

# 불포화 지방산과 마그네슘, 칼슘과의 상호작용이 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Co-A reductase 활성에 미치는 영향

광주보건전문대학  
남 현 근

## *Interaction of dietary Mg(II), Ca(II) and polyunsaturated fatty acids on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Co-A reductase activity.*

Hyun Keun Nam, Ph. D.  
Gwangju Health Junior College  
(Received October 5, 1984)

### Abstract

Interaction of dietary Magnesium, Calcium and Polyunsaturated fatty acid (vegetable oils) on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Co-A reductase activity was studied for a period of 30 days using isocalories and isonitrogenous as a basal diet.

The subject rabbits were divided into 18 feeding groups. The results are summarized as follows:

1. The ratio of  $\alpha_1$ -lipoprotein per lipalbumin is 0.34 for control group, 0.38 the highest group fed 0.1 Mg(II) 10ml plus perilla oil and basal diet, the lowest 0.25 group fed 0.1M Mg(II) 5ml plus sesame oil and basal diet.
2. The ratio ratio of  $\alpha_2$ -lipoprotein per lipalbumin is 0.64 for control group, 0.95 as the highest for the group fed 0.1M Ca(II) 15ml plus sesame oil and basal diet, 0.25 as the lowest for the groups fed 0.1M Mg(II) 5, 10ml plus soybean oil and basal diet, 0.1M Ca(II) 5ml plus perilla oil and basal diet.
3. The ratio of  $\beta$ -lipoprotein per lipalbumin is 0.71 for control group, the highest 0.81 for the groups fed 0.1M Mg(II) 10ml plus sesame oil and basal diet, the lowest 0.37 for the group fed 0.1M Mg(II) 15ml plus soybean oil and basal diet.
4. In serum triglyceride, control group was 129.5mg%, the highest 155.4mg% for the group fed 0.1M Ca(II) 5ml plus sesame oil and basal diet, the lowest 85.7mg% for the group fed 0.1M Mg(II) 10ml plus soybean oil and basal diet.
5. In serum cholesterol, control group was 96.7mg%, the highest 152.5mg% for the group fed 0.1M Ca(II) 10ml plus sesame oil and basal diet, the lowest 80.5mg% for the group fed 0.1M Mg(II) 15ml plus soybean oil and basal diet.
6. In case of HMG-CoA reductase activity, control group was 0.95, the highest 0.98 for the group fed 0.1M Ca(II) plus soybean oil and basal diet, the lowest 0.82 for the group fed 0.1M Mg(II) 10ml plus sesame oil and basal diet.
7. Interaction between metal(II) ions and polyunsaturated fatty acid (vegetable oil) are soybean oil > sesame oil > perilla oil, for Mg(II), soybean oil > perilla oil > sesame oil, for Ca(II).

Therefore, it is investigated that the interaction between metal ion and polyunsaturated fatty acid is the higher, the cholesterol level is the lower, and HMG-CoA reductase activity is increased.

## I. 서 론

혈청 콜레스테롤의 함량 감소에 미치는 불포화지방산의 영향등은 이미 보고된바 있어 기름의 포화도가 중요한 인자로 생각되어진다<sup>1-4)</sup> 그러나 기름의 불포화도와 마그네슘이나 칼슘과 지방산과의 상호작용이 콜레스테롤 체내 함성에 깊이 관여하고 있는것 같다<sup>5-23)</sup>

이에 필자는 지방산과 마그네슘 그리고 칼슘과의 상호작용이 혈청 콜레스테롤 함량에 영향을 미치는 3-Hydroxy-3 methyl-gluaryl-CoA reductase 활성에 끼치는 영향을 조사하여 마그네슘과 칼슘이 혈액 콜레스테롤을 기하시키는 작용을 하는가를 연구 검토하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험동물과 식이

생후 30일된 Chin-Chilla 종 토끼를 구입하여 Table 1에 나타낸 바와 같은 기본식으로 환경에 적응시키기 위하여 1주일 동안 사육하여 그후 30일간 Table 3에 나타낸 식이조건으로 키르면서 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 시료는 하루에 3번 오전 8시, 오후 1시, 8시에 급여하였다. 첨가된 기름은 Table 2와 같은것이다.

첨가된 금속은 Fischer Co. U.S.A의 특급 염화마그네슘과 염화칼슘을 각각 0.1M 용액을 만들어 사용하였다.

