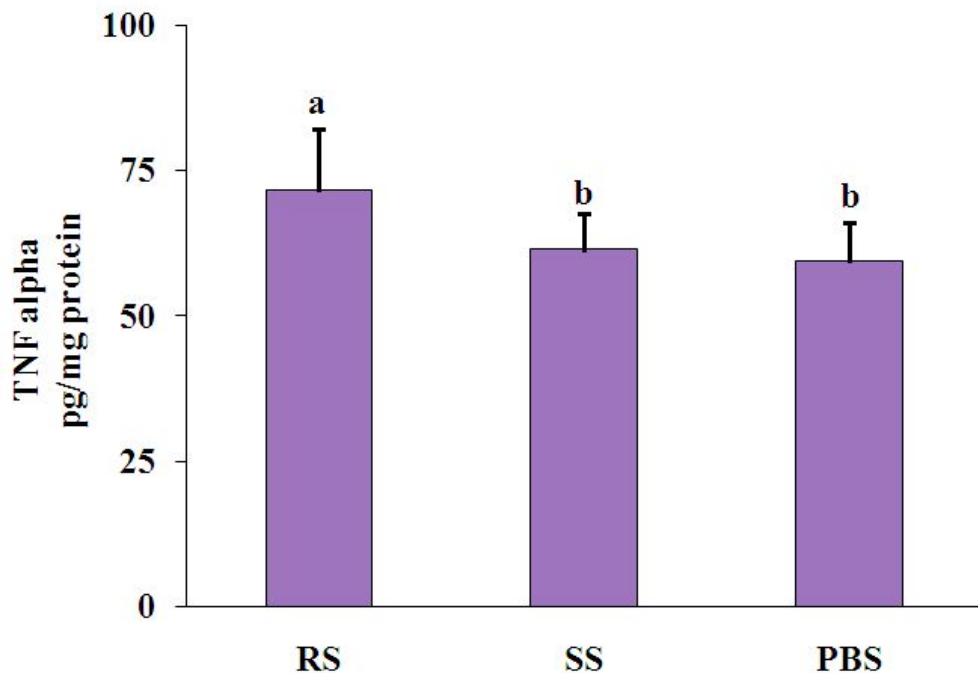


Fig. 2-8. TNF- α contents in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

다) NF-kB 함량

소금의 종류를 달리하여 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 NF-kB p65 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-9), NF-kB p65 함

량은 자숙염식이군(PBS)이 가장 낮았으며, 그 다음으로는 미네랄이 풍부한 천일염식이군(SS)이었으며, 미네랄이 없는 일반소금(RS)이 가장 높게 나타났다($P < 0.05$). 이는 TNF- α 함량에 나타냈던 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 또한 자숙염과 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 4주간 고염식을 한 쥐의 근육조직이나 지방조직에서 낮은 NF-kB p65 함량을 나타낸 결과와 일치하였다. 자숙염이나 미네랄이 풍부한 소금은 미네랄이 없는 소금에 비해 뇌 조직에서도 산화 스트레스에 영향을 적게 준다는 사실을 재차 확인되었다.

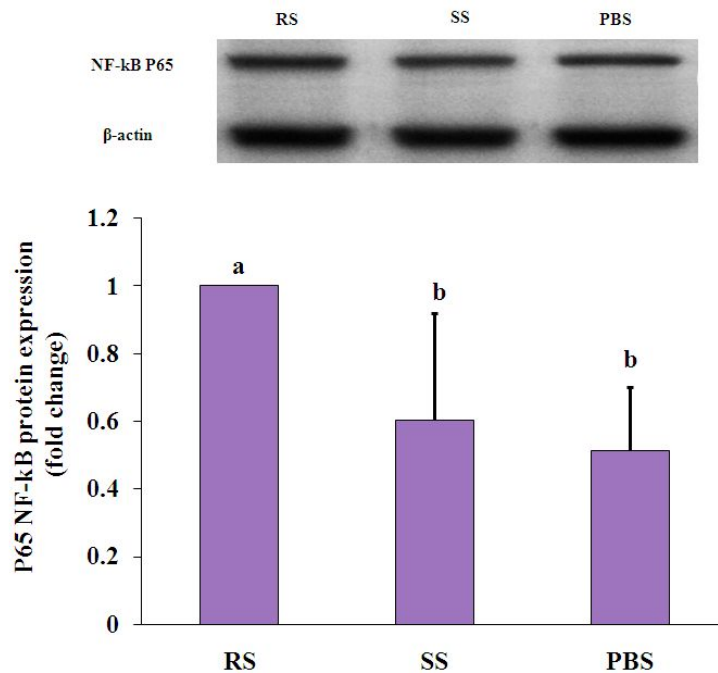


Fig. 2-9. Expression levels of NF-kB p65 in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

이상의 결과를 요약해 보면 다음과 같다. 소금의 종류에 따라 Alzheimer's disease에 미치는 영향에 대해 알아보고자, 자숙염, 미네랄이 풍부한 천일염, 그리고 미네랄이 없는 일반소금을 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 뇌 조직을 대상으로 Alzheimer's disease의 주요 원인 중 하나로 알려진 Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거에 관여하는 인자들을 조사하였다. 그 결과, 미네랄이 풍부한 천일염과 자숙염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 Amyloid beta 펩타이드 생성에 관여하는 BACE-1의 발현량이 적고 그 생

성물인 A β 1-40과 A β 1-42 등 함량도 낮았다. 또한 이 소금들은 Amyloid beta 펩타이드 제거에 관여하는 RAGE와 LRP1의 발현량에도 긍정적인 영향을 주는 것으로 나타났다. 미네랄이 풍부한 천일염과 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 산화 스트레스로부터 오는 TNF- α 와 NK-kB p65의 발현량도 유의적으로 낮았다. 그러나 4주간 고염을 섭취시킨 정상쥐 뇌 조직을 이용한 Amyloid beta 생성에 있어서 소금의 종류 간의 확연한 차이가 관찰되지 않았다.

