

## n-3계 지방산 투여가 성장기 흰쥐의 간장 및 혈청 Triacylglycerol 농도에 미치는 영향

車載英 · 조영수<sup>1,\*</sup>

佐賀大學農學部應用生物科學科, <sup>1</sup>동아대학교 생명자원과학부

**초 록 :** 식이성지방 n-6/n-3비(1:2) 및 포화지방산:단순불포화지방산:다가불포화지방산비(1:1:1)를 일정하게 조정된 조건하에서 n-3계 지방산,  $\alpha$ -LA( $C_{18:3}$ ), EPA( $C_{20:5}$ ), DHA( $C_{22:6}$ )를 함유시킨 식이를 조제하여 성장기 SD-계 흰쥐 수컷에 2주간 급여하여 간장, 혈청의 Triacylglycerol(TG)농도 및 간장 TG 합성에 관여하는 효소 활성에 대하여 검토하였다. 본 실험에 사용한 EPA 및 DHA는 순도 98%로서 고도로 정제된 ethyl ester 형태로 식이에 첨가하였다. 그 결과,  $\alpha$ -LA군에 비하여 EPA군 및 DHA군에서 간장 및 혈청 TG 농도는 유의적으로 감소하였으나, 총콜레스테롤 농도는 유의차가 인정되지 않았다. 간장의 인지질 농도는 DHA군에서만 유의적으로 증가하였다. 간장 막 결합성 phosphatidate phosphohydrolase(PAP)활성은 간장TG 농도와 같은 경향으로서 EPA와 DHA군에서 유의하게 감소하였으며 Diacylglycerol acyltransferase(DGAT) 활성은 각 군간에는 변화가 없었다. 따라서, 간장TG 농도와 간장 막결합성 PAP활성과의 사이에 높은 상관관계( $r=0.84$ )를 나타내어 간장TG 합성억제가 인정되었다. 지방산 합성계 효소의 활성도는 EPA 및 DHA군에서 감소하였다. 이상의 결과로부터 n-3계 지방산, EPA 및 DHA에 의한 간장 및 혈청 TG 농도의 감소는 막 결합형 PAP 활성과 저해에 의한 간장TG 합성 및 지방산 합성 저해가 관여하는 것이 시사되었다.(1998년 8월 17일 접수, 1998년 9월 18일 수리)

### 서 론

n-3계 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)이 최근 식품영양학적인 측면에서 기능성 물질로서 주목되어 지고 있다. 그 이유 중에서 하나는 PUFA를 섭취, 체내에서 흡수되어 생리활성물질로 변환되어져 여러 가지 기능을 발휘하는 것으로 알려져 왔기 때문이기도하지만 특히, 동맥 경화성 질환, 암, 알레르기 질환 등 많은 질환의 발병과 병태의 수식에 관련되어 있는 것이 알려져 왔기 때문으로 생각되어 진다. PUFA는 식료품 등 체외로부터 공급이 필요 하지만, 이 경우에 n-6계 PUFA와 n-3계 PUFA와의 섭취 비율도 문제시 될 수도 있을 것이다. 또 다른 식품성분의 섭취량도 n-3계 PUFA의 기능에 영향을 주는 중요한 요인으로 생각되어 진다. 여기서 이러한 생리효과를 가진 PUFA로서는 n-3계의 eicosapentaenoic acid(EPA,  $C_{20:5}$ )와 docosahexaenoic acid(DHA,  $C_{22:6}$ )가 중요한 것으로 생각되어 진다. 한편, 어유로부터 얻어진 고도로 정제된 EPA와 DHA를 흰쥐에 투여한 결과 EPA는 肝臟과 혈청TG에 대하여, DHA는 간장과 혈청의 총콜레스테롤에 대하여 각각 강한 상승 억제작용을 나타내어 EPA와 DHA에는 생리적인 차이가 있다는 것을 보고<sup>1,2)</sup> 하였다. n-3계 PUFA로서는  $\alpha$ -linolenic acid( $\alpha$ -LA,  $C_{18:3}$ )혹은  $\alpha$ -LA함유 유지가 지질 농도에 미치는 영향에 대한 연구는 그렇게 많지 않다.<sup>3)</sup> 일반적으로 PUFA투여가 흰쥐의 지질 농도에 미치는 영향에 대한 연구 결과는 n-3계 PUFA, n-6계 PUFA와 n-9계 PUFA계의 비교

검토가 대부분이고 n-3계의 PUFA사이의 지질 대사에 미치는 비교 검토는 많지 않다.<sup>4,5)</sup> n-3계 PUFA의 지질농도 상승 억제에 대해서는 종래 대부분은 어유로부터 추출한 어유와 어유 농축물을 사용한 것이 대부분이고,<sup>6,7)</sup> 고도로 정제된 EPA와 DHA를 사용한 비교 실험은 거의 없다.<sup>8)</sup> 여기서 본 실험에서는 고도로 정제된 EPA와 DHA 그리고 동일계 PUFA인  $\alpha$ -LA를 사용하여 포화지방산:단순불포화지방산:다가불포화지방산비(1:1:1)를 일정하게 조정된 조건하에서 PUFA의 n-6/n-3 비를 1:2로 하여 흰쥐에 투여, 간장 및 혈청 지질 농도에 미치는 영향을 조사함과 동시에 간장TG대사에 관여하고 있는 효소 활성과의 관계에 대하여 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험동물 및 실험식이

