

지방산 조성이 다른 식이 지방이 흰쥐 간 미토콘드리아의 지질조성과 Adenine Nucleotide Translocase 활성도에 미치는 영향*

김정희 · 윤혜진 · 송지현 · 김정자**

서울여자대학교 자연과학대학 영양학과, 자연과학연구소**

Effects of Different Dietary Oils on Hepatic Mitochondrial Lipid Composition and Adenine Nucleotide Translocase Activity in Rat

Kim, Jung Hee · Yoon, Hye Jin · Song, Ji Hyun · Kim, Kyung Ja**

Department of Nutrition, Natural Science Institute,** Seoul Woman's University, Seoul, Korea

ABSTRACT

This study was done to investigate whether dietary fats differing in their fatty acid compositions change hepatic mitochondrial lipid composition and thereby change adenine nucleotide translocase activity. Male Sprague-Dawley rats were fed 5 different experimental diets for 6 weeks, which were different in their fatty acid compositions. The dietary fats were beef tallow(BT), olive oil(OO), corn oil(CO), perilla oil(PO) and sardine oil(SO) as a source of saturated fatty acid, oleic acid, n-6 linoleic acid, n-3 α -linolenic acid and n-3 eicosapentaenoic acid + docosahexaenoic acid respectively.

Body weight of PO group was significantly higher than that of either BT or SO group. This increase in body weight of PO group was due to the increase of food intake. Although there was no difference in liver weight, % liver weight per body weight of SO group was significantly higher than BT and OO groups. Analysis of mitochondrial lipid composition showed that dietary oils differing their fatty acid compositions altered mitochondrial fatty acid patterns, especially n-6/n-3 ratio, cholesterol/phospholipid ratio and phospholipid composition. The n-6/n-3 ratio was highest in CO group but lowest in SO group whereas the ratio of Chol/PL was highest in SO group but lowest in CO group. Such changes in mitochondrial lipids did not lead to a significant alteration in the activities of adenine nucleotide translocase, which is embedded in mitochondrial inner membrane.

KEY WORDS : dietary oils · adenine nucleotide translocase · hepatic mitochondrial fatty acids · cholesterol · phospholipids.

채택일 : 1993년 7월 12일

*본 연구는 1990년도 한국과학재단 목적기초 1차년도 연구과제의 일부임.

서 론

식이 지방산은 생체막의 지질조성에 영향을 주며 따라서 생체막에 부착된 효소의 활성화에 영향을 줄 수 있다¹⁾. 일반적으로 막부착효소의 활성화는 전체적인 막지질의 유연성뿐만 아니라 막효소를 둘러싸고 있는 국부지역의 주위환경, 특히 막효소 주위에 있는 인지질의 종류에 의하여 영향을 받으며 많은 막효소들이 그들의 최적활성을 위하여 특이한 인지질을 요구하는 경향이 많다²⁾³⁾. 지방산 조성이 다른 식이 지방이 생체막의 지방산 조성에 영향을 주며 동시에 이러한 변화가 인지질의 polar head group의 변화를 초래하고, 막의 콜레스테롤의 함량의 변화도 초래하여 막부착효소의 활성을 변화시킬 수 있다. 그 예로 많은 연구에서 plasma membrane 효소인 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ ⁴⁾와 adenylate cyclase⁵⁾, 미토콘드리아의 내막효소인 ATPase ⁶⁾가 식이 지방의 변화에 따라 그들의 활성도가 변함이 관찰되었다.

Adenine nucleotide translocase(AdNT)는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 수송반체로서 산화적 인산화에 의해서 생성된 미토콘드리아 내의 ATP와 세포질에 있는 ADP를 1:1로 교환하는 것을 촉매한다⁷⁾. 미토콘드리아로의 ADP 수송이 산화적 인산화에 중요한 조절인자로서 알려지고 있기 때문에 AdNT 활성도의 변화는 미토콘드리아의 산화적 인산화를 변화시킬 수 있고 또한 세포질과 미토콘드리아의 ATP/ADP ratio를 변화시켜 세포 내의 gluconeogenesis나 pyruvate 대사를 조절할 수 있다⁸⁾⁹⁾.

AdNT의 활성도나 AdNT의 kinetics은 미토콘드리아의 에너지상태¹⁰⁾, 미토콘드리아의 adenine nucleotide pool의 크기⁷⁾ 생체내 저해제인 fatty acyl CoA의 수준¹¹⁾ 등에 의해서 변하고 또한 막의 지방조성의 변화에 민감하게 변함이 여러 연구¹²⁾¹³⁾에서 보고되었다. 특히 hypothyroidism¹³⁾, myocardial infarction¹⁴⁾, 당뇨병¹⁵⁾, 암¹⁶⁾¹⁷⁾과 같은 질병상태에서 AdNT의 활성이 변화되었을 뿐만 아니라 노화시¹⁸⁾¹⁹⁾와 같은 생리적 변화에 의해서도, 동물

이 추위에 노출되었을 때²⁰⁾도 미토콘드리아의 AdNT 활성도나 kinetics들이 변하였다. Mak 등¹²⁾은 많은 양의 linoleic acid가 든 safflower oil과 포화 지방산이 많이 든 우지(牛脂)를 쥐에게 준 경우 미토콘드리아의 AdNT 활성도나 kinetics들이 변하였다. 이들의 변화의 대부분이 미토콘드리아의 내막의 유동성을 예측할 수 있는 cholesterol/phospholipid(Chol/PL) 몰비의 변화나, 인지질의 조성, 인지질 지방산의 불포화도 및 n-6/n-3 fatty acid ratio 등의 변화에 기인되었다. 또한 hepatoma같은 종양 세포에서 AdNT 활성도나 AdNT의 저해제에 대한 민감도가 크게 감소되었으며¹⁷⁾ 이런 감소가 막의 콜레스테롤 함량 증가에 따른 Chol/PL 몰비의 상승과 인지질 중 sphingomyelin의 수준이 증가함에 따라 미토콘드리아 내막의 유동성의 감소에 기인한다고 한다¹⁶⁾¹⁷⁾.