본 연구를 통해 소금이 Alzheimer's disease 유발에 어느 정도로 영향을 주는지는 단정할 수 없지만, 소금의 종류에 따라 Alzheimer's disease 관련된 주요 인자 중 Amyloid beta 펩타이드 생성에 영향을 줄 수 있었다. 소금의 종류에 따라 Alzheimer's disease에 미치는 영향에 대해 보다 현저한 차이를 알아보기 위해서는 정상쥐에 단기간보다 장기간 동안 섭취시켜 얻어진 뇌 조직을 대상으로 한 Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거에 관여하는 인자들에 대한 조사가 요구되었다.

한편 미네랄이 풍부한 천일염은 미네랄이 없는 소금에 비해 뇌에서 Amyloid beta 펩타이드 생성을 줄여주고 산화 스트레스를 줄여주는 긍정적인 영향을 줄 수 확인하였다. 그러나 미네랄이 풍부한 천일염과 미네랄이 없는 일반소금 간의 Alzheimer's disease에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 매우 오랜 기간 동안 섭취시켜야만 그 차이를 확인할 수 있을 것으로 판단되었다.

그래서 황화수소를 생성하는 자죽염은 미네랄이 풍부한 천일염 등의 다른 소금에 비해 더욱 Amyloid beta 펩타이드 생성을 억제하고 산화 스트레스를 줄여 주는 효과를 나타냈다. 그래서 자죽염의 Alzheimer's disease를 예방하는 효과를 밝혀보고자, 정상쥐에 고염을 11주 동안 섭취시켜 얻어진 뇌를 대상으로 Alzheimer's disease의 주요 원인 중 하나인 Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거에 관여하는 인자들을 조사하고자 하였다.

라. 11주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐에서 자죽염이 Alzheimer's disease 및 뇌 건강에 미치는 영향

1) 식이섭취량, 물 섭취량, 그리고 체중 변화

황화수소를 생성하는 자죽염 (purple bamboo salt)의 뇌 건강 기능성을 평가하고자, 미네랄이 없는 일반소금(reagent salt, 99% 이상의 NaCl)을 비교군으로 한 동물실험을 실시하였다. 즉 자죽염(PBS), 그리고 일반소금(RS)을 첨가된 고염(8% NaCl, w/w) 사료를 각각 4주령의 정상쥐 (Sprague-Dawley Dahl rat, 각 그룹 당 8 마리)에 11주 동안 섭취시켰다. 고염 식이동안 각 식이군 별 식이섭취량, 물섭취량, 그리고 체중 변화를 조사하였다. 그 결과, 고염을 섭취하는 동안 물 섭취량, 식이 섭취량 그리고 체중은 식이기간 동안 지속적인 증가하나 각 식이군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 이는 앞서 4주 동안 고염 섭취하였던 실험 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

Table 2-2. Changes of body weight, food intake, and water intake in rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks

Items	Groups	Diet period (week)					
		1	3	5	7	9	11
Food intake (g/day)	RS	14.9±2.8	19.2±0.8	19.5±0.2	18.4± 0.5	18.1±0.5	18.5±0.2
	PBS	15.7±2.7	19.6±0.5	19.6±0.7	19.0±0.8	18.5±0.6	18.2± 0.5
Water intake (ml/day)	RS	90.8±1.9	97.0±2.7	82.8±0.4	76.3±2.0	74.0±2.4	73.3±3.3
	PBS	86.9±13.3	97.0±4.3	81.7±5.8	79.6±3.6	74.1±3.2	74.4±1.8
Body weight (g)	RS	167.6±6.5	262.0±18.3	322.6±16.1	373.8±18.8	412.3±23.0	438.6±27.3
	PBS	219.2±14.7	307.4±21.7	359.6±25.4	394.8±30.6	417.0±34.4	455.2±36.3

2) Amyloid β의 생성에 관여하는 인자들에 미치는 영향

가) BACE-1 (β-secretase)의 발현량 비교

뇌에서 BACE-1는 APP를 분해하여 Amyloid β를 생성하는데 관여하는 주요 효소로 알려져 있다. 그래서 자죽염(PBS)과 일반소금(RS)을 첨가된 고염

(8% NaCl, w/w) 사료를 각각 Sprague-Dawley Dahl rat에 11주 동안 섭취시켜 얻어진 whole brain을 대상으로 BACE 발현량을 조사한 결과(Fig. 2-10), 자죽염식이군(PBS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 BACE-1의 발현량을 나타냈다($P < 0.05$). 이는 4주 동안 섭취시켜 행해진 결과와 일치하였으며, 그 차이가 현저하였다. 앞서 언급한 바와 같이 황화수소는 BACE-1 발현을 저해하여 Amyloid β 생성을 억제한다고 알려져 있다. 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 낮은 BACE-1 발현량을 나타내 자죽염의 BACE-1 발현 억제는 황화수소에 기인한 것으로 시사되었다.