Table 1. Composition of the Basal Diets for Rabbit

(Unit : %)

Food	Ingredients (%)	Protein (%)	Carbohydrate (%)	Fat (%)
Corn	25	54.44	13.32	32.24
Wheat	20	71.78	21.33	6.89
Wheat bran	15	68.54	11.42	20.04
Soybean meal	25	57.06	12.53	30.41
Soybean rind	10	86.63	10.62	2.75
Repseed rind	5	72.39	22.88	4.73
Total	100	68.47	15.35	16.18

Vitamin : one tablet daily (Vit. A: 5,000usp, Vit. C: 60mg

Vit. D: 400usp, Vit. E: 5 IU, Niacinamide : 20mg, Vit. B-1: 2mg Vit. B-2: 2.5mg, Vit. B-12: 3mg)

Table 2. Composition of Fatty Acid in the Diet Oil (Unit : %)

Fatty acid	Sesame oil	Soybean oil	Perilla oil
Palmitic acid	10.2	12.8	5.9
Stearic acid	2.8	3.9	1.9
Oleic acid	40.1	24.9	18.3
Linoleic acid	41.9	49.2	15.6
Linolenic acid	5.0	7.2	58.3
Arachidonic acid	-	2.0	-

### 2. 혈액 분석

실험기간이 끝난뒤 하루 fasting 시킨 토끼의 목동맥을 절단하여 혈액을 채취하고 응고시킨 다음 원심분리하여 혈청을 분리해 냉장고(4°C)에 보관하면서 사용하였다. 단백질은 전기영동법으로 콜레스테롤은 Schoenheimer-SPerry 법<sup>24)</sup>으로 트리글리세리드는 Carlson-Wardstom 법<sup>25)</sup>으로 칼슘은 OCPC법<sup>26)</sup>으로 마그네슘은 EDTA법으로 행하였다.

### 3. HMG-CoA Reductase 활성도 측정<sup>29-31)</sup>

#### ① micro-some 제조

실험식이 끝난 다음 절식시키고 체혈한 다음 도살하여 간을 적출하고 결합조직과 지방을 완전제거하고 냉동시킨다. 면도칼로 아주 잘게 썰은 다음

Table 3. Experimental Diets for Rabbit

Group	Dietary variables	Initial body weight
Control	Basal diet (45g)	350±20
1	5ml. Mg+Sesame oil+B.D.	340±25
2	10ml. Mg+S. O. +B.D.	340±20
3	15ml. Mg+S. O. +B.D.	350±10
4	5ml. Ca+S. O. +B.D.	370±10
5	10ml. Ca+S. O. +B.D.	365±15
6	15ml. Ca+S. O. +B.D.	365±10
7	5ml. Mg+Soybean oil+B.D.	370±10
8	10ml. Mg+Soy. O. +B.D.	365±15
9	15ml. Mg+Soy. O. +B.D.	365±10
10	5ml. Ca+Soy. O. +B.D.	360±15
11	10ml. Ca+Soy. O. +B.D.	365±10
12	10ml. Ca+Soy. O. +B. O.	370±10
13	15ml. Ca+Soy. O. +B.D.	350±10
14	10ml. Mg+Perilla oil+B.D.	355±10
15	15ml. Mg+P. O. +B.D.	355±15
16	5ml. Mg+P. O. +B.D.	360±10
17	10ml. Ca+P. O. +B.D.	365±10
18	15ml. Ca+P. O. +B.D.	335±15

\* Initial body weight, Mean±S.D.

Added metals, 0.1M. Mg Cl<sub>2</sub>, 0.1M. CaCl<sub>2</sub>,

0.5M KCl 500ml를 첨가하여 3분동안 잘 혼합하여 균질화 시킨다. 진한 혼탁액에 0.5M KCl 500ml를 가하고 30분동안 잘 흔들어준다. 그리고 -20°C 정도에 냉각시켰다가 0.5M KCl 500ml와 ethanol 500ml를 혼합한 용액 1ℓ를 가하여 1시간 동안 저어주면서 천천히 첨가하여 준다. 2시간동안 -5°C 에서 원심분리하여 상층액에 0.4M KCl 2ℓ에 0.025M potassium phosphate buffer (pH7.8) 0.001M L-Cysteine 이 포함된 용액을 가하여 18시간 동안 투석시켰다.