따라서 본 연구는 지방산 조성이 다른 5가지 식이 지방 즉 우지, 올리브유, 옥수수유, 들기름 및 정어리유가 간 미토콘드리아의 지질 조성에 미치는 영향을 조사하고 이러한 지질 조성의 변화가 adenine nucleotide translocase 활성도에 미치는 영향을 측정하고자 하였다.

연구내용 및 방법

1. 동물사육 및 실험식이

이유된 Sprague-Dawley 종 숫쥐 50~70g된 것을 서울의대 실험동물 사육장으로부터 공급받아 실험 식이에 따라 각 군당 10마리씩 체중에 따른 난교법에 의하여 나눈 후 온도, 습도 및 채광을 일정하게 조절하여 사육하고 식이와 물은 임의로 섭취하게 하였다.

실험 식이는 식이지방의 수준을 15%(w/w)로 하고, 식이지방의 종류를 5가지를 사용하여 포화 지방산의 급원으로 우지, oleic acid의 급원으로 올리브유, n-6계의 linoleic acid의 급원으로 옥수수기름, n-3계의 α -linolenic acid 급원으로 들기름과 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)의 급원으로 생선유인 정어리유를 사용하여 6주간 사육하였다. 실험식은 매주 만들어서 하

루먹는 분량씩 적은 비닐팩 속에 나누어서 넣고 질소를 채운 뒤 -40°C 냉동실에 보관하였다가 매일 매일 갈아 주었으며 식이섭취량은 매일 측정하였고 체중은 일주일에 1번 측정하였다.

실험 식이의 조성은 Table 1에, 식이지방의 지방산조성은 Table 2에 나타내었다.

2. 시료수집

실험 동물은 12시간 금식시킨 후 단두시켜 회

Table 1. Diet composition

Ingredient	Amount(%)
Corn starch	35.2
Dextrin	20.0
α -cellulose	5.0
Casein	20.0
DL-methionine	0.3
Oil ¹	15.0
Salt mixture ²	3.5
Vitamin mixture ³	1.0
Vitamin E ⁴	0.015
Butylated hydroxytoluene	0.01

¹ Beef tallow, olive oil, corn oil, perilla oil and sardine oil were used

² Composition of salt mixture(AIN 76), g/Kg mixture : Calcium phosphate dibasic(CaHPO₄) 500g, Sodium chloride(NaCl) 74g, Potassium sulfate(K₂SO₄) 52g, Potassium citrate monohydrate(K₃C₆H₅O₇ · H₂O) 220g, Magnesium oxide(MgO) 24g, Manganous carbonate(43~48% Mn) 3.5g, Ferric citrate (16~17% Fe) 6.0g, Zinc carbonate(70% ZnO) 1.6g, Cupric carbonate(53~55% Cu) 0.3g, Potassium iodate(KIO₃) 0.01g, Chromium potassium sulfate [CrK(SO₄)₂ · 12H₂O] 0.55g, Sodium selenite(Na₂SeO₃ · 5H₂O) 0.01g, Sucrose finely powdered to make 1,000.0g

³ Composition of vitamin mixture(일본 Oriental 효모), g/Kg mixture : Vitamin A Acetate(500,000IU per g) 1.0g, Vitamin D₃(40,000,000 per g) 2.5mg, Vitamin E Acetate 5g, Vitamin K₃ 5.2g, Thiamin chloride 1.2g, Riboflavin 4.0g, Pyridoxine hydrochloride 0.8g, Vitamin B₁₂ 0.5mg, Ascorbic acid 30.0g, Inositol 6.0g, Choline chloride 200g, p-Aminobenzoic acid 5.0g, Niacin 6.0g, Calcium Pantothenate 5.0g, Biotin 0.02g, Folic acid 0.2g, and cerelese powder to make 1,000.0g

⁴ dl- α -tocopherol acetate

생하였고 간은 절제하여 여러번 씻은 후 여분의 수분을 여과지에 놓고 제거한 뒤 중량을 측정하였고, 간 mitochondria 분리는 7g의 간을 일정 부위에서 잘라 isolation medium(225mM mannitol, 75 mM sucrose, 1mM EDTA, 2mM HEPES(pH7.4))을 이용하여 homogenizer로 균질화 시킨 후 Johnson and Lardy 의 방법²¹⁾에 따라 원심분리하여 얻었으며 신선한 상태 미토콘드리아를 이용하여 단백질 함량과 AdNT 활성도를 측정하였다. 미토콘드리아의 지질 분석을 위해서는 일부 미토콘드리아 부유액은 급냉동 시킨 후 -40°C에서 보관하였다가 분석에 이용하였다.

3. 분석방법

1) 식이 지방의 지방산 조성 분석

식이 지방을 chloroform에 녹인 후 질소 가스로 건조시켜서 14% BF₃-methanol로 transmethylation²²⁾ 시켜서 gas liquid chromatography(GLC)로 분석하였다. GLC 분석은 Hewlett Packard 5890 A 기종을 사용하였고 column은 2% Silar 5 CP(50% cyanopropylphenol-50% methyl)를 피복한 100~200 mesh Chromosorb W HP(Supeleo, Inc)를 충전시킨 glass column(6ft×4mmID)을 사용하였고, 검출기는 flame ionization detector(FID)였으며 column의 초기 온도를 174°C에서 5분간 유지시킨 후 최종 온도 245°C까지 분당 5°C씩 상승시켜 주었으며 주입구의 온도는 250°C, 검출기의 온도는 300°C로 하였다. 운반체로는 질소가스로 유속(流速)이 29.8ml/min였으며 각 지방산 조성은 자동 면적 적분기에서 면적 %로 구하였으며 각 지방산의 확인은 표준지방산 methyl ester와 retention time과 비교하여 이루어졌다.