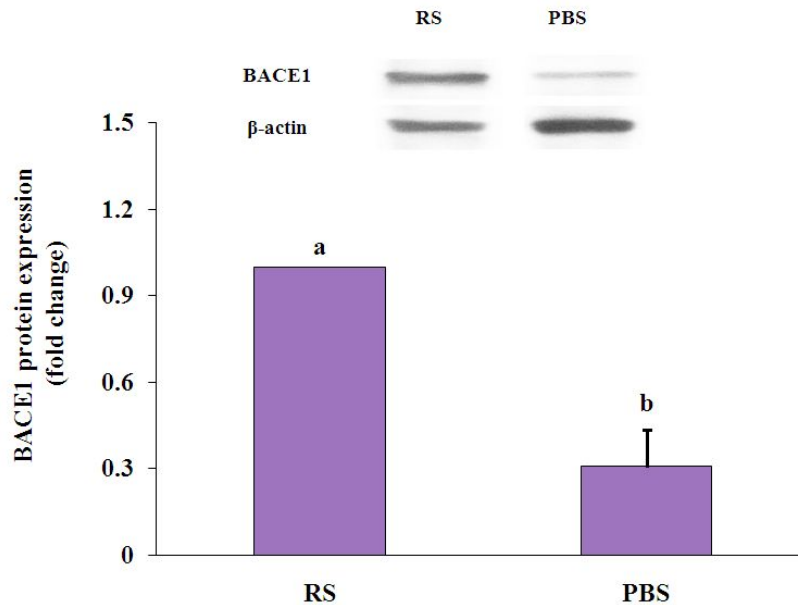


Fig. 2-10. Expression levels of BACE1 protein in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS and PBS for 11 weeks. The data are expressed as mean \pm SD ($n=8$). The different characters indicate significant difference between them at $p < 0.05$ ($a > b$).

나) Amyloid β 의 함량

뇌에서 APP는 BACE (β -secretase)와 γ -secretase 작용에 의해 Amyloid β 가 생성되는데 Amyloid β 생성물로는 $A\beta_{1-40}$ 과 $A\beta_{1-42}$ 로 알려져 있다. 그래서 자죽염(PBS)과 미네랄이 없는 일반소금(RS)을 12주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 Amyloid β 생성물인 $A\beta_{1-40}$ 과 $A\beta_{1-42}$ 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-11), 뇌에서 $A\beta_{1-40}$ 함량의 경우

자죽염식이군(PBS)이 미네랄이 없는 일반소금(RS)보다 낮은 함량을 나타냈으나 두 식이군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다($P < 0.05$). 반면에 뇌에서 A β 1-42 함량의 경우 자죽염식이군(PBS)이 미네랄이 없는 일반소금(RS)보다 현저하게 낮은 함량을 나타냈다($P < 0.05$).

Amyloid β 는 APP가 BACE-1와 γ -secretase의 작용에 의해 생성되는데 A β 1-40가 가장 많이 생기고, A β 1-42가 약 10% 정도 생성된다고 한다. 특히 A β 1-42는 소수성을 띄기 때문에 Amyloid β aggregation이 잘 형성될 뿐만 아니라 독성이 강하다고 알려져 있다. 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 BACE-1의 발현을 억제할 뿐만 아니라 Amyloid β 생성 물질을 생성하더라도 Amyloid β aggregation을 잘 형성하게 하는 A β 1-42의 생성을 줄여주는 효과가 있음을 확인하였다.

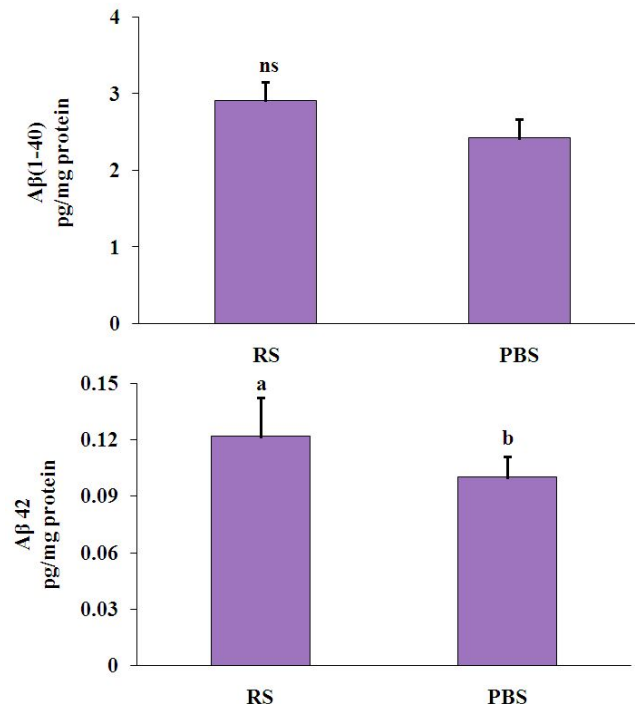


Fig. 2-11. Contents of A β 1-40 and A β 1-42 in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD ($n=8$). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ ($a>b$). ^{ns}No significant difference between RS and PBS at $p < 0.05$ ($a>b$).

2) Amyloid β 의 제거에 관여하는 인자들에 미치는 영향

가) RAGE의 발현량

RAGE는 혈관 내에 변형된 Advanced glycation end products와 Amyloid- β 가 증가하게 되면 뇌혈관이나 신경세포에서 그 발현량이 증가할 뿐만 아니라 세포의 산화 손상과 염증을 유발시킨다고 알려져 있다. 그래서 자축염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 RAGE의 발현량을 조사한 결과(Fig. 2-12), 자축염식이군(PBS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 RAGE의 발현량을 나타냈으며($P < 0.05$), 이는 4주 동안 고염을 섭취시켜 얻어진 결과와 일치하였다. 또한 뇌 조직에서 자축염식이군(PBS)의 RAGE 발현량이 낮았던 것으로 보아 자축염 섭취가 혈관 내에 산화 스트레스 및 염증 반응을 적게 주어 산화로 인해 변형된 Advanced glycation end products와 Amyloid- β 가 적게 생겨 RAGE 발현량이 적었던 것으로 시사되었다. 그로 인해 뇌혈관이나 신경세포에서 뇌 세포에서도 산화 스트레스와 염증 또한 적게 발생했을 가능성이 강하게 시사되었다. 본 실험에서 자축염이 미네랄이 없는 일반소금에 비해 현저하게 낮은 RAGE 발현량을 확인할 수 있었다.