추출물 100ml당 0.37g/ml (0.7포화도)의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 주어 혼합물을 30분동안 흔들어 주고 20,000×g 에서 20분동안 원심분리한다. 침전물을 모아서 0.1M Tris buffer (PH 7.4) 50ml에 용해시키고 0.001M L-Cysteine을 함유한 완충액 3ℓ에서 24시간 동안 투석시킨다.

추출물에 0.29g/ml (0.55포화도)의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 생긴 침전물을 0.001M L-Cysteine을 포함한 36시간 동안 투석시켰다. 같은양의 증류수로 희석시키고 PH 5.8이 될때까지 저어주면서 1M acetic acid를 첨가하여 준다.

혼합물을 15분동안 저어준 다음 1시간동안 방치하였다가 20,000×g에서 20분동안 원심분리한다. 그래서 침전은 0.1M tris buffer (PH 7.4)에 0.001M L-Cysteine 을 포함한 용액에 넣어준다. 이것을 HMG-CoA reductase 가 포함된 용액으로 간주한다. 그리고 가하여 주면 arsenite-dithol complex 가 형성된다. 여기에 3 mM 5.5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), 20μl, 0.1M triethanol amine, 0.2M EDTA buffer PH7.4를 가하여 파장 412nm 에서 absorbance 를 측정한다.

단백질은 Lawry, et al 방법<sup>12</sup>에 의하였다.

② HMG-CoA reductase 활성도 측정

microsomal protein (0.5~1.0mg)을 함유하는 혼합물 일정량에 2 μ mole NADP<sup>+</sup>, Glucose-6-p-phosphate dehydrogenase, 3 μ mole Glucose-6-phosphate 을 가하여 잘 섞은 뒤에 Incubation 시킨다. 여기에 0.1M triethanol amine 0.8ml 0.02MEDTA, pH7.4 완충액을 첨가하여 준다. 여기에 0.2u mole dithiothreitol을 가하고 최종 체적을 1 ml로 한다. 대조군에는 microsome과 완충액 효소와 조효소를 제외한 모든 시약을 넣어 만 든다.

microsome을 첨가하면서 0.02M sodium arsenite 20μl를 첨가하여 용해성 단백질을 완전히 제거시키고 잠시후에 2.0M citrate 완충액 (PH3.5) 0.1ml를 첨가하여 반응을 종결시킨다.

microsomal protein 을 침전시키고 원심분리하여

단백질을 분리시킨다. 그리고 상등액은 분리하여 PH 8.0으로 하기 위하여 2M tris buffer (PH0.6) 0.2 ml, 2M tris buffer (PH8.0) 0.1ml를 첨가하여 주고 0.4M sodium arsenite 50ul를 첨가한다.

이 효소액은 0.07g/ml (0.13포화도) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하고 원심분리하여 얻어진 침전은 버리고 상층액은 0.17g/ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 되게 하여준다. 다시 생긴 침전물을 0.1M tris buffer (PH7.4) 0.001M L-Cysteine 이 포함된 용액에 용해시키고 -20°C에서 냉동시켜 보관하면서 효소와 단백질 시료로 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 리포단백질의 전기영동

토끼 혈청의 리포단백질을 전기영동법으로 분리하여 얻은 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Electrophoretic Lipoprotein Component of Rabbit

Group	Total protein	α <sub>1</sub> -lipoprotein lipalbumin	α <sub>2</sub> -lipoprotein lipalbumin	β-lipoprotein lipalbumin
Control	5.7	0.34	0.64	0.71
1	5.6	0.25	0.41	0.69
2	5.9	0.32	0.45	0.80
3	5.6	0.32	0.85	0.57
4	5.9	0.37	0.42	0.65
5	5.8	0.35	0.47	0.75
6	5.7	0.30	0.95	0.50
7	5.1	0.30	0.25	0.53
8	5.0	0.30	0.25	0.45
9	5.2	0.25	0.30	0.37
10	5.3	0.26	0.40	0.50
11	5.7	0.35	0.35	0.56
12	5.4	0.32	0.42	0.40
13	5.7	0.36	0.48	0.59
14	5.4	0.38	0.46	0.40
15	5.4	0.35	0.40	0.74
16	5.5	0.35	0.25	0.50
17	5.4	0.33	0.30	0.47
18	5.6	0.30	0.35	0.62