2) 미토콘드리아의 지질 분석

미토콘드리아의 지질 추출은 약 30mg의 단백질을 함유하는 미토콘드리아를 이용하여 Bligh와 Dyer의 방법²³⁾에 따라 행한 후 콜레스테롤, 인지질, 지방산 분석에 사용하였다. 미토콘드리아의 총 콜레스테롤 함량 측정에는 Sale의 방법²⁴⁾을 변형시킨 후 cholesterol kit(영동제약)를 이용하여 효소법으로

식이 지방과 미토콘드리아 막지질 및 막부착 효소

Table 2. Fatty acid composition of the dietary oils¹

Fatty acid (%)	Beef Tallow	Olive Oil	Corn Oil	Perilla Oil	Sardine Oil
14 : 0	5.02 ± 0.2				6.5 ± 0.1
16 : 0	27.1 ± 0.4	10.0 ± 0.1	12.5 ± 0.1	6.1 ± 0.1	18.4 ± 0.2
16 : 1	4.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1			9.2 ± 0.1
18 : 0	17.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	2.13 ± 0.1	1.8 ± 0.1	4.2 ± 0.1
18 : 1	41.2 ± 0.4	77.8 ± 0.1	26.2 ± 0.1	16.7 ± 0.1	17.1 ± 0.1
18 : 2(n6)	5.0 ± 0.3	6.7 ± 0.1	56.9 ± 0.1	13.5 ± 0.2	2.4 ± 0.1
18 : 3(n3)		1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	62.0 ± 0.3	1.5 ± 0.1
20 : 0					6.8 ± 0.1
20 : 1					1.8 ± 0.1
20 : 5(n3)					18.1 ± 0.1
22 : 6(n3)					14.1 ± 0.4
SFA (%)	49.4	13.2	14.6	7.9	35.9
MUFA (%)	45.6	78.9	26.2	16.7	28.1
PUFA (%)	5.0	8.0	59.1	75.5	36.1
UFA/SAF	1.0	6.6	5.8	11.7	1.79
P/S ratio	0.10	0.61	4.05	9.56	1.01

¹ Expressed as % (w/w) distribution of fatty acid methyl esters n=3

측정하였다. 미토콘드리아의 총 인지질 함량은 Rouser 등의 방법²⁵⁾에 따라 측정되고 인지질의 조성은 Patton 등의 HPLC를 이용한 방법²⁶⁾에 의하여 분석하였다. HPLC는 Waters사 제품 model #510기종을 사용하였고 column은 10 μ Lichrospher Si 100(4.0mm \times 25cm; Merck사 제품)을 이용하였다. 분리용액으로는 hexane : 2-propanol : 25mM phosphate buffer : ethanol : acetic acid를 367 : 490 : 62 : 100 : 0.6로 섞어 사용하였고 인지질의 흡광도를 205nm에서 측정하였다. 분리된 각 peak는 표준 인지질 용액을 사용하여 retention time을 비교하여 측정하였다.

3) 미토콘드리아의 단백질 함량 측정

미토콘드리아의 단백질 함량은 Bradford 방법²⁷⁾ (Bio-Rad사 제품)을 이용하여 측정하였고 bovine serum albumin을 표준물질로 이용하였다.

4) 미토콘드리아의 adenine nucleotide translocase 활성도 측정

Adenine nucleotide translocase 활성도는 Pfaff와 Klingenberg의 방법²⁸⁾을 변형시킨 Shrago의 방법²⁹⁾

을 이용하여 forward exchange 방법을 사용하였다. 1.5ml 용 microtube를 가루 얼음 속에 꽂아둔 뒤 exchange medium(30mM Tris-Hcl(pH7.4), 75mM Kcl, 1.5mM EDTA) 넣고 여기에 1mg의 단백질을 함유하는 미토콘드리아를 넣어서 2분간 incubation을 시켰다. 그 다음 [8-¹⁴C]-ADP(74,712 dpm/nmole)을 최종 농도가 9.6 μ M이 되게 넣은 후 10초 뒤에 반응을 중단시키기 위하여 AdNT의 저해제인 atractyloside(ATR)를 최종 농도가 200 μ M되게 넣었으며 반응물의 최종용량은 1ml였다. 한편 다른 microtube에는 nonspecific하게 미토콘드리아로 들어간 [8-¹⁴C]-ADP 양을 빼주기 위하여 [8-¹⁴C]-ADP를 넣기 전에 저해제인 ATR과 미토콘드리아를 동시에 넣어주는 실험을 병행하여 실시하였다. 10초간의 반응 시간 후 반응물들을 9,000xg에서 5분간 원심분리 한 뒤 상층액은 aspirator에 의해서 제거되고, 미토콘드리아 pellets은 0.9ml의 exchange medium으로 한 번 씻은 후 0.3ml의 2% sodium dodecyl sulfate 용액에 용해된다. Scintillation cocktail로는 opti-fluor를 사용하였으며 용해된 미토콘드리아의 radioactivity가 liquid scintillation analyzer로 측정되

었다. AdNT의 specific activity는 $[8-^{14}\text{C}]\text{-ADP}$ 가 미토콘드리아 단백질 mg당 일분 동안에 uptake되는 양으로 표현되었다.

4. 통계처리

통계처리는 statgraphics 통계 program을 이용하여 구하였고 모든 결과는 평균치와 표준오차로 표시하였으며, $\alpha=0.05$ 수준에서 ANOVA test 후 Least Significance Difference(LSD) technique에 의해서 실험군의 평균치 간의 유의성을 검증하였다.