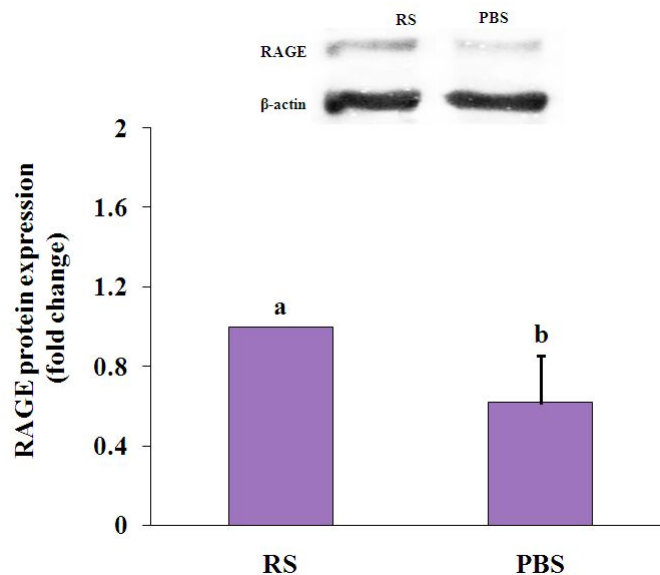


Fig. 2-12. Expression levels of RAGE protein in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS and PBS for 11 weeks. The data are expressed as mean \pm SD ($n=8$). The different characters indicate significant difference at $p<0.05$ ($a>b$).

나) LRP1의 발현량 비교

LRP1은 blood-brain barrier에서 뇌조직으로부터 Amyloid- β 펩타이드를 제거하는 첫 단계에 관여하는 중요한 수용체로 알려져 있다. 자숙염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 LRP1의 발현량을 Western blotting에 의해 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-13), 자숙염식이군(PBS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 높은 LRP1의 발현량을 나타냈다($P < 0.05$). 이는 고염을 4주 동안 섭취시킨 정상쥐의 뇌에서 소금의 종류에 따라 확인한 LRP1의 발현량 차이를 확인하지 못했으나 이 보다 긴 11주간 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐의 뇌에서는 두 그룹 간에 현저한 차이를 나타냈다. 그러므로 자숙염은 미네랄이 없는 소금에 비해 blood-brain barrier에서 LRP1의 발현량을 높여 뇌 조직에 존재하는 Amyloid β 를 그 밖으로 제거하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

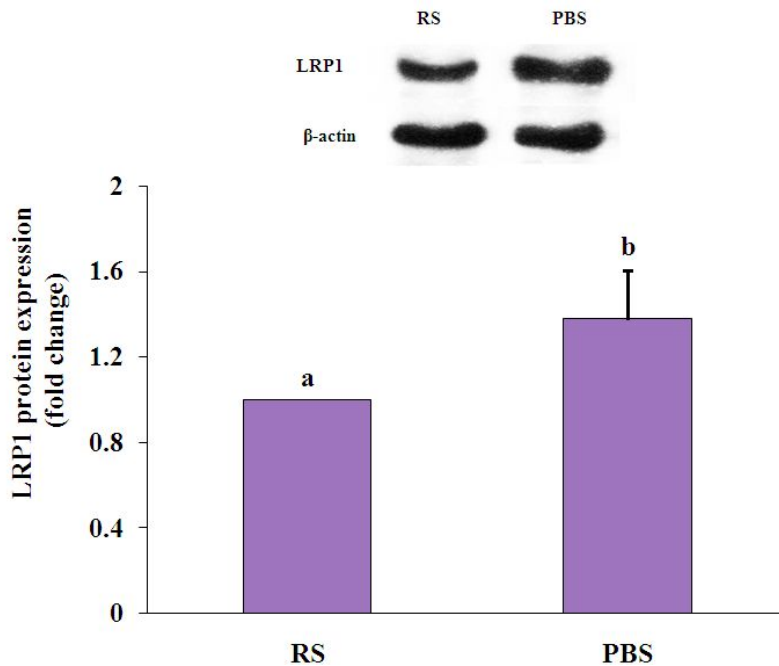


Fig. 2-13. Expression levels of LRP1 protein in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

다) NEP와 IDE의 발현량 비교

자죽염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 NEP와 IDE의 발현량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-14), 자죽염식이군(PBS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 NEP와 IDE의 발현량을 나타냈다($P < 0.05$). Amyloid β 축적은 Amyloid β 생성과 제거 간의 불균형으로부터 생긴다고 알려져 있다. Alzheimer's disease 환자의 경우 뇌 조직에서 Amyloid β 제거에 관여하는 NEP와 IDE의 발현량이 줄어든다고 보고되었으며, 또한 NEP와 IDE의 overexpression시켰을 경우 Amyloid β 함량이 줄어든다는 논문이 다수 보고되었다. 그러므로 뇌 조직에서 NEP와 IDE의 높은 발현은 Amyloid β 가 제거되어 Alzheimer's disease을 예방하는 효과가 기대된다. 그런데 최근 타 연구팀의 연구 결과에 의하면, 대뇌(cerebral cortex)에서는 Amyloid β 함량과 Amyloid β 제거에 관여하는 NEP와 IDE 간의 양의 상관관계를 갖는다고 보고하였다. 특히 해마보다는 대뇌에서 Amyloid β 함량이 높을 경우 NEP와 IDE 유전자의 발현량은 높다고 하였다.