실험동물로서는 체중 약 90 g 전후의 성장기 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 Kyudo(Tosu, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 각 군의 체중이 거의 균일하게 분배하여 스티인레스 망제의 개별 케이지를 사용하여 사육온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  습도  $50 \pm 5\%$ 의 동물 사육실에서 사육하였으며 명암은 12시간 주기로서 07:00시부터 19:00시까지의 명기, 19:00부터 07:00시까지의 암기로 하였다. 식이 및 음료수는 09:00~10:00시 사이에 급여하였으며, 이 시기에 식이 섭취량 및 체중 증가량 등의 작업을 행하였다. 실험에 사용한 식이성 EPA와 DHA는 ethyl ester(순도 98%)형태로서 식이에 첨가

찾는말 : polyunsaturated fatty acid,  $\alpha$ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, triacylglycerol

\*연락처

Table 1. The composition of fatty acid ethylester of dietary fat (Weight %)

Fatty acid	$\alpha$ -LA	EPA	DHA
14:0	0.9	0.8	0.8
16:0	31.1	31.5	31.5
16:1	0.1	0.1	0.1
18:0	3.0	2.7	2.7
18:1	32.7	32.6	32.6
18:2	10.0	10.0	10.0
18:3	22.2	0.1	0.1
20:5	0.0	22.2	0.0
22:6	0.0	0.0	22.2
SFA	35.0	35.0	35.0
MUFA	32.8	32.7	32.7
PUFA (n-6)	10.0	10.0	10.0
(n-3)	22.2	22.3	22.3

$\alpha$ -LA:  $\alpha$ -Linolenic acid

PA: Eicosapentaenoic acid

DHA: Docosahexaenoic acid

SFA: Saturated fatty acid

MUFA: Monounsaturated fatty acid

PUFA: Polyunsaturated fatty acid

하였다. 식이성 지방은 포화지방산, 단순불포화지방산 및 다가불포화지방산의 비를 1:1:1의 중량비율로 일정하게 하고, 다가 불포화지방산의 2/3는 n-3계 지방산,  $\alpha$ -LA, EPA 및 DHA로 각각 첨가하고 나머지는 n-6계 지방산으로 첨가 하였다. 식이의 지방산 조성은 Table 1에 표시하였다. 흰쥐는 분말 시판용 식이(CE-2, Japan clea)로서 7일간 예비 사육 후 실험식이로서 2주간 자유급여 시켰다. 실험식이의 조성은 카제인을 단백질원으로 하여 20%, choline bitartrate 0.2%, corn starch 15%, mineral mixtures(AIN-76)) 4.0%, vitamin mixtures(AIN-76)) 1%, 유지 10%, cellulose 5%에 sucrose를 더하여 100%로 하였다.

#### 분석시료의 조제 및 분석

흰쥐를 2주간 사육 시킨 후 실험 최종일에 12시간 절식 시킨 후 에텔 마취 하에 개복하고 복부 대동맥으로부터 채혈한 후, 장기를 적출하여 생리적 식염수로 충분히 관류하고 분석 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다. 채혈한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리한 후 혈청 지질 분석에 사용하였다.

#### 혈청지질 분석

혈청 total cholesterol 측정은 cholesterol-G-test wako(Wako Junyaku, Osaka, Japan)를 사용하여 cholesterol oxidase phenol법에 의하여 측정하였고, 혈청 triacylglycerol 농도는 triglyceride E-test wako(Wako Junyaku, Osaka, Japan)를 사용하여 GPO-DAS법에 의하여 측정하였으며, 혈청 phospholipid는 phospholipid C-test wako(Wako Junyaku, Osaka, Japan)를 사용하여 효소법으로 측정하였다.

#### 간장 총지질 추출

간장 총지질은 Folch등의 방법<sup>10)</sup>으로 추출하였다. 즉, 간

장 1 g을 15 ml의 chloroform 7.5 ml의 methanol과 함께 균질화 시킨 후,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 가운 추출하였다. 그 후 chloroform : methanol 혼합액(2:1 v/v)으로 25 ml로 하여 여과하고, 여액에 4.5 ml의 증류수를 가하여 혼합시킨 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 chloroform층을 질소 가스 하에서 농축 응고하여 5 ml의 석유에테르로 다시 용해하였다.

#### 간장 triacylglycerol 농도 측정

간장 triacylglycerol 농도는 Fletcher의 방법<sup>11)</sup>에 준하여 정량 하였다. 지질추출액의 일부를 질소가스 하에서 건조시킨 후 10 ml의 isopropanol : 증류수(9:1) 및 0.2 g의 silicagel을 첨가후 잘 혼합하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리시켜 상정액 2 ml에 1 M KOH 0.6 ml를 가하여  $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 의 수조에서 15분간 가운 시킨 후 3 mM의 과요오드산나트륨 1ml, 아세틸아세톤액 0.5 ml를 가하여 충분히 혼화시켜,  $50^{\circ}\text{C}$ 의 수조에서 30분간 발색 시킨 후 방냉하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 간장 phospholipid 농도 측정