5. 시약 및 기구

실험에 사용한 $[8-^{14}\text{C}]\text{-ADP}$ (56.6mci/mmol)은 New England Nuclear 제품, Opti-fluor는 Packard 회사제품, ADP, Atractyloside, fatty acid standard, mannitol, EDTA, Tris 등 대부분의 시약을 Sigma(Sigma chemicals Co., St. Louis, MD, USA) 제품을 사용하였고 단백질 정량 kit는 Bio-Rad 제품을, cholesterol, TG 측정은 영동제약에서 나온 kit를 이용하였다. 기타 시약들도 모두 특급시약을 사용하였다.

실험 결과

1. 식이 섭취량, 체중 및 간 무게의 변화

식이 섭취량은 들기름군이 정어리유군보다 유의적으로 증가하였으며 따라서 체중이 들기름군이 우지군이나 정어리유군보다 유의적으로 높았다. 간 무게는 식이지방에 따른 차이는 없었으나 체중에 대한 상대적인 간의 무게는 정어리유군에서 유의적으로 증가하였다(Table 3). 또한 간의 색깔이

정어리유를 준 군에서만 눈에 띄게 선홍색으로 다른 군과 다름이 관찰되었다.

2. 미토콘드리아의 지방산 조성

미토콘드리아의 지방산 조성은 식이 지방산 조성이 그대로 반영되지는 않았지만 식이 지방에 따라 미토콘드리아의 지방산 조성이 크게 달랐다(Table 4). 즉, linoleic acid가 풍부한 옥수수유를 공급하는 다른 군에 비해 미토콘드리아의 linoleic acid나 arachidonic acid의 함량은 풍부하나 oleic acid나 더 고도의 불포화도 지방산인 EPA나 DHA의 함량은 적었다. 반대로 n-3 지방산의 급원인 정어리유 섭취시는 다른 군에 비해 linoleic acid나 arachidonic acid는 적었으나 palmitic acid나 DHA의 함량은 많았다. 그러나 같은 n-3 지방산의 급원이나 식물성유인 들기름군에서는 linoleic acid나 α -linolenic acid의 함량이 5군 중에서 가장 많았고 EPA 역시 가장 많았으나 DHA 함량은 우지군이나 옥수수유군과 비슷한 수준을 유지하여 DHA로의 전환이 어려움을 보여 주었다. 또한 포화지방산의 급원인 우지군의 경우에도 미토콘드리아의 총포화지방의 함량은 오히려 가장 낮았으며 arachidonic acid의 함량은 5군 중에서 가장 많았다. 특히 식이에 n-3 지방산이 전혀 없었음에도 불구하고 상당량의 n-3 지방산이 미토콘드리아에 나타났다. 결국 이런 지방산 조성의 변화는 n-6/n-3 fatty acid ratio에 많은 변화를 주었으며 그 비율이 옥수수유군에서 가장 높았고 우지군, 올리브유군, 들기름군 순서로 높았으며 정어리유군에서 가장 낮았으며 옥수수유군과 정어리유군 사이에 약 5.6배의 차이가 있었다. 특히 생선유인 정어리유군에서는 mean chain length

Table 3. Effects of rats fed different dietary oils on food intake, body weight and liver weights¹

Diet	Food intake (g/day)	Body weight (g)	Liver weight (g)	Liver weight/Body weight (%)
BT	14.5±0.8 ^{ab}	245.6±12.4 ^a	7.31±0.52 ^a	2.97±0.14 ^a
OO	15.0±0.4 ^{ab}	260.7±7.6 ^{ab}	7.96±0.46 ^a	3.05±0.13 ^a
CO	14.0±0.6 ^b	248.6±11.7 ^{ab}	7.83±0.54 ^a	3.14±0.11 ^{ab}
PO	15.7±0.3 ^a	277.9±5.9 ^b	8.74±0.73 ^a	3.11±0.23 ^{ab}
SO	13.7±0.7 ^b	240.0±14.8 ^a	8.53±0.64 ^a	3.53±0.10 ^b

¹ Values are mean±SEM. Means with different superscript letters within the same column are significantly different at $p<0.05$; n=9-10

식이 지방과 미토콘드리아 막지질 및 막부착 효소

Table 4. Fatty acid composition of hepatic mitochondria in rats fed different dietary oils¹

Fatty acid (%)	BT	OO	CO	PO	SO
16 : 0	14.3±0.4 ^{ab}	13.5±0.6 ^a	16.0±0.4 ^c	15.3±0.3 ^{bc}	20.4±0.5 ^d
16 : 1	2.9±0.3 ^c	1.8±0.2 ^b	0.9±0.1 ^a	1.8±0.3 ^b	3.6±0.2 ^d
18 : 0	17.7±0.6 ^a	20.8±0.7 ^b	20.9±1.3 ^b	21.9±0.6 ^b	18.5±0.7 ^a
18 : 1	13.2±0.5 ^c	13.7±0.2 ^c	7.1±0.3 ^a	8.0±0.2 ^a	11.1±0.4 ^b
18 : 2(n6)	13.1±0.4 ^c	11.1±0.3 ^b	18.7±0.7 ^d	21.2±0.8 ^c	5.6±0.2 ^a
18 : 3(n3)	1.7±0.1 ^a	1.3±0.2 ^a	0.8±0.4 ^a	5.1±0.4 ^b	1.0±0.3 ^a
20 : 1	1.6±0.3	1.5±0.2	0.7±0.3	0.1±0.1	1.0±0.2
20 : 2	2.5±0.2	2.0±0.2	2.9±0.8	0.4±0.1	0.9±0.3
20 : 4(n6)	24.6±1.7 ^c	22.3±0.4 ^c	23.2±1.2 ^c	10.9±0.4 ^a	14.5±0.6 ^b
20 : 5(n3)	0.5±0.3 ^a	0.7±0.4 ^a	1.0±0.6 ^a	9.6±0.7 ^c	6.8±0.7 ^b
22 : 5(n3)	2.0±0.6	2.7±0.5	2.7±0.9	0.1±0.1	0.5±0.2
22 : 6(n3)	5.9±0.5 ^a	8.0±0.4 ^b	4.7±0.5 ^a	5.8±0.4 ^a	16.3±1.0 ^c
SFA (%)	32.0	34.3	36.9	37.2	38.9
MUFA(%)	17.7	17.0	8.7	9.9	15.7
PUFA(%)	50.3	48.1	54.0	53.1	45.6
UFA/SAF	2.13	1.90	1.70	1.69	1.58
MCL	18.5 ± 0.03 ^b	18.7 ± 0.02 ^c	18.5 ± 0.04 ^b	18.3 ± 0.03 ^a	18.7 ± 0.05 ^c
UI	1.99±0.02 ^a	2.04±0.04 ^a	1.92±0.06 ^a	1.95±0.04 ^a	2.24±0.06 ^b
∑ n-6	37.7 ± 1.4 ^c	34.04±0.7 ^b	41.9 ± 1.7 ^d	32.0 ± 0.9 ^b	20.1 ± 0.7 ^a
∑ n-3	10.0 ± 1.0 ^a	12.8 ± 0.3 ^a	9.3 ± 1.1 ^a	20.6 ± 0.9 ^b	24.5 ± 1.6 ^c
n-6/n-3	4.1 ± 0.5 ^c	2.7 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.7 ^c	1.6 ± 0.1 ^{ab}	0.9 ± 0.1 ^a