자죽염은 Amyloid β 생성에 관여하는 BACE 발현을 저해하거나 Amyloid β 가 생성되어도 할지라도 초기 그 제거에 관여하는 LRP1의 발현량을 높았던 것으로 보아 뇌 조직에서 Amyloid β 함량이 낮았던 것으로 시사되었다. 특히 본 실험에 사용했던 뇌 조직은 전체로, 대뇌가 큰 비중을 차지하고 있다. 그러므로 자죽염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 뇌 조직에서 Amyloid β 함량이 현저하게 낮았기 때문에 NEP와 IDE 유전자의 발현량도 적었던 것으로 시사되었다.

2) 산화 스트레스에 미치는 영향

가) Protein carbonyl 함량

자죽염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 protein carbonyl 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-15), 앞서 4주 동안 고염을 섭취시킨 정상쥐의 뇌에서 protein carbonyl 함량은 두 식이군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았으나 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 뇌 조직에서는 두 식이군 간의 유의적인 차이가 관찰되었다($P < 0.05$). 이는 본 연구팀의 선행 연구와 같이 근육조직이나 지방조직에서 낮은 protein carbonyl 함량을 나타냈던 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

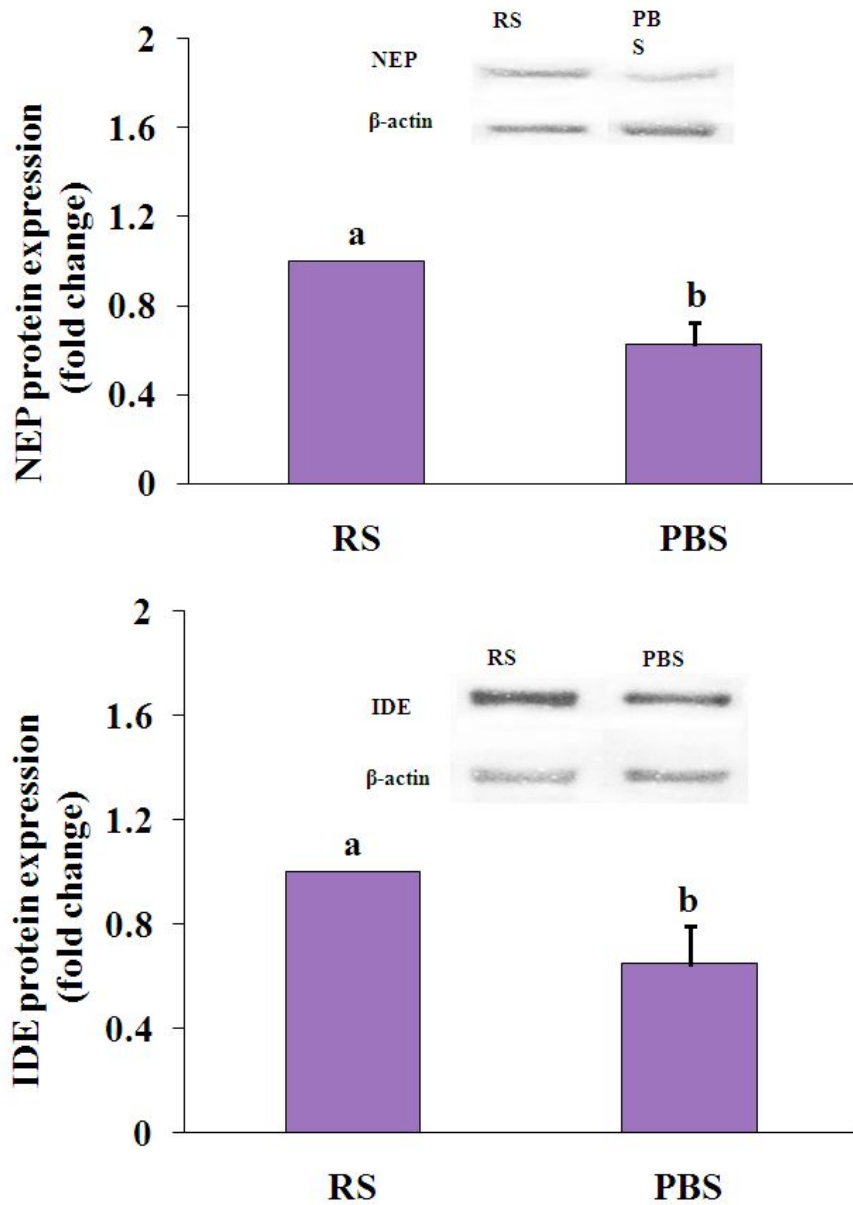


Fig. 2-14. Expression levels of NEP and IDE protein in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS and PBS for 11 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