간장 phospholipid 농도의 분석은 Bartlett등의 방법<sup>12)</sup>에 의하여 분석하였다. 지질 추출액의 일부를 질소가스 하에서 건조시켜, 0.4 ml의 70% 과염소산을 가하고  $160\sim 180^{\circ}\text{C}$ 에서 약 30분간 가열한 후 증류수 4 ml, 5% 폴리브덴산암모늄 0.2 ml, 아미돌 시약 0.2 ml순으로 가하여 끓는 물에서 7분간 반응시킨 후 820 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 간장 total-cholesterol 농도 측정

간장 total-cholesterol 농도는 Sperry 와 Webb의 방법<sup>13)</sup>으로 정량 하였다. 지질 추출액의 일부를 질소 가스 하에서 건조 후 0.5 ml의 ethanol : acetone(1:1)가하고 냉각 시킨 후 0.1% phenolphthalene을 한방울 가하고, 10% 초산용액으로 중화 시켰다. 중화 후, 0.2 ml의 digitonin용액을 가하여 잘 혼합하였다. 그 다음 암소에서 하룻밤 보존했다. 이것을 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상정액을 제거시킨 후 digitonin 침전물은 에탄올 1~2회 세정하였다. 다시 같은 조건하에서 원심분리하여 에탄올층을 제거시킨 후 digitonin 침전물을 dry oven에서 건조 시켰다. 뜨거울 때 0.5 ml의 빙초산을 가하고 격하게 혼합시켜 침전을 용해 시켰다. 그 다음 1 ml의 무수초산 : 농황산(20:1)혼합액을 가하여  $25^{\circ}\text{C}$ 의 수조 중에서 가운 발색시켜 정확히 30분 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 지방산 분석

Microsome 인지질의 지방산 분석은 Thin-Layer Chromatography로서 분리 후 HCl : methanol(1:5)로  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 methylation시켰다. 이렇게 하여 얻어진 지방산 methylester는 GC-14A gas chromatography(Shimadzu, Kyoto Japan)를 사용하여 capillary column(Omega wax 320, supelco 30 m  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ )로서 carrier gas는 He gas, Column온도  $180^{\circ}\text{C}$ ,

기화실 온도 250°C, 검출기 온도 260°C에서 행하였다.

### 효소활성측정

**Phosphatidate phosphohydrolase(EC 3.1.3.4, PAP)활성 측정:** PAP활성 측정은 Walton 등의 방법<sup>19)</sup>에 준하여 측정하였다. 즉, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0), 1.25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>의 첨가와 무첨가의 반응액 50 µl에 0.9% NaCl-용액에 용해시켜 1 mM phosphatidate 및 phosphatidylcholine을 함유한 기질 50 µl를 가한 다음 0.1 ml의 효소 (50~100 µg protein)을 가하여 반응을 시작했다. 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1.8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, 1.25% ascorbic acid, 0.32% ammonium molybdate를 각각 0.25 ml, 0.13% sodium dodecyl sulfate를 0.1 ml 가하고, 45°C에서 20분간 가온 발색시킨 후 820 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Diacylglycerol acyltransferase(EC 2.3.1.20, DGAT)활성 측정:** DGAT 활성 측정은 Coleman과 Bell의 방법<sup>15)</sup>에 의하여 측정하였다. 즉, 175 mM-Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM-MgCl<sub>2</sub>, 30 µM [<sup>14</sup>C]palmitoyl-CoA (Amersham International, Amersham, England, 200,000 cpm/incubation), bovine serum albumin(fatty acid free, Sigma, Co., USA) 1 mg/ml을 함유한 0.35 ml와 125 µM 1,2-dioleoylglycerol을 ethanol에 분산시킨 0.05 ml에 효소액(20 µg protein) 0.1 ml를 가하여 반응을 개시하였다. 23°C에서 10분간 반응시킨 후 isopropylalcohol:heptane:중류수(80:20:2 v/v/v) 3.75 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 그 다음 2.5 ml heptane 및 1.25 ml의 중류수를 가하여 5분간 혼합한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리시켜, 상정액 3.5 ml를 취하여 liquid scintillation counter (Wallic system 1410, Pharmacia, Uppsala, Sweden)에서 방사능을 측정하였다. 반응시킬 때 첨가한 [<sup>14</sup>C]-pamitoyl CoA의 비 방사능 활성으로부터 생성된 [<sup>14</sup>C]-triglyceride의 비 방사능을 구하였다.

**Glucose-6-phosphate dehydrogenase(EC 1.1.1.49, G6PHD)활성 측정:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase(EC 1.1.1.49, G6PHD)활성 측정은 Kornberg와 Horecker의 방법<sup>10)</sup>에 준하여 측정하였다. 즉, 0.32 M Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM-MgCl<sub>2</sub>, 66 mM glucose-6-phosphate, 24 mM NADP와 1 unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 함유한 반응액 2 ml에 효소액(250 µg protein함유) 2 ml를 가하여 반응을 개시하였다. 27°C에서 2분간 반응시킨 후 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 NADPH생성량(nmol/min/mg protein)으로 표시하였다.

**Malic enzyme(EC 1.1.1.40, ME)활성 측정:** ME활성 측정은 Ochoa의 방법<sup>17)</sup>에 준하여 측정하였다. 즉, 0.4 M triethanolamine (pH 7.4), 30 mM malic acid, 0.12 M MgCl<sub>2</sub>, 3.4 mM NADP를 함유한 반응액 1 ml에 2 ml의 효소액(250 µg protein)을 가하여 반응을 개시하였다. 27°C에서 2분간 반응시킨 후 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 NADPH생성량(nmol/min/mg/protein)으로 나타내었다.