표에서 알 수 있는 것은 대조군의 α<sub>1</sub>-, α<sub>2</sub>-, β-리포단백질의 비와 각 성분의 이동현상을 알게 된다. 우선 α<sub>1</sub>-리포단백질 리프알부민의 값은 대조군이 0.34이고 대조군의 값보다 크게 나타난 군은 제 4, 5, 11, 13, 14, 15, 16, 군이 있고 그외의 실험군 대조군의 것보다 낮게 나타났다. 그런데 참기름과 마그네슘을 첨가 급여한 실험군에서는 다소 낮게 나타났고 참기름과 칼슘을 첨가 급여한 실험군에서는 첨가 칼슘양이 적은 군에서 높게 나타나 같은 기름일지라도 첨가하는 금속이 마그네슘일때 α<sub>1</sub>-리포단백질의 이동이 낮게됨을 알 수 있었다. 그

리고 콩기름과 마그네슘을 첨가 급여한 실험군에서는 대조군에 비하여 모두 낮게 나타났으나 칼슘을 첨가한 실험군에 있어서는 첨가량이 많으면 이동이 더 잘된 것으로 나타났다.

들깨기름과 마그네슘을 첨가시킨 실험군은 모두 대조군의 것보다 높게 나타났고 칼슘을 첨가시킨 군도 다소 높은 것 같다. 그러므로 마그네슘과 기름과의 사이에 작용력은 콩기름, 참기름, 들깨기름의 순서였고 칼슘과 기름과의 작용력이 강하기는 콩기름, 들깨기름, 참기름의 순으로 나타났다. 이것은 기름속에 포함된 리노레인산의 함량에 기인되는 것으로 생각된다.

$\alpha_1$ -리포단백질 / 리프알부민을 보면 대조군이 0.64인데 대조군보다 높게 나타난 군은 제3, 6군이었다 모두 대조군보다 낮게 나타났는데 마그네슘과 콩기름을 첨가한 군이 가장 낮았고 칼슘과 들기름을 첨가한 군이 상당히 낮게 나타났다.

$\beta$ -리포단백질 / 리프알부민의 대조군은 0.71인데 대조군보다 높은값을 나타낸 군은 제 2, 5, 15군이었다고 모두 낮게 나타났다. 그러나 마그네슘과 기름을 첨가한 실험군에 있어서는 콩기름, 들깨기름, 참기름의 순으로 나타났고 칼슘의 경우는 콩기름 들깨기름, 참기름의 순으로 나타났다.

그러므로 마그네슘, 칼슘, 참기름, 콩기름, 들깨기름을 첨가하여 사육한 토끼의 혈청 리포단백질의 이동은  $\alpha_1$ -리포단백질은 마그네슘과 들깨기름의 군에서 가장 높았고 마그네슘과 콩기름의 군에서 가장 낮은 것으로 나타났으며  $\alpha_2$ -리포단백질의 경우는 칼슘과 참기름의 군에서 가장 높았고 마그네슘과 콩기름의 군에서 가장 낮은 것으로 나타났으며,  $\beta$ -리포단백질의 경우는 마그네슘과 콩기름의 군에서 가장 낮았고 마그네슘과 참기름의 군에서 가장 크게 나타났다.

2. 트리글리세리드, 콜레스테롤, 마그네슘, 칼슘 트리글리세리드, 콜레스테롤, 마그네슘, 칼슘을 분석한 결과는 Table 5와 같다.

트리글리세리드는 대조군이 129.5인데 제 4, 5, 11, 12, 13군은 높게 나타났고 다른 실험군은 낮게 나타났다. 마그네슘과 기름을 첨가한 군에서 콩기름, 들깨기름을 첨가한 군이 낮게 나타났고 참기름을 급여한 군에서 다소 높게 나타났다. 칼슘과 기름을 첨가한 들기름, 콩기름, 참기름의 순으로 트리글리세리드가 증가됨을 알 수 있다. 이는 마그네슘이 칼슘에 비하여 체내 지방합성을 감소시키는 역할을 하며 칼슘은 증가시키는 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다.