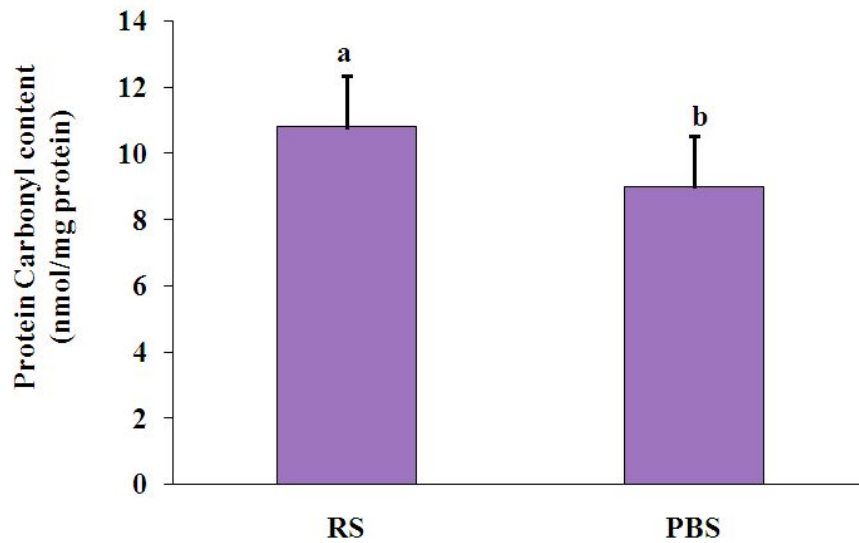


Fig. 2-15. Protein carbonyl contents in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS and PBS for 11 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

나) TNF- α 함량

자죽염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 TNF- α 함량을 조사한 결과(Fig. 2-16), 자죽염식이군(PBS)과 은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 TNF- α 함량을 나타냈다($P < 0.05$). 이 결과는 앞서 4주 동안 섭취시켜 행했던 결과와 일치하였다. 자죽염이 미네랄이 없는 소금보다 매우 낮은 TNF- α 함량을 보여 산화 스트레스를 적게 준 것으로 해석되었다.

다) NF- κ B 함량

자죽염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 whole brain을 대상으로 NF- κ B p65 함량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2-17), 자죽염식이군(PBS)은 미네랄이 없는 일반소금(RS)에 비해 유의적으로 낮은 NF- κ B p65 발현량을 나타냈다. 이는 4주 동안 고염을 섭취시킨 쥐에서 얻어진 결과와 일치하였다. 자죽염은 미네랄이 없는 소금에 비해 뇌 조직에서도 산화 스트레스에 영향을 적게 준다는 사실을 재차 확인하였다.

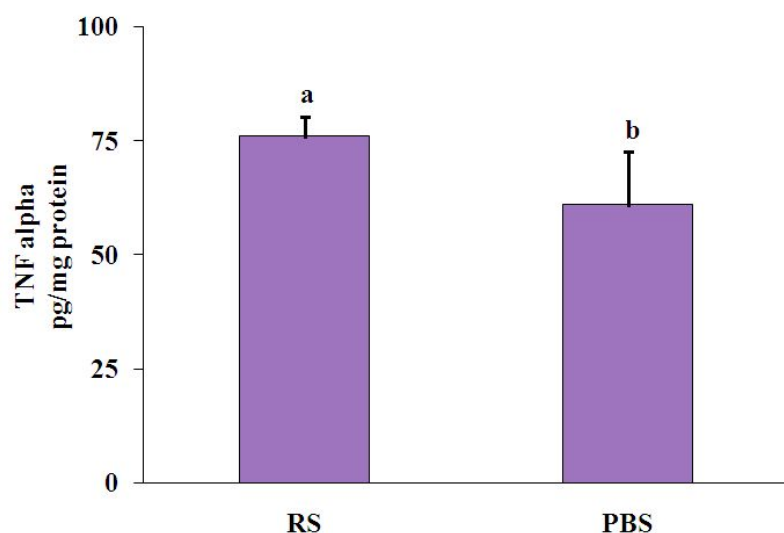


Fig. 2-16. TNF- α contents in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS and PBS for 11 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

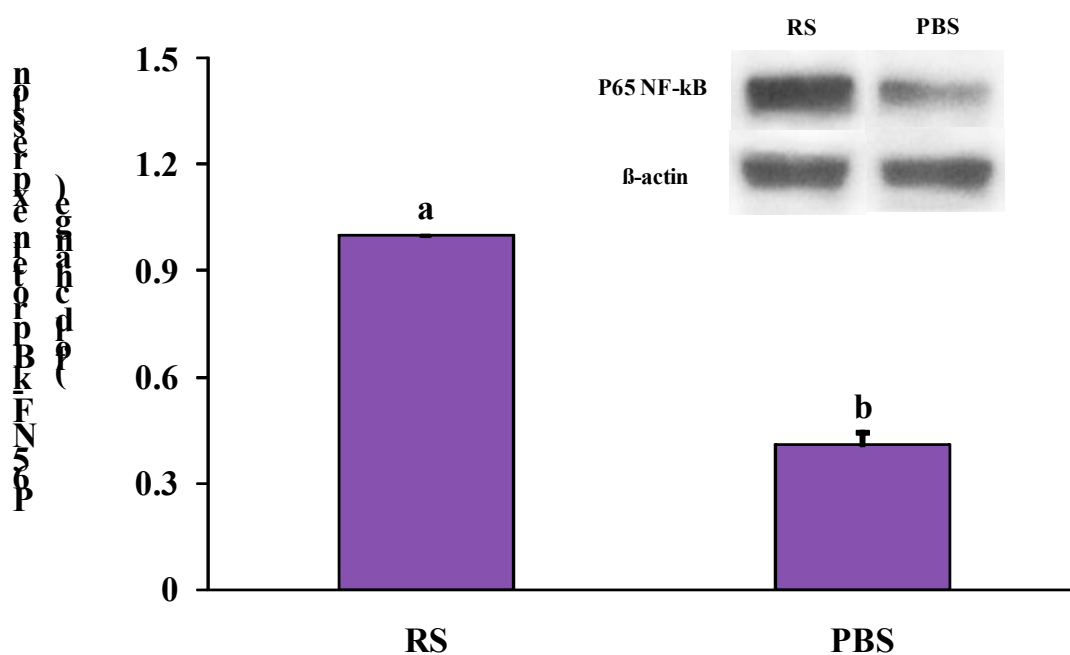


Fig. 2-17. Expression levels of NF- κ B p65 in the brains of rats fed diets containing 8% NaCl of RS, SS, and PBS for 4 weeks. The data are expressed as mean \pm SD (n=8). The different characters indicate significant difference at $p < 0.05$ (a>b).