¹ Values are mean±SEM. Means with different superscript letters within the same row are significantly different at p<0.05 ; n=6

Data are expressed as % distribution of fatty acid methyl esters

MCL(mean chain length)¹⁸⁾

$$= \{16 \times (\% 16 : 0 + 16 : 1) + 18 \times (\% 18 : 0 + 18 : 1 + 18 : 2 + 18 : 3) + 20 \times (\% 20 : 1 + 20 : 2 + 20 : 4 + 20 : 5) + 22 \times (\% 22 : 5 + 22 : 6)\} / 100$$

UI(unsaturation index)¹⁸⁾

$$= \{1 \times (\% 16 : 1 + 18 : 1 + 20 : 1) + 2 \times (\% 18 : 2 + 20 : 2) + 3 \times (\% 18 : 3) + 4 \times (\% 20 : 4) + 5 \times (\% 20 : 5 + 22 : 5) + 6 \times (\% 22 : 6)\} / 100$$

Table 5. Mitochondrial lipid composition in rats fed different dietary oils¹

Diet	Cholesterol (nmole/mg protein)	Phospholipid-Pi (nmole/mg protein)	C/PL-Pi (molar ratio)
BT	12.04±0.29 ^{ab}	779.4±18.2 ^a	0.0156±0.0006 ^a
OO	11.41±0.87 ^a	787.7±11.5 ^a	0.0143±0.0012 ^a
CO	12.11±1.37 ^{ab}	805.9±22.3 ^a	0.0137±0.0014 ^a
PO	13.63±0.58 ^{ab}	870.7±26.6 ^b	0.0159±0.0010 ^{ab}
SO	14.38±0.75 ^b	768.4±20.8 ^a	0.0187±0.0009 ^b

¹ Values are mean±SEM. Means with different superscript letters within the same column are significantly different at p<0.06 ; n=6

Table 6. Mitochondrial phospholipid composition in rats fed different dietary oils¹

Phospholipids (%)	BT	OO	CO	PO	SO
PE	49.2 ± 1.2 ^c	44.3 ± 0.8 ^a	43.8 ± 0.4 ^a	48.5 ± 0.9 ^{bc}	45.9 ± 1.0 ^{ab}
PI	3.5 ± 0.5 ^a	3.2 ± 0.6 ^a	3.5 ± 0.3 ^a	3.0 ± 0.3 ^a	2.6 ± 0.2 ^a
PS	0.5 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.2 ^a	0.4 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.2 ^a	0.3 ± 0.1 ^a
CL	7.8 ± 0.3 ^a	8.0 ± 0.4 ^a	7.8 ± 0.2 ^a	9.9 ± 0.2 ^b	8.4 ± 0.3 ^a
PC	39.0 ± 0.9 ^a	43.9 ± 0.9 ^b	44.6 ± 0.7 ^b	38.2 ± 1.0 ^a	42.8 ± 1.0 ^b
PE/PC	1.23 ± 0.06 ^b	1.01 ± 0.03 ^a	0.98 ± 0.02 ^a	1.27 ± 0.05 ^b	1.08 ± 0.04 ^a

PE=phosphatidyl ethanolamine, PI=phosphatidyl inositol, PS=phosphatidyl serine, CL=cardiolipin
PC=phosphatidyl choline

¹ Values are mean ± SEM. Means with different superscript letters within the same row are significantly different at p < 0.05 ; n = 6

Data represent % of total phospholipids

Table 7. Adenine nucleotide translocase activity in rats fed different dietary oils¹

Diet	AdNT activity (nmole/min/mg protein)
BT	8.66 ± 0.63
OO	8.66 ± 0.66
CO	7.00 ± 0.66
PO	8.14 ± 0.68
SO	8.85 ± 1.05

¹ Values are mean ± SEM

(MCL)나 unsaturation index(UI)가 유의적으로 증가하였다. 특히 n-6/n-3 지방산의 비가 증가할수록 UI의 값이 적었다(Table 4).

3. 미토콘드리아의 콜레스테롤 및 인지질 함량

미토콘드리아의 지질을 추출한 후 Chol/PL 물비를 측정된 결과 미토콘드리아의 콜레스테롤 함량은 정어리유군이 올리브유군에 비하여 유의적으로 높았으며 인지질은 들기름군이 다른 4군에 비하여 유의적으로 높았고 정어리유군에서 가장 낮았다. 따라서 일반적으로 막의 유동성의 지표로서 사용되고 있는 Chol/PL 물비는 정어리유군이 가장 높았고 옥수수유군에서 가장 낮았다(Table 5).