한편 콜레스테롤의 경우는 대조군이 96.7인데 반

Table 5: Triglyceride, Cholesterol,  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  Level in Rabbit

(Unit : mg %)

Group	Triglyceride	Cholesterol	$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$
Control	129.5	96.7	10.4	13.5
1	115.3	135.6	10.1	13.1
2	105.4	125.6	7.2	14.2
3	95.7	112.1	7.5	13.5
4	155.4	152.4	5.5	13.3
5	152.2	152.5	7.2	10.9
6	128.9	125.9	7.5	12.5
7	102.3	92.3	7.2	10.2
8	85.7	90.8	7.1	9.8
9	90.5	80.5	7.5	10.1
10	110.5	98.5	7.2	10.2
11	141.7	99.5	7.2	9.7
12	128.9	100.2	7.5	9.5
13	100.5	97.8	7.5	10.4
14	95.3	93.2	7.4	10.2
15	95.5	9.5	7.1	9.9
16	120.5	98.5	7.2	10.5
17	120.1	97.6	7.5	11.1
18	103.2	89.7	8.2	11.4

Table 6. HMG-CoA Reductase Activity of Microsomal Protein

Group	Total activity of HMG-CoA	Specific activity of HMG-CoA	Microsomal protein
Control	0.95	0.052	18.1
1	0.86	0.050	17.2
2	0.82	0.050	16.4
3	0.89	0.050	17.8
4	0.86	0.053	16.2
5	0.88	0.053	16.6
6	0.87	0.053	16.4
8	0.81	0.052	18.4
9	0.97	0.050	19.4
10	0.95	0.050	19.0
11	0.98	0.052	18.6
12	0.95	0.053	18.0
13	0.91	0.053	18.2
14	0.95	0.053	17.4
15	0.94	0.050	19.0
16	0.89	0.051	18.2
17	0.90	0.050	17.8
18	0.92	0.049	18.4
		0.050	18.4

\* Unit : nmol / min / mg protein.

하여 제1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 16, 17군은 높게 나타났고, 제7, 8, 9, 14, 15, 18군만이 낮게 나타났다. 마그네슘과 기름 첨가 군에서 참기름 첨가군이 높았고, 콩기름, 들깨기름 첨가군은 낮게 나타났으나

제9, 18군이 가장 낮게 나타났다. 그리고 마그네슘의 경우는 마그네슘이나 칼슘 첨가로 큰 변동이 없음을 알 수 있고 칼슘의 경우는 참기름, 콩기름 첨가군에서는 마그네슘을 첨가한 군에서 높게 나타났고 칼슘을 첨가한 군에서 낮았으나 들깨기름을 첨가한 군에서는 마그네슘 첨가군이 칼슘 첨가군보다 낮게 나타났다.

3. HMG-CoA Reductase 활성  
microsomal 단백질의 HMG-CoA 활성을 분석한 결과 Table 6에 나타나 있다

위에서 알 수 있는것은 대조군이 0.95인데 제 8, 9, 10, 11, 12, 14군은 더 높았고 나머지 실험군은 낮게 나타났는데 microsomal 단백질의 경우는 대조군이 1.81인데 반하여 제 8, 9, 10, 14, 17, 18, 군이 높았고 나머지는 낮게 나타났다. 따라서 microsomal 단백질의 함량이 증가되면 HMG-CoA 활성도도 증가되었다. 그리고 마그네슘과 기름 첨가군에 있어서 참기름, 들깨기름, 콩기름의 순으로 microsomal 단백질이 증가되었고 칼슘과 기름 첨가군에 있어서는 참기름, 콩기름, 들깨기름의 순으로 증가되었다.

한편 효소의 활성이 증가하면 콜레스테롤의 양이 감소됨을 알 수 있었고 금속을 첨가시켰을때 리포단백질과의 상호작용력이 크게 나타난 군에서의 효소활성이 증가되었음을 알게 되었다. 즉 마그네슘과 콩기름 사이의 작용력과 칼슘과 들깨기름 사이의 작용력이 큰것으로 나타나 금속과 기름 사이의 상호작용력도 기름의 종류, 금속의 전기음성도와 관련이 있는 것 같으며 특히, 기름의 불포화지방산의 함량이 영향을 주는 것 같다.

이상에서 알 수 있는 것은 마그네슘 칼슘등의 활성전위가 상이하다는 Hooper<sup>21)</sup>의 보고와 잘 일치하며 마그네슘의 증가에 따라 트리글리세리드가 감소되어 혈지방의 축적이 감소된다는 Vitale, Neal 등의 보고와 잘 일치된다. 또한 Goldstein과 Brown<sup>22)</sup>의 보고한 바 콜레스테롤이 증가되면 HMG-CoA의 활성이 증가되고 콜레스테롤은 감소되었다. 한편 Heller와 Gould<sup>23)</sup>는 효소의 활성도는 단백질의 농도에 좌우된다고 지적한 바 있다. 그러므로 콜레스테롤 생합성 과정에 금속이 효소활성에 억제작용을 하는 것 같으며 지방산과 금속사이의 작용력이 크면 클수록 콜레스테롤은 감소되었고 효소 활성은 증가됨을 알 수 있었다.