이상의 결과를 요약해 보면 다음과 같다. 자숙염과 미네랄이 없는 일반소금을 11주 동안 섭취시킨 정상쥐의 뇌 조직을 대상으로 Alzheimer's disease의 주요 원인 중 하나로 알려진 Amyloid beta 펩타이드의 생성 및 제거에 관여하는 인자들을 조사하였다. 그 결과, 자숙염식이군은 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 Amyloid beta 펩타이드 생성에 관여하는 BACE-1의 발현량이 현저하게 낮았으며, 그 생성물인 A β 1-42 함량도 매우 낮았다. 또한 Amyloid beta 펩타이드 제거에 관여하는 RAGE와 LRP1의 발현량도 매우 낮음을 확인하였다. 자숙염식이군이 미네랄이 없는 일반소금식이군에 비해 Amyloid β 함량이 낮았던 것으로 보아 그 제거에 관여하는 인자인 NEP와 IDE 발현량도 높을 것으로 예상되었으나 미네랄이 없는 일반소금식이군이 자숙염식이군에 비해 높았다. 이는 최근 대뇌에서 NEP와 IDE의 발현량은 Amyloid β 농도 의존적으로 증가한다는 보고와 일치하였다. 자숙염은 미네랄이 없는 일반소금에 비해 산화 스트레스로부터 오는 TNF- α 와 NK-kB p65의 발현량도 유의적으로 낮았으며, 그 산화 생성물인 protein carbonyl 함량도 현저하게 낮았다.

본 연구 결과에서는 소금이 Alzheimer's disease 유발에 어느 정도로 영향을 주는지는 단정할 수 없다. 다만 소금의 종류에 따라 Alzheimer's disease 관련된 주요 인자 중 Amyloid beta 펩타이드 생성에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 특히 본 연구에서 행해진 4주간 고염을 섭취시킨 정상쥐의 뇌 조직에서 미네랄이 풍부한 천일염이 미네랄이 없는 소금에 비해 Amyloid beta 펩타이드 생성을 줄여주고 산화 스트레스를 줄여주는 긍정적인 영향을 줄 수 있었다. 그러므로 소금이 Alzheimer's disease 관련된 주요 인자인 Amyloid beta 펩타이드 생성에 얼마나 영향을 주는지에 대한 연구는 추후 수행되어야만 한다.

본 연구 수행에서 얻어진 매우 흥미로운 결과는 자숙염이 미네랄이 없는 일반소금에 비해 Alzheimer's disease에 관여하는 주요 인자인 Amyloid beta를 줄여주는 효과를 입증한 것이다. 특히 자숙염은 일반소금에 비해 산화 스트레스를 적게 주고, Amyloid beta 펩타이드 생성에 관여하는 인자인 BACE 발현을 억제할 뿐만 아니라 그 제거에 관여하는 RAGE와 LRP1 발현

을 높여 Amyloid beta 함량을 줄여 주는 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히 4주 섭취 보다 긴 11주 섭취에서 소금의 종류에 따른 Amyloid beta 생성에 미치는 영향은 더 뚜렷하였다. 그리고 황화수소는 Amyloid beta 생성에 직접적으로 관여하는 BACE1의 발현을 줄여주는 효과가 있다고 보고된 바와 같이, 황화수소를 생성하는 물질을 다량 함유하고 있는 자죽염의 Amyloid beta 생성 억제 효과는 황화수소가 주된 원인물질일 가능성이 강하게 시사되었다. 그러므로 우리는 소금을 매일 섭취하여야만 하는데, 장기간 소금 섭취에 있어서 자죽염 섭취는 기타 일반 소금에 비해 Alzheimer's disease을 예방하는데 더욱 효과가 있을 것으로 시사되었다. 장기간 자죽염 섭취가 기타 일반 소금에 비해 amyloid β aggregation, acetylcholine 함량, neurofibrillary tangle에 얼마나 영향을 주는지 과학적으로 입증은 통해, 자죽염이 소금섭취로부터 오는 Alzheimer's disease를 줄여 주는 효과를 밝히고자 한다.

자죽염과 죽염과 같은 열처리가공소금은 우리나라에서만 유일하게 생산되고 있는 소금으로, 항위궤양, 항산화, 항염증, 항바이러스, 그리고 항암 등의 다양한 생리활성이 밝혀지고 있다. 또한 본 연구에서는 자죽염은 일반소금에 비해 Alzheimer's disease에 관여하는 Amyloid β 함량을 줄여주는 효과가 있음을 밝혔다. 죽염은 식품의약품안전청에 의해 독성학적 평가에서도 안정성이 입증되었다.

천일염과 이를 열처리하여 제조한 죽염과 같은 열처리소금은 한식의 맛을 내는 가장 기본 소재이다. 이들 소금이 세계에서 주로 섭취하고 있는 일반 소금에 비해 건강에 이롭다는 사실이 입증되고 있다. 이와 같은 천일염과 죽염을 한식 소재로 활용이 되어진다면 한식은 세계 다양한 음식과 차별화가 가능할 것으로 기대된다.