### 통계처리

실험에 의하여 얻어진 data는 Duncan's multiple range test를 사용하여 통계처리 하였다.

## 결과 및 고찰

### 체중 및 식이 섭취량

체중 증가량, 식이 섭취량 및 간중량을 Table 2에 표시하였다. 각 구간에서는 유의차가 인정되지 않았다. 상대적으로 간중량은 EPA군에서 유의적으로 증가하였다. 그 원인에 대해서는 아직 불분명하다. 앞으로 EPA군에서의 간중량 변화에 관해서는 좀더 주의깊은 검토가 필요할 것으로 생각되어진다.

### 간장 및 혈청 지질 농도

간장 및 혈청 지질농도는 Table 3에 표시하였다. 간장TG 농도는 α-LA군에 비하여 EPA군 및 DHA군에서 유의적으로 감소 하였으나, EPA군과 DHA군 간에는 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 간장 인지질 농도를 보면 α-LA군 및 EPA군에 비하여 DHA군에서 유의적으로 증가 하였다.간장의 콜레스테롤 농도는 각 구간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다. n-3계 PUFA를 다량 함유하고 있는 어유가 간장 및 혈청TG 농도를 저하시킨다는 보고가 있으나, 이러한 지질 저하작용이 어떤 종류의 n-3계 PUFA에 기인하고 있는지에 대해서는 분명 하지 않다.<sup>19,21)</sup> 어유의 영양생리학적 기능에는 어유를 구성하고 있는 각각의 구성 지방산에 의한 효과 내지는 불포화도와 P/S 비율의 차이가 영향을 미칠 가능성도 배제할 수 없다. 본 실험에서는 이러한 것들을 고려하여 PUFA/MUFA/SFA비율을 일정하게 조정된 조건하에서 각 n-3계 지방산 투여가 흰쥐의 간장과 혈청의 중성지질농도 및 그와 관련된 효소활성에 대하여 검토하였다. 그 결과, α-LA군에 비하여 EPA군과 DHA군에서 간장, 혈청 TG농도가 현저하게 저하하는 것이 인정되었다(Table 3). 그러나, EPA군과 DHA군 사이에서는 영향의 차이가 없었다. EPA와 DHA를 투여한 정상적인 흰쥐와 고지혈증이 유발된 흰쥐의 실험에 있어서도 α-LA 투여에 의한 것 보다 EPA와 DHA투여에 의하여 현저하게 혈청 지질 농도가 저하하였다고 보고<sup>22)</sup>하고 있으며, 본 실험의 결과에서도 이

**Table 2. Effects of dietary n-3 fatty acids on body weight, food intake, and liver weight in rats**

Measurement	α-LA	EPA	DHA
Body weight (g)			
Initial	149.8±1.6	149.9±3.2	149.9±2.1
Final	232.9±4.2	230.7±2.9	226.2±3.9
Food intake (g/day)	15.8±0.5	16.0±0.2	16.2±1.2
Relative liver weight (%)	4.03±0.0 <sup>a</sup>	4.87±0.1 <sup>b</sup>	4.17±0.1

α-LA: α-Linolenic acid

EPA: Eicosapentaenoic acid

DHA: Docosahexaenoic acid

Each value represents mean ± SE of four rats.

Values with different letters are significantly different at p<0.05.

**Table 3. Effects of dietary n-3 fatty acids on the lipid concentrations of liver and serum in rats**

Measurement	$\alpha$ -LA	EPA	DHA
<b>Liver lipids (mg/g liver)</b>			
Triacylglycerol	27.0 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	20.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	20.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
Phospholipid	21.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	20.5 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	26.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
Total-Cholesterol	2.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.0
<b>Serum lipids (mg/100 ml)</b>			
Triacylglycerol	147.0 $\pm$ 16.1 <sup>a</sup>	106.6 $\pm$ 15.8 <sup>b</sup>	122.4 $\pm$ 31.6 <sup>ab</sup>
Phospholipid	268.8 $\pm$ 10.9	234.0 $\pm$ 16.0	224.3 $\pm$ 9.0
Total-Cholesterol	80.1 $\pm$ 2.3	77.3 $\pm$ 11.6	67.1 $\pm$ 4.2

$\alpha$ -LA:  $\alpha$ -Linolenic acid

EPA: Eicosapentaenoic acid

DHA: Docosahexaenoic acid

Each value represents mean  $\pm$  SE of four rats.

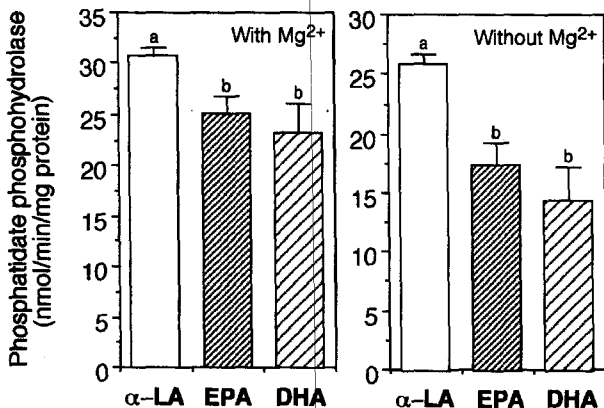
Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

한 것을 지지한다. n-3계 지방산 및 어유에 의한 肝臟TG 저하 작용의 기구로서는 TG생합성억제,<sup>23)</sup> 지방산 산화촉진,<sup>3,8)</sup> VLDL 합성 및 분비저해,<sup>24)</sup> 등이 생각되어 진다.