IV. 결 론

토끼에 참기름, 들깨기름 콩기름과 마그네슘 칼

슘을 같이 첨가 사육하여 지방산과 금속의 상호작용이 콜레스테롤 합성에 관여되는 HMG-CoA 활성을 조사하기 위하여 생후 30일된 토끼를 구입하여 30일간 일정한 사료를 급여하여 사육 기간이 끝난 다음에 절식시켜 혈청을 분리하고 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

① α<sub>2</sub>-lipoprotein/lipalbumin 대조군 0.34이었고, 0.35를 보인 것은 5, 11, 15, 16군이었고 0.36은 13군 0.37은 4군, 0.38은 14군이었고 가장 낮은군이 0.25로 1.9군이였다.

② lipoprotein/lipalbumin 대조군 0.64이었고 3군이 0.85, 6군이 0.95, 가장 낮은 군은 0.25로 7, 8, 16군이였다.

③ β-lipoprotein/lipalbumin 대조군 0.71이었고, 0.75는 5, 15군이고 0.80은 2군이었고 가장 낮은 0.37은 9군이였다.

④ triglyceride는 대조군이 129.5, 가장 높은 군은 4군으로 155.4이었고 가장 낮은 것은 85.7로 8군이였다.

⑤ cholesterol은 대조군이 96.7, 가장 높은 것은 152.5로 5군이었고 가장 낮은 것은 80.5로 9군이였다.

⑥ 마그네슘은 대조군이 10.4이었고 모든 실험군이 대조군보다 낮게 나타났으며 가장 낮은 5.5는 4군이였다.

⑦ 칼슘은 대조군이 13.5이었고 14.2를 나타낸 2군이 가장 높았고 가장 낮은 9.5는 12군이였다.

⑧ HMG-CoA reductase의 활성도는 대조군이, 0.95이었고 대조군보다 낮은 값을 가진것은 참기름을 첨가한 실험군이었고 대조군보다 큰값을 나타낸 것은 콩기름, 들깨기름을 첨가한 실험군으로 나타났다.

⑨ 마그네슘과 기름과의 작용력은 콩기름>참기름>들깨기름의 순서이고 칼슘과 기름과의 작용력은 콩기름>들깨기름>참기름 순이였다.

⑩ 콜레스테롤을 가장많이 함유한 β-지단백의 경우는 참기름과 마그네슘을 첨가한 실험군에서 HMG-CoA 활성이 낮게 나타났고 콜레스테롤은 높게 나타났다.

1. Ahrens, E. H. Jr., J. Hirsch, W. Insull, Jr., T. T. Tsaietas, R. Bloomstand and M. L. Petersoon : The influence of dietary fats on serum lipid level in man. Lancet 1: 943-953 (1957)