4. 미토콘드리아의 인지질 조성

미토콘드리아의 인지질 조성을 HPLC로 측정된 결과 phosphatidyl ethanolamine(PE)과 phosphatidyl choline(PC)이 전체 인지질의 약 85% 이상을 차지하며 그 다음 cardiolipin(CL), phosphatidyl inosi-

tol(PI), phosphatidyl serine(PS)의 순으로 존재한다. % PE 함량은 우지군과 들기름군에서 많았고 % PC의 함량은 감소하였으며 따라서 PE/PC ratio가 우지군과 들기름군에서 유의적으로 증가하였다. CL의 함량은 들기름군이 유의적으로 높았다(Table 6).

5. 미토콘드리아 adenine nucleotide translocase 활성도에 미치는 영향

Table 7에서 보는 것처럼 미토콘드리아의 adenine nucleotide translocase의 활성도는 옥수수유군에서 약간 감소하는 경향이 있으나 군 간에 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다.

고 찰

지방산 조성이 다른 식이 지방이 막지질 조성을 변화시켜 막부착효소의 활성도를 변화시킬 수 있는지에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으나 그 결과는 조직과 막부착효소의 종류에 따라 다르다.

식이 지방이 막지질 조성에 미치는 영향에 대해서는 많은 연구가 있으며 대부분의 연구에서 포화지방산과 불포화지방산과의 비율에는 크게 영향을 미치지 못하나 개개의 불포화지방산의 상대적인 조성에는 많은 변화를 유도하였다³⁰⁾³¹⁾. 본 연구에서도 식이 지방산 조성은 미토콘드리아의 막인지질의 지방산 조성 특히 n-6/n-3 fatty acid ra-

tion에 많은 변화를 주었으며 따라서 그 값이 옥수수유균에서 가장 높았고 정어리유균에서 가장 낮았다. 이런 지방산 조성의 변화는 막지질의 Chol/PL 물비의 변화 및 인지질 조성 특히 PE, CL PC의 % 조성에 영향을 주었다.

일부 연구에서는 n-6/n-3 fatty acid ratio의 증가시 fluorescence polarization이나 differential scanning calorimetry로 막유동성의 정도를 측정했을 때 유동성이 증가되었음을 보고³²⁾하였고 또 다른 연구에서는 n-3 지방산이 많이 든 생선유를 공급시 막의 n-6/n-3 fatty acid ratio가 감소되었으며 이 때도 역시 막유동성이 증가하였다는 상반된 보고³³⁾도 있었다. 결국 지방산 조성이 다른 식이 지방은 생체막의 지질 조성의 변화에 미치는 정도는 대조군으로 어떤 지방을 사용했느냐에 따라 다르며 실험에 사용한 동물의 나이나 식이에 사용된 지방의 양에 따라 다름이 보고되고 있다³⁴⁾³⁵⁾.

막부착 효소의 활성도와 막지질의 변화와의 상관관계는 아주 복잡하다. 일반적으로 막부착효소의 활성도는 전체적인 막지질의 유동성 뿐만 아니라 최적활성을 나타내기 위해서는 특이한 인지질을 요구하는 것으로 알려지고 있다. 예를 들면 미토콘드리아 외막에 존재하는 β -OH-butyrate dehydrogenase는 PC를 요구하고³⁾³⁶⁾, 내막에 존재하는 cytochrome C oxidase는 CL을 요구하며³⁷⁾ oligomycin-sensitive ATPase³⁸⁾와 AdNT도 CL에 단단히 결합되어 있는 것으로 알려지고 있다³⁹⁾. 또한 일부 막효소는 막의 유동성이나 막지질의 불포화도 정도가 증가하면 그 활성도가 증가하나 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase는 막의 불포화도가 증가하면 그 활성도가 감소하는 것으로 알려져 있다⁴⁾⁴⁰⁾.

AdNT는 ADP/ATP를 교환하는 것을 촉매하는 과정에서 conformational change를 가져야 하기 때문에 AdNT가 부착되어 있는 막지질의 물리적 성질에 의해 그 활성도가 많이 변하는 것으로 알려져 있다. Mak등¹²⁾은 많은 양의 linoleic acid가 많이 함유된 safflower oil을 준 쥐의 간에서 포화지방산이 많이 든 우지를 준 쥐에 비해 미토콘드리아의 AdNT의 Km과 Vmax 값이 모두 증가하였으며 아울러 ADP translocation에 의존하는 state 3 respira-