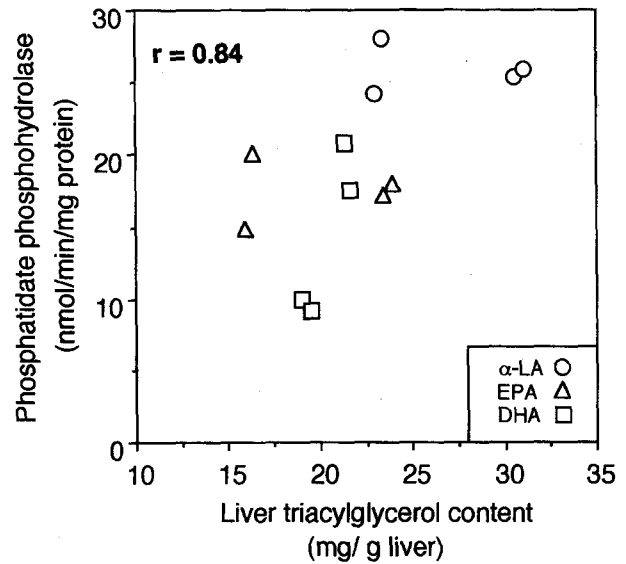
**효소활성**

肝臟TG 생합성의 key 효소로서 phosphatic acid에서 diacylglycerol 생성을 촉매하는 microsomal PAP활성을 Mg<sup>2+</sup> 첨가 및 무첨가 조건에서 측정하여 Fig. 1에 표시하였다. 그 결과 microsomal PAP 활성은  $\alpha$ -LA군에 비하여 EPA군과 DHA군에서 유의적으로 저하하였다. 그러나, EPA군과 DHA군 간에는 유의적인 차이는 인정되지 않았다. Microsomal PAP활성은 Mg<sup>2+</sup> 무첨가와 비교해서 첨가군에서 높은 값을 나타내어 Mg<sup>2+</sup> sensitive PAP 효소인 것이 확인되었다.

TG는 Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), Phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP) 및 Diacylglycerol acyltransferase (DGAT)가 촉매하는 glycerol-3-phosphate (G-3-P) 경로에서 생합성 된다.<sup>25)</sup> 이 중에서 PAP와 DGAT는 肝臟TG 생합성의 key효소인 것으로 생각되어 지고 있지만, 최근의 보고에서는 PAP 활성이 TG 생합성을 조절하



**Fig. 1. Effects of n-3 fatty acids on the activity of phosphatide phosphohydrolase of hepatic microsomal fractions in rats. Each value represents mean  $\pm$  SE of four rats. Values with different letters are significantly different at  $p > 0.05$ . Abbreviations:  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -Linolenic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid.**



**Fig. 2. Correlation between microsomal phosphatide phosphohydrolase activity and triacylglycerol content in liver. Abbreviations:  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -Linolenic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid.**

는데 중요하다는 것을 시사하고 있다.<sup>26-28)</sup> PAP는 간세포 microsome, cytosol 및 plasma membrane에 존재한다.<sup>29)</sup> TG 생합성에는 N-ethylmaleimide-sensitive인 microsomal PAP가 관여하고, cytosolic PAP는 microsomes에로의 자리를 바꿈에 의하여 활성화되어 진다.<sup>29)</sup> n-3계 PUFA에 의한 응답의 대부분은 TG 생합성에 관여하는 막 결합 효소의 저하에 의하여 개입된 것이 증명되어져 있다.<sup>24,26,27)</sup> Fig. 1에 표시한 것과 같이 microsomal PAP활성은  $\alpha$ -LA군보다 EPA군과 DHA군에서 현저하게 저하하였으며 肝臟TG농도와 같은 경향을 나타내었다. 따라서 肝臟microsomal PAP활성과 肝臟TG 농도 간에는 높은 正의 상관( $r=0.84$ )관계가 확인되었다(Fig. 2). 이러한 것들에서 볼 때, Phosphatidic acid (PA)로부터 DG로의 생성속도가 肝臟TG 농도의 좋은 지표가 될 수 있다는 것을 시사한다. 그러나 EPA군과 DHA군과의 사이에는 큰 차이가 인정되지 않았다. 이러한 것들은 다른 실험동물에 있어서도 식이 지방산의 불포화도가 TG농도에 영향을 미친다는 것이 보고되어 있다.<sup>1,7)</sup> 다른 연구자들<sup>3,27)</sup>에 의해서도 식이중에 n-3계 지방산의 섭취량이 많을수록 혈청TG가 감소하고, 이것은 간PAP활성의 연동과 상관이 있다고 보고하였다. 한편, 간세포 내의 PAP는 세포질에서 막으로의 전이를 조절함에 의하여 간TG 합성을 조절한다는 것이 알려져 있다.<sup>30)</sup> PAP는 세포질로부터 막으로의 전이는 다가 불포화 지방산의 이중결합수가 많을수록 저하시키는 작용이 높다고 하였다.<sup>30)</sup> 따라서, 간 microsomal 인지질의 조성을 분석한 결과, 식이 지방산의 섭취를 반영하여 EPA 및 DHA군에서는 각각 EPA 및 DHA함량 비율이 현저하게 높은 값을 나타내었다(Table 5). 이러한 결과는 n-3계 PUFA의 TG저하작용의 일부는 막결합PAP 활성의 저해에 기인하고 있다는 것이 강하게 시사되었다.