특히 우리나라에서 다량 생산되고 있고 희소성이 있는 미네랄이 풍부한 천일염을 그 자체로 판매하기에는 너무 아까운 점이 많다. 한국산 천일염만이 갖는 장점을 최대한 살려 특정 건강기능성을 갖는 가공염 즉 죽염을 만들어 판매하면 부가가치는 매우 클 것이다. 예로 한국산 천일염소비자가격이 현재 kg당 약 600원하는데 죽염을 만들어 판매할 경우 제일 싼 것이 kg 당 20만원, 비싼 것은 약 100만원하고 있다. 이것도 앞으로 자원의 제한 때문에 가격이 더 올라갈 것이라 예측된다. 특히 죽염은 뇌 건강 등의

건강 가능성이 우수하다고 과학적 입증되고 있어 전 세계적인 명품이 될 것이고 이를 활용한 한식의 세계화 산업에 크게 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

- Kim J, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.* 2008; 102:401-414.
- Bradford B Lowell and Gerald I Shulman. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307; 2005: 384.
- 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):1485-8.
- Gong QH, Wang Q, Pan LL, Liu XH, Xin H, Zhu YZ. S-propargyl-cysteine, a novel hydrogen sulfide-modulated agent, attenuates lipopolysaccharide-induced spatial learning and memory impairment: involvement of TNF signaling and NF- κ B pathway in rats. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(1):110-9.
- Han SH. Novel Pharmacotherapies for Alzheimer's disease. *J. Korean Med. Assoc.* 2009; 52(11): 1059-1068
- He FQ, Qiu BY, Zhang XH, Li TK, Xie Q, Cui DJ, Huang XL, Gan HT. Tetrandrine attenuates spatial memory impairment and hippocampal neuroinflammation via inhibiting NF- κ B activation in a rat model of Alzheimer's disease induced by amyloid- β (1-42). *Brain Res.* 2011;1384:89-96.
- Hong H, Liu LP, Liao JM, Wang TS, Ye FY, Wu J, Wang YY, Wang Y, Li YQ, Long Y, Xia YZ. Downregulation of LRP1 [correction of LPR1] at the blood-brain barrier in streptozotocin-induced diabetic mice. *Neuropharmacology* 2009; 56(6-7): 1054-9.
- Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food Chem.*

- Toxicol.* 2009; 47(3): 625-32.
- Kudo M, Sugawara A, Uruno A, Takeuchi K, Ito S. Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/ enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology* 2004; 145(11): 4948-56.
- Leem J, Koh EH. Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:242984.
- Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007; 716-731.
- Michael JB. Signalling Defects and Disease: Module 12: Cell Signalling Biology. <http://www.cellsignallingbiology.org>
- Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, Bouras C, Pradier L, Gray F, Hugon J. Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822(6): 885-96.
- Owen JB, Sultana R, Aluise CD, Erickson MA, Price TO, Bu G, Banks WA, Butterfield DA. Oxidative modification to LDL receptor-related protein 1 in hippocampus from subjects with Alzheimer disease: implications for A β accumulation in AD brain. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11): 1798-803.
- Pagel-Langenickel I, Bao J, Joseph JJ, Schwartz DR, Mantell BS, Xu X, Raghavachari N, and Sack MN. PGC-1 α integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2008;283(33): 22464-22472.
- Paris D, Patel N, Quadros A, Linan M, Bakshi P, Ait-Ghezala G, Mullan M. Inhibition of Abeta production by NF-kappaB inhibitors. *Neurosci Lett.* 2007; 415(1): 11-6.
- Quiroz-Baez R, Rojas E, Arias C. Oxidative stress promotes

- JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of alpha-, beta- and gamma-secretase expression. *Neurochem Int.* 2009; 55(7): 662-70.
- Rossner S, Sastre M, Bourne K, Lichtenthaler SF. Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression-implications for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2006; 79(2): 95-111.
- Salkeni M, Lynch JJ, Otamis-Price T, Banks WA. Lipopolysaccharide impairs blood-brain barrier p-glycoprotein function in mice through prostaglandin- and nitric oxide-independent pathways. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; 4(2): 276-282.
- Samali A, FitzGerald U, Deegan S, Guptal S. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Int J Cell Bio*; 2010:830307
- Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, van Leuven F, Heneka MT. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci.* 2003; 23(30): 9796-804.
- Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron.* 2004; 43(5): 605-8.
- Wadia JS, Chalmers-Redman RME, Ju WJH, Carlile GW, Phillips L, Fraser AD, Tatton WG. Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-Deprenyl. *J Neurosci.* 1998;18(3):932-47.
- Yang J, Oh D. Pathogenic Molecular Mechanisms of Glutamatergic Synaptic Proteins in Alzheimer's Disease. *Korean J Biol Psychiatry.* 2010; 194-202. Korean.
- Zhang H, Gao Y, Zhao F, Dai Z, Meng T, Tu S, Yan Y. Hydrogen sulfide reduces mRNA and protein levels of β -site amyloid

precursor protein cleaving enzyme 1 in PC12 cells. *Neurochem Int.* 2010; 58(2): 169-75.

Zhiyou C, Yong Y, Shanquan S, Jun Z, Liangguo H, Ling Y, Jieying L. Upregulation of BACE1 and beta-amyloid protein mediated by chronic cerebral hypoperfusion contributes to cognitive impairment and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2009; 34(7): 1226-35.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화용역연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화용역연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.