2. Malmros, H. and G. Wigard:  
The effect on serum cholesterol of diets containing different fat. *Lancet* 2: 1-12 (1957)
3. Lambert, G. F., J. P. Miller, R. T. Olsen and D. V. Frost: Hypercholesteremia and atherosclerosis induced in rabbits by purified high fat reactions devoid of cholesterol. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, 97: 544-556 (1958)
4. Steiner, A., A. Varsos and P. Samuel:  
Effect of saturated and unsaturated fats on the concentration of serum cholesterol and experimental atherosclerosis. *Circulata Res.*, 7: 448-459 (1959)
5. Wigard, G.  
Production of hypercholesterolemia and atherosclerosis in rabbits by feeding different diets without supplementary cholesterol. *Acta. Med. Scand.*, 166 (supple 351) (1960)
6. Ockner, R. K., F. B. Hughen and K. J. Issenbacher: Very low density lipoprotein in intestine lymph. *J. Clin. Invest.*, 48: 2367-2375 (1969)
7. Hdman, R. T.:  
Essential fatty acids deficiency, In progress in the chemistry of fats and ether lipid. Vol. 9, PP 275-348, Pergman Press., Oxford (1971)
8. Nam, H. K. and Y. O. Lee:  
The effect of dietary vegetable oils on the blood cholesterol level of rabbit. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 12: 77-83 (1980)
9. Brown, R. K., Boyle, E. and Artinsen, C. R.:  
The enzymatic transformation of lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 204: 423-430 (1953)
10. Gordon, R. S.:  
Interaction between oleate and the lipoproteins of human serum. *J. Clin. Invest.*, 33: 477-485 (1954)
11. Hira Lal and M. S. N. Rao:  
Metal protein interaction in buffer solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 3050-3056 (1956)
12. Markus, G. and F. Karush:  
Structural effect of the interaction of human serum albumin with sodium decylsulfate. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 3264-3269 (1957)
13. Kolthoff, I. M. and B. R. Willeford, Jr.:  
The interaction of copper(II) with bovine serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 5673-5678 (1958)
14. Johansson, G. and V. P. Shanbhag:  
Interaction of human serum albumin with fatty acids. *Eur. J. Biochem.*, 93: 363-367 (1979)
15. Nam, H. K. and Y. T. Chung:  
The effect of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  concentration on the total cholesterol level of rabbit. *J. Gwangju Health Junior College* 5: 41-47 (1980)
16. Neal, J. B. and Neal, M.:  
Effects of hard water and  $MgSO_4$  on rabbit atherosclerosis. *Arch. Pathol.*, 73: 200-403 (1962)
17. Marier, J. R.:  
Cardio-protective contribution of hard water to magnesium intake. *Rev. Can. Bio.*, 37: 115-125 (1978)
18. Ogura, M., Y. Suehira and H. Tanaka:  
Serum lipoprotein in rats with amino acid imbalance induced fatty liver. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 331-336 (1979)
19. Narayan, K. A. and J. J. McMuller:  
The interactive effect of dietary glycerol and corn oil on rat liver lipids, serum lipids and serum lipoproteins. *J. Nutr.*, 109: 1836-1846 (1979)
20. Tadayyon, B. and L. Lutwak  
Interrelationships of triglycerides with calcium, magnesium and phosphorus in the rat. *J. Nutr.*, 97: 246-254 (1965)
21. Seelig, M. S.:  
The requirement of magnesium by the normal adult. *Am. J. Clin. Nutr.*, 14: 342-292 (1964)
22. Rayssiguier, Y., Badinard, P. and Kopp, J.:  
Effects of magnesium deficiency on parturition and uterine involution in the rat. *J. Nutr.*, 109: 2117-2125 (1979)
23. Rayssiguier, Y., E. Gueux, and D. Weiser:  
Effect of magnesium deficiency on lipid metabolism in rats fed a high carbohydrate diet. *J. Nutr.*, 111: 1876-1883 (1981)
24. Sperry, W. M.:  
A micromethod for the determination of total and free cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 150: 315-322 (1943)
25. Henry, R. J.: *Clinical chemistry*, pp. 866-870. Harper and Row publishers, New York, N. Y.,

- 1965
26. Conerty, H. V. and Briggs, A. R. :  
A photometric determination of calcium complexes Am. J. Clin. Path., 45: 290-295 (1966)
  27. Kolthoff, I. M. and Syehger, V. A. : n.  
Volumetric Analysis, vol. 2. pp.282-331, Intersciences pvbl. Inc., New York, N. Y. (1947)
  28. Welcher, F. J. :  
The analytical uses of EDTA, chapter 3, D. Van Norstrand, Inc., New York, N. Y. (1958)
  29. Brown, M. S., S. E. Dana, J. M. Dietschy and M. D. Siperstein 3- hydroxy -3-methylglutaryl coenzyme A reductase. J. Biol. Chem., 248: 4731-473 (1973)
  30. Brown, M. S. and J. L. Goldstein :  
Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. J. Biol. Chem., 249: 7306-7314 (1974)
  31. Brown, M. S., S. E. Dana and J. L. Goldstein :  
Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem., 249: 789-796 (1974)
  32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. C. and Rondall, R. J. J: Biol. Chem., 193:265(1951)
  33. Hooher, S. W., Kruser, H. D. and McCollum, E. V: Am. J. Hyg., 25 : 28 (1937)
  34. Vitale, J. J., White, P. L. Nakamura, M., Hegested, D. M. Zamcheck, N. and Mellerstein, E. E. : J. Exp. Med., 106 : 757 (1957)
  35. Neal, J. B and Neal, M: Arch. Pathol, 73 : 400 (1962)
  36. Heller, R. A. and Gould, R. G. J. : Biol. Chem., 249 : 5254 (1974)