肝臟TG 생합성의 마지막 단계 효소인 DGAT활성은

**Table 4. Effects of dietary n-3 fatty acids on the enzymatic activities related with hepatic triacylglycerol and lipogenesis in rats (nmol/min/mg protein)**

Measurement	$\alpha$ -LA	EPA	DHA
Diacylglycerol acyltransferase			
Microsomes	2.89±0.22	2.80±0.59	2.78±0.13
Glucose-6-phosphate dehydrogenase			
Cytosol	219±25 <sup>a</sup>	152±17 <sup>b</sup>	160±17 <sup>b</sup>
Malic enzyme			
Cytosol	135±12	132±15	127±13

$\alpha$ -LA:  $\alpha$ -Linolenic acid

EPA: Eicosapentaenoic acid

DHA: Docosahexaenoic acid

Each value represents mean  $\pm$  SE of four rats.

Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

**Table 5. Effects of dietary n-3 fatty acids on fatty acid composition of hepatic microsomal phospholipid in rats (%)**

Measurement	$\alpha$ -LA	EPA	DHA
14:0	0.22±0.03	0.35±0.11	0.26±0.06
16:0	25.23±1.01	25.21±1.36	25.86±1.01
16:1	0.96±0.03	0.94±0.08	0.92±0.04
18:0	34.75±1.45	34.17±3.20	35.03±1.51
18:1	4.42±0.97	5.03±0.64	5.83±0.46
18:2 n-6	8.78±0.73 <sup>a</sup>	10.20±0.75 <sup>ab</sup>	11.49±0.38 <sup>b</sup>
18:3 n-3	0.19±0.04	0.16±0.03	0.21±0.01
20:4 n-6	18.16±0.36 <sup>a</sup>	10.89±1.51 <sup>b</sup>	7.99±0.76 <sup>b</sup>
20:5 n-3	1.08±0.14 <sup>a</sup>	3.88±0.35 <sup>b</sup>	2.77±0.52 <sup>b</sup>
22:6 n-3	6.20±0.43 <sup>a</sup>	6.16±0.99 <sup>a</sup>	9.66±1.45 <sup>b</sup>

$\alpha$ -LA:  $\alpha$ -Linolenic acid

EPA: Eicosapentaenoic acid

DHA: Docosahexaenoic acid

Each value represents mean  $\pm$  SE of four rats.

Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

[<sup>14</sup>C]-palmitoyl-CoA를 사용하여 세포 획분에서 측정하였다. DGAT활성은 식이 지방산 섭취에 의해서는 유의적인 차가 인정되지 않았다. DGAT는 肝臟TG 생합성의 마지막 단계에 관여하는 효소로서 DG로부터 TG로의 전환을 촉매시키는 효소이다.<sup>29</sup> 지금까지의 보고에 의하면 n-3계 지방산 투여에 의한 영향으로 DGAT활성이 증가한다는 보고<sup>7,8)</sup>와 저하시킨다는 보고<sup>4,29)</sup>가 있다. 이러한 영향은 실험 조건에 의한 차이에서 온 결과라고 생각되어진다. 본 실험에서는 DGAT활성은 식이중의 지방산 형태에 의한 영향은 인정되지 않았다(Table 4). 저자들의 지난번 실험에서 n-3계 지방산은  $\alpha$ -LA와 같이 DGAT 활성이 높다는 것을 보고하였다.<sup>3)</sup> 따라서, TG대사에 대한 DGAT활성이 혈청TG농도와 상관관계에 있다는 보고가 있어<sup>30)</sup> 금후 검토할 필요가 있을 것으로 생각되어 진다.

지방산 합성계 효소의 하나인 glucose-6-phosphate dehydrogenase활성은  $\alpha$ -LA군에 비하여 EPA 및 DHA군에서 유의하게 저하하였다. 그러나, 동일계 효소인 malic enzyme활성은 각 군간에서 차이가 인정되지 않았다(Table 4). 肝臟TG의 생합성에는 지방산이 유효하게 관여한다. 지방산의 공급에는 합성, 산화, 다른 조직으로부터 유입, 혹은 식이 성분이 관여한다.<sup>32,33)</sup> 여기서 지방산을 생합성할때 필요

한 NADPH는 malic enzyme과 glucose-6-phosphate dehydrogenase활성에 의하여 공급되어 진다는 것이 알려져 있다. 따라서 이 malic enzyme활성과 G6PDH활성에 대한 식이 지방산의 영향을 검토한 결과, G6PDH의 활성은  $\alpha$ -LA군과 비교할 때 EPA 및 DHA군에서 현저하게 저하하는 것이 인정되었지만, ME활성은 식이 지방산에 대한 영향은 없었다. 이러한 효소들은 식이 지방산의 섭취에 의하여 그 응답성이 각각 다르다는 것이 알려져 있다. n-3계 PUFA를 함유한 지질은 지방산생합성 효소계의 전사 억제에 개입하여 ME, G6PDH 및 acetyl-CoA carboxylase의 활성을 저하시킨다고 보고하고 있다.<sup>33)</sup> 특히, EPA와 DHA군에서 G6PDH활성을 현저하게 시킨 것도 흰쥐에 의하여 인정되었다.<sup>3,32)</sup> 따라서 n-3계 지방산은 지방산 생합성 효소활성 저하에 개입하여 지방산 공급을 저하 시켜 肝臟 및 혈청TG 농도의 변동에 일부 관여하고 있다는 것을 시사한다.