tion이 증가하였다고 보고하였다. 특히 safflower를 준 군에서의 AdNT Vmax의 증가에 의한 활성도의 증가는 미토콘드리아의 불포화지방산의 함량 증가와 PE/PC ratio의 감소 등 미토콘드리아 막지질의 지질 조성 변화에 기인한다고 하였다. Sul등⁴¹⁾과 Woldegiorgis와 Shrago¹⁷⁾도 Morris hepatomas 에서 $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{-ADP}$ uptake나 저해제에 대한 AdNT의 민감도가 크게 손상이 되었음을 관찰하였으며 hepatoma mitochondria로부터 AdNT를 분리하여 artificial liposome에 넣었을 때는 AdNT 활성도의 변화가 없음을 확인하였다. 따라서 이런 AdNT 손상의 원인으로 미토콘드리아의 내막의 Chol/PL 물비가 크게 증가하여 막지질 환경의 변화 때문이라고 하였다. 또한 동물이 추위에 노출되었을 경우²⁰⁾나 ischemia 상태¹⁴⁾, 노화시¹⁸⁾¹⁹⁾에도 막지질 조성의 변화에 기인하여 AdNT의 활성도가 변하였다. 많은 연구에서 미토콘드리아 막의 콜레스테롤 함량이 감소하거나, PE/PC ratio가 증가하거나, Chol/PL 물비가 감소될 때 AdNT의 활성도가 증가하는 것으로 보고되어 왔으며 또한 막의 유동성의 증가시나 불포화도의 증가시도 AdNT 활성도 및 AdNT의 kinetics들이 변화는 것으로 보고되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾. 그러나 일부 논문¹²⁾에서는 PE/PC ratio가 감소시에 AdNT의 활성도가 증가하는 경우도 있다. 따라서 미토콘드리아 막지질 조성의 변화와 AdNT 활성도와와의 상관관계는 명확하지 않으며 실험 결과에 따라 상반된 결과를 보여주기도 한다. 이는 AdNT 활성도와 막지질 조성과의 상관관계를 조사할 때 일부는 미토콘드리아 전체의 지질 조성을 분석하였고 일부는 내막의 지질조성을 분석하였으며 또한 막지질의 분석시 지방산 조성과 Chol/PL 물비, 인지질 조성을 모두 조사한 논문들은 적으며 대부분 일부 지질 조성과의 상관관계를 비교하였기 때문이라고 생각된다. 실제 미토콘드리아의 외막과 내막의 분리는 쉽지 않으므로 미토콘드리아 내막의 지질 조성보다는 미토콘드리아 전체의 지질 조성을 측정할 경우가 많았으며 이 경우에는 미토콘드리아의 외막에는 콜레스테롤의 함량이 많고 내막에는 CL의 함량이 많은 등 두 막의 지질 조성에는 다소 차이는 있으나⁴²⁾ 미토콘드리아 전체의 지질 조성의

변화는 내막의 지질 조성의 변화를 대부분 반영할 수 있다는 가정하에 실험을 하게 된다.

본 연구에서도 미토콘드리아 전체의 지질 조성을 측정하여 분석한 결과 지방산 조성이 다른 식이 지방이 쥐 간 미토콘드리아의 지방산 조성, Chol/PL 몰비, 인지질 조성에는 많은 변화를 초래하였으나 AdNT 활성도에는 영향을 미치지 못하였다. 이런 연구 결과는 linoleic acid가 많이 함유된 기름이 포화지방산이 많이 함유된 기름보다 AdNT의 활성도가 증가되었다는 Mak등¹²⁾의 연구 결과와는 다소 다른 결과이나, 고등어유와 들기름이 대두유에 비해 심장 미토콘드리아의 내막 지질 조성에는 많은 변화를 유도하였으나 미토콘드리아의 호흡에는 별로 영향을 주지 못한 서와 조⁴³⁾의 실험결과와는 유사한 결과를 보여주었다. AdNT는 산화적 인산화를 조절할 수 있는 중요한 과정이므로 에너지 생성에 중요한 역할을 하는 효소로서 AdNT 활성도의 변화가 없기 때문에 호흡에도 변화가 없는 것으로 생각된다. 이런 결과들은 미토콘드리아가 에너지 생성에 중요한 세포내 소기관이므로 식이에 의한 외부환경 변화에 대한 변화를 최소화하기 위한 적응기전의 하나로 식이 지방산 조성이 다를 경우 미토콘드리아의 지방산 조성 특히 n-6/n-3 ratio에 많은 변화를 유도하였으나 이런 지방산 조성의 변화가 Chol/PL 몰비의 변화와 동시에 인지질의 polar head group의 변화를 초래하여 좁은 범위내의 일정한 막 유동성을 유지하기 위한 적응 기전에 의해서 변화되거나 AdNT 활성도에 크게 변화를 주지 못하는 것으로 추측된다. 그러나 AdNT는 실제 미토콘드리아 내막에 존재하는 운반체이므로 보다 명확한 해석을 위해서는 미토콘드리아 전체의 지질 조성보다는 미토콘드리아를 외막과 내막으로 분리하여 내막의 지질조성을 측정하여 AdNT와의 상관관계를 조사하는 것이 더욱 바람직하다고 생각된다.

Literature cited

1) Narayanareddy K, Vajreswari A. Effect of dietary fats on erythrocyte membrane lipid composition

and membrane bound enzyme activities. *Metabolism* 41 : 352-358, 1992

- 2) Fry M, Blondin GA, Green DE. The localization of tightly bound cardiolipin in cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 255 : 9967-9970, 1980
- 3) Gazzotti P, Bock HG, Fleischer S. Role of lecithin in β -hydroxybutyrate dehydrogenase function. *Biochem Biophys Res Commun* 58 : 309-315, 1974
- 4) Alam SQ, Alam BS. Acyl group composition of lipids and the activities of Na^+ - K^+ ATPase, 5-nucleotidase and glutamyltraspeptidase in salivary glands and kidneys of rats fed diets containing different dietary fats. *Biochim Biophys Acta* 758 : 1-9, 1983
- 5) Neelands PS, Clandinin MT. Diet fat influences liver plasma membrane lipid composition and glucagon-stimulated adenylatecyclase activity. *Biochem J* 212 : 573-583, 1983
- 6) Robblee NM, Clandinin MT. Effects of dietary fat level and polyunsaturated fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membrane and mitochondrial ATPase activity. *J Nutr* 114 : 263-269, 1984
- 7) Klingenberg M. The ADP-ATP carrier in mitochondrial membranes. In : Martoosi AN, ed. *The Enzymes of Biological Membranes* pp383-438, Plenum, New York, 1976
- 8) Shrago E, Shug A, Elson C. Regulation of cell metabolism by mitochondrial transport system. In : Hanson RW and Mehlman MH, eds. *Gluconeogenesis* pp221-238. John Wiley and Son, New York, 1976
- 9) Soboll S, Seita HJ, Sies H, Ziegler B, Scholz R. Effect of long-chain fatty acyl-CoA on mitochondrial and cytosolic ATP/ADP ratios in the intact liver cell. *Biochem J* 220 : 371-376, 1984
- 10) Pfaff E, Heldt HW, Klingenberg M. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Kinetics of the adenine nucleotide exchange. *Eur J Biochem* 10 : 484-493, 1969
- 11) Pande SV, Blanchaer MC. Reversible inhibition of mitochondrial adenine diphosphate phosphorylation by long-chain acyl CoA esters. *J Biol Chem* 246 : 402-411, 1971