肝臟의 microsomal 인지질의 지방산 조성을 분석한 결과를 Table 5에 그 결과를 나타내었다. 대조군에 비하여 C<sub>20:4</sub>가 현저하게 낮은 값을 나타내었다. 그러나, EPA 및 DHA군에서는 식이 지방산 투여에 의한 영향이 반영되었다. 즉, EPA군에서는 EPA함량이 높은 값을 나타내 보였으며, DHA군에서는 DHA가 현저하게 높은 값을 나타내었다. 식이 지방산투여에 의하여 간장의 microsomal 인지질의 지방산 조성의 차이가 현저하게 달라진다는 것이 시사되었다. 이러한 결과로부터 肝臟, 혈청의 TG농도의 저하작용은  $\alpha$ -LA군과 비교하여 EPA군과 DHA군에서 강하고, 이 저하는 肝PAP 활성의 저하가 관여하고 있을 가능성이 강하게 나타났으며, EPA군과 DHA군 간에는 그 차이가 없는 것을 확인하였다.

## 감사의 글

본 논문은 1998년도 동아대학교 학술연구조성비(일반과제)의 지원에 의하여 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ikeda, I., Wakamatsu, K., Inayoshi, A., Imaizumi, K., Sugano, M. and Yazawa, K. (1994)  $\alpha$ -Linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids affect lipid metabolism differently in rats. *J. Nutr.* **124**, 1896-1906.
- Kobatake, Y., Kuroda, K. and Jimmouchi, H. (1984) Differential effects of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids on lowering of triglyceride and cholesterol levels in the serum of rats on hypocholesterolemic diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **30**, 357-372.
- Ikeda, I., Cha, J. Y., Yanagita, T., Oogami, K., Yazawa, K., Nakatani, N. and Imaizumi, K. (1998) Effects of dietary  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and  $\beta$ -oxidation in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**(3), 508-513.
- Strum-Odin, R., Adkins-Finke, B., Blake, W. L., Phinney, S.

- D. and Clarke, S. D. (1987) Modification of fatty acid composition of membrane phospholipid in hepatocyte monolayer with n-3, n-6 and n-9 fatty acids and its relationship to triglycerol production. *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 378-391.
5. Halminski, M. A., Marsh, J. B. and Harrison, E. H. (1991) Differential of fish oil, safflower oil and palm oil on fatty acid oxidation and glycerolipid synthesis in rat liver. *J. Nutr.* **121**, 1554-1561.
  6. Rambjcr, G. S., Walen, A. I., Windsor, S. L. and Harris, W. S. (1996) Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipid Res.* **26**, 684-689.
  7. A-Shurbaji, A., Larsson-Backstrom, C., Barglund, L., Eggertsen, G. and Bjorknem, I. (1991) Effect of n-3 fatty acids on the key enzymes involved in cholesterol and triacylglycerol turnover in rat liver. *Lipids*, **26**, 385-389.
  8. Willumsen, N., Hexeberg, S., Skorve, J., Lundquist, M. and Berge, R. K. (1993) Docosahexaenoic acid shows no triglyceride-lowering effects but increases the peroxisomal fatty acid oxidation in liver of rats. *J. Lipid Res.*, **34**, 13-22.
  9. Bieri, T. G., Stoews, G. S. and Briggs, G. M. (1977) Report of the american institute of nutrition Ad Hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340-1353.
  10. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Starley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
  11. Fletcher, M. J. (1968) A colorimetric method for estimating serum triglyceride. *Clin. Chem. Acta*, **22**, 393-397.
  12. Bartlett, G. R. (1958) Colorimetric method for free and phosphorylated glyceride acids. *J. Biol. Chem.* **234**, 446-469.
  13. Sperry, W. M. and Webb, M. (1950) Aversion of the shoehimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, **187**, 97-106.
  14. Cho, Y. S. and Cha, J. Y. (1996) Effect of dietary orotic acid on triacylglycerol metabolism in rats and mice. *Korean J. Life Science*, **6**, 159-164.
  15. Coleman, R. and Bell, R. M. (1976) Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerols. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4537-4543.
  16. Kornberg, A. and Horecker, B. L. (1955) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.) Vol.1, 323-326, *Academic Press*, New York, NY.
  17. Ochoa, S. (1955) Malic enzyme : malic enzymes from pigeon and wheat germ. In *Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.) Vol. 1, 323-326, *Academic Press*, New York, NY.
  18. Duncan, D. B. (1957) Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics*, **13**, 164-176.
  19. Dannellie, P. C., Rietveld, T., Swart, G. R., Stijnen, T. and Van den Berg, J. W. (1994) Effect of dietary fish oil on blood levels of free fatty acids, ketone bodies and triacylglycerol in humans. *Lipids*, **29**, 41-45.
  20. Yanagita, T., Hirata, M., Oogami, K. and Yamamoto, K. (1993) Different effect of dietary fish oil and vegetable oil on lipid and lipoprotein metabolism. *Bull. Fac. Agri. Saga Univ.*, **74**, 69-80.
  21. Wong, S.H., Nestel, P.J., Trimble, R.P., Storer, G.B., Illman, R.J. and Topping, D.L. (1984) The adaptive effects of dietary fish and safflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **792**, 103-109.
  22. Takita, T., Nakamura, K. and Innami, S. (1994) Effect of dietary oils with different n-3 fatty acid source and n-3/n-6 ratios on lipid metabolism of rat fed a high cholesterol diets. *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 695-698.
  23. Rustan, A. C., Nossen, J. O., Christiansen, E. N. and Drevon, C. A. (1988) Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A; 1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J. Lipid Res.* **29**, 1417-1426.
  24. Wong, S. H. and Marsh, J. B. (1988) Inhibition of apolipoprotein secretion and phosphatidate phosphohydrolase activity by eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the perfused rat liver. *Metabolism*, **37**, 1177-1181.
  25. Lamb, R. G. and Fallon, H. J. (1974) Glycerolipid formation from sn-glycerol-3-phosphate by rat liver cell fractions. *Biochim. Biophys. Acta* **348**, 166-178.
  26. Fremont, L. and Gozzelino, M. T. (1996) Dietary sunflower oil reduces plasma and liver triacylglycerols in fasting rats and is associated with decreased liver microsomal phosphatidate phosphohydrolase activity. *Lipids* **31**, 871-878.
  27. Surette, M. E., Whelan, J., Broughton, K. S. and Kinsella, J. E. (1992) Evidence for mechanisms of the hypotriglyceridemic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 199-205.
  28. Cha, J.-Y., Mameda, Y., Oogami, K., Yamamoto, K. and Yanagita, T. (1998) Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**(3), 508-513.
  29. Jamal, Z., Martin, A., Gomez-Munosz, A. and Brindley, D. N. (1991) Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J. Biol. Chem.* **266**, 2988-2996.
  30. Hopewell, R., Martin-Sanz, P., Martin, A., Saxton, J. and Brindley, D.N. (1985) Regulation of the translocation of phosphatidate phosphohydrolase between the cytosol and the endoplasmic reticulum of rat liver. *Biochem. J.* **232**, 485-491.
  31. Geelen, M. J. H., Schoots, W. J., Bijleveld, C. and Beynen, A. C. (1995) Dietary medium-chain fatty acid raise and (n-3) polyunsaturated fatty acids lower hepatic TG synthesis in rats. *J. Nutr.* **125**, 2449-2456.
  32. Willumsen, N., Skorve, J., Hexeberg, S., Rustan, A. C. and Berge, R.K. (1993). The hypotriglyceridemic effect of eicosapentaenoic acid in rats is reflected in increased mitochondrial fatty acid oxidation followed by diminished lipogenesis, *Lipids* **28**, 683-690.
  33. Iritani, N., Inoguchi, K., Endo, M., Fukuda, E. and Morita, M. (1980) Identification of shellfish fatty acids and their effects on lipogenic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **618**, 378-382.

---

**Effects of  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids administration on lowering of triacylglycerol level in the hepatic and serum of rats**

Jae-Young Cha and Young-Su Cho\*<sup>1</sup>(*Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga 840, Japan, <sup>1</sup>Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea*)

**Abstract :** We studied the difference effects of dietary  $\alpha$ -linolenic acid ( $\alpha$ -LA, 18:3 n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) on the lowering of triacylglycerol in the liver and serum on lipid metabolism in rats. Rats were fed semipurified diets containing 10% fat with constant polyunsaturated/monounsaturated/saturated fatty acids (1:1:1) and n-6/n-3 ratio (1:2). EPA (98%) and DHA (98%) were added in diets as the ethyl esters. The concentration of liver triacylglycerol was significantly lower in rats fed both EPA and DHA than in those fed  $\alpha$ -LA. The concentration of liver phospholipid was significantly higher in rats fed DHA than in those fed  $\alpha$ -LA and EPA. Both EPA and DHA reduced serum triacylglycerol concentration compared with  $\alpha$ -LA, but this effect was more pronounced in the EPA diet. The activity of phosphatidate phosphohydrolase in the liver microsome was significantly lower in rats fed both EPA and DHA than in those fed  $\alpha$ -LA. but, there was no significant difference on the activities of diacylglycerol acyltransferase among the three groups. The concentration of liver triacylglycerol were correlated with changes in the microsomal phosphatidate phosphohydrolase activity ( $r=0.84$ ). Hepatic NADPH generating enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase was more effective to reduce the activity in rats fed both EPA and DHA than in those fed  $\alpha$ -LA. In conclusion, EPA or DHA reduced the hepatic triacylglycerol concentration by inhibiting microsomal phosphatidate phosphohydrolase, thereby inhibiting synthesis of triacylglycerol in the liver.

---

Key words : polyunsaturated fatty acid,  $\alpha$ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, triacylglycerol

\*Corresponding author