- 12) Mak IT, Shrago E, Elson CE. The influence of linoleic acid on the kinetics of adenine nucleotide translocase. *Lipids* 180 : 130-136, 1983 .
- 13) Mak IT, Shrago E, Elson CE. Effect of thyroidectomy on the kinetics of ADP-ATP translocation in liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 226 : 317-323, 1983
- 14) Shug AL, Shrago E, Bittar N, Folts JD, Koke JR. Acyl-CoA inhibition of adenine nucleotide translocation in ischemic myocardium. *Am J Physiol* 228 : 689-692, 1975
- 15) Ball MR, Mclean P. Differential response of liver and kidney adenine nucleotide translocase and pyruvate dehydrogenase activity to alloxan diabetes. *Enzyme* 29 : 15-20, 1983
- 16) Barbour RL, Chan SHP. Adenine nucleotide transport in hepatoma mitochondria and its correlation with hepatoma growth rates and tumor size. *Cancer Res* 43 : 1511-1517, 1983
- 17) Woldegiorgis G, Shrago E. Adenine nucleotide translocase activity and sensitivity to inhibitors in hepatomas. *J Biol Chem* 260 : 7585-7590, 1985
- 18) Kim JH, Woldgiorgis G, Elson CE, Shrago E. Age-related changes in respiration coupled to phosphorylation. I. Hepatic mitochondria. *Mech Ageing Dev* 46 : 263-277, 1988
- 19) Kim JH, Shrago E, Elson CE. Age-related changes in respiration to coupled to phosphorylation II. Cardiac mitochondria *Mech Ageing Dev* 46 : 279-290, 1988
- 20) Mak IT, Shrago E, Elson CE. Modification of liver mitochondrial lipids and of adenine nucleotide translocase and oxidative phosphorylation by cold adaptation. *Biochim Biophys Acta* 722 : 302-309, 1983
- 21) Johnson D, Lardy H. Isolation of liver and kidney mitochondria. In : Estabrook RW and Pullman ME, eds. *Methods in enzymology*, Vol. 10, Academic Press, New York and London, 1967
- 22) Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetal from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5 : 605-608, 1964
- 23) Bligh EG, Dyer NJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 37 : 911-917, 1959
- 24) Sale FO, Marchesini S, Fishman PH, Berra B. A Sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal Biochem* 142 : 347-350, 1984
- 25) Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5 : 494-496, 1969
- 26) Patton GM, Fasulo JM, Robins SJ. Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 23 : 190-196, 1982
- 27) Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254, 1976
- 28) Pfaff E, Klingenberg M. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. I. Specificity and Control *Eur J Biochim* 6 : 66-79, 1968
- 29) Shrago E, Shug A, Elson CE, Spennetta T, Crosby C. Regulation of metabolite transport in rat and guinea pig liver mitochondria by long chain fatty acyl coenzyme A esters. *J Biol Chem* 249 : 5269-5274, 1974
- 30) Abeywardena MY, McMurchie EJ, Russel GR, Sawyer WH, Charnock JS. Response of rat heart membranes and associated ion-transporting ATPase to dietary lipid. *Biochem Biophys Acta* 776 : 48-59, 1984
- 31) Gibson RA, McMurchie EJ, Charnock JS, Kneebone GM. Homeostatic control of membrane fatty acid composition in the rat after dietary lipid treatment. *Lipids* 19 : 942-951, 1984
- 32) McMurchie EJ, Abeywardena MY, Charnock JS, Gibson RA. The effect of dietary lipids on the thermotropic behaviour of rat liver and heart mitochondrial membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 734 : 114-124, 1983
- 33) Flier J, Iokesh BR, Kinsella JE. Increased 5-nucleotidase activity in plasma membranes from rat liver following ingestion of fish oil. *Nutr Res* 5 :

- 277-283, 1985
- 34) Robblee NM, Clandinin MT. Effect of dietary fat level and polyunsaturated fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membranes and mitochondrial activity. *J Nutr* 114 : 263-269, 1984
- 35) Tiwari PK, Clandinin MT, Cinader B, Goh YK. Effect of high polyunsaturated fat diets on the composition of B cell and T cell membrane lipids. *Nutr Res* 7 : 489-498, 1987
- 36) Fleischer S, McIntyre JO, Stoffel W, Tunggal BD. Carbon-13 nuclear magnetic resonances studies of the interaction of lecithin with purified D- β -OH-butyrate apodehydrogenase, a lipid-requiring enzyme. *Biochemistry* 18 : 2420-2429, 1979
- 37) Vik SB, Georgevich G, Capaldi RA. Diphosphatidylglycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78 : 1456-1460, 1981
- 38) Santiago E, Lopez-Moratalla N, Segovia JL. Correlation between losses of mitochondrial ATPase activity and cardiolipin degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 53 : 439-445, 1973
- 39) Beyer K, Klingenberg M. ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 24 : 3821-3826, 1985
- 40) Zuniga ME, Lokesh BR, Kinsella JE. Effect of dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on composition and enzyme activities in liver plasma membrane of mice. *Nutr Res* 8 : 1051-1059, 1988
- 41) Sul HS, Shrago E, Goldfarb S, Rose F. Comparison of the adenine nucleotide translocase in hepatomas and rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 551 : 148-156, 1979
- 42) Daum G. Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 822 : 1-42, 1985
- 43) Suh M, Cho SH. Effect of dietary ω -3 fatty acids on mitochondrial respiration and on lipid composition in rat heart. *Korean Biochem J* 19 : 160-167, 1986