

Dimethylhydrazine으로 처리한 쥐에서 식이의 Calcium 함량과
지방종류에 따라 혈장 Cholesterol 수준과
Cholesterol 대사에 미치는 영향*

박현서 · 지은이 · 강금지**

경희대학교 가정대학 식품영양학과
덕성여자대학교 사회과학대학 아동·가족학과**

Effect of Dietary Calcium and Fat on Plasma Cholesterol Level and Cholesterol
Metabolism in 1, 2-dimethylhydrazine-treated Rats

Park, Hyun-Suh · Jie, Eun-Yee · Kang, Keum-Jee**

Department of Foods and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
Department of Human Development & Family Studies,** Duksung Women's University,
Seoul 132-714, Korea

ABSTRACT

The study was designed to observe the effect of dietary calcium and fats on plasma cholesterol level, hepatic microsomal fluidity and HMG-CoA reductase activity as well as the excretion of fecal bile acids and neutral sterols in 1,2-dimethylhydrazine(DMH)-treated rats. Male Sprague Dawley rats, at 7 weeks of age, were divided into 2 groups, 0.3% and 1.0% Ca levels and each group again subdivided into 2 groups of corn oil and perilla oil. Each rat was intramuscularly infused with DMH for 6 weeks to give total dose of 180mg/kg body weight and also fed experimental diet containing 15%(w/w) different fat and Ca(0.3% or 1.0%) for 20 weeks. High dietary calcium(1.0%) did not significantly influence on plasma cholesterol as well as hepatic microsomal fluidity and HMG CoA reductase activity, but significantly reduced the excretion of total bile acid per gram of feces and increased the excretion of total neutral sterol. However, high dietary Ca reduced the excretion of secondary bile acid(deoxycholic and lithocholic acids) which was known as promotor for colon cancer. Perilla oil rich in n-3 α -linolenic acid significantly decreased plasma cholesterol by increasing hepatic microsomal fluidity compared with corn oil, but did not influence on HMG CoA reductase activity. Perilla oil did not influence on fecal excretion of total and primary bile acids, but reduced the excretion of secondary bile acids. Therefore, it could be recommended to consume more fish product and food rich in calcium and use more perilla oil in meal preparation to prevent from coronary heart disease and colon cancer especially when high fat diet has been practiced. (*Korean J Nutrition* 31(9) : 1394~1403, 1998)

KEY WORDS : dietary fats · calcium level · cholesterol synthesis · corn oil · perilla oil · HMG-CoA reductase · secondary bile acid.

채택일 : 1998년 12월 4일

*This research was supported by a grant from Korean Foundation of Science Promotion(1993-1995).

서 론

실험재료 및 방법

심혈관계질환(cardiovascular disease, CVD)의 발병은 특히 혈청 cholesterol 농도와 밀접한 관계가 있으며, 이는 식이의 지방산조성에 따라서도 영향을 받는다고 알려져 있다¹⁻⁴⁾. 포화지방산은 혈장 cholesterol 농도를 상승시켰는가 하면 다불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)에 의해서는 감소되었는데^{3,4)}, PUFA 중에서 n-6계 지방산에 비해 n-3계 지방산은 일관성있게 더욱 효과적으로 혈청 cholesterol 농도를 감소시켰다.

한편, Fleischman 등 보고^{5,6)}에 의하면, 쥐에게 atherogenic한 diet에 칼슘(calcium, Ca)을 첨가해 주었을 때는 Ca 무첨가군에 비해 혈청 cholesterol이 35%, TG가 10% 감소하여 Ca을 hypocholesterolemic한 인자라고 하였다. 그러나 다른 보고⁷⁾에 의하면 4주된 양에게 콩기름과 쇠기름을 20주 동안 공급하면서 식이에 Ca을 0.4% 첨가했을 때 혈장 cholesterol과 lipoprotein cholesterol의 농도는 지방의 종류와 Ca 첨가에 의해 영향이 없었고 간조직에 cholesterol 축적이 증가되었으며, Ca이 지질 농도에 미치는 효과에 대해서는 일관성이 없었다.

심혈관계 질환의 증가와 더불어 암의 발병도 증가하며 특히 대장암의 발병율은 꾸준히 증가하는 추세이다. 가장 영향을 주는 요인으로 고지방 식이를 하였을 때 더욱 대장암 발생율이 높았다고 하였다⁸⁻¹⁰⁾. 고지방식이를 하였을 때는 변으로 bile acid가 더욱 많이 배설되었으며, 특히 대장내의 박테리아에 의해 생성된 2차 bile acid인 deoxycholic acid와 lithocholic acid의 배설이 증가했다. 이와 같은 물질은 대장세포에 독성이 있으며 암을 촉진하는 인자로서 작용한다고 알려져 있다^{11,12)}. 그런데 Ca은 cholesterol의 분해 산물인 bile acid의 농도를 조절하여 암을 예방하는 효과가 있다고 했다¹³⁾.

그러므로 본 연구에서는 발암원으로 대장암을 유발시킨 쥐에서 혈장 cholesterol을 낮추고 담즙으로 배설되는 bile acid를 감소시킬 수 있는 식이인자를 찾아 cholesterol 대사과정에 미치는 영향을 살펴보고자 지방급원으로 n-6계 지방산이 높은 옥수수유와 n-3계 지방산이 높은 들기름을 선택하고, 식이의 Ca 함량은 0.3%와 1.0% 수준으로 조절한 실험식으로 쥐를 20주동안 사육하여 혈장의 cholesterol, TG 농도와 간조직에서 간소포체막의 유동성과 cholesterol 합성을 좌우하는 HMG CoA reductase, 변으로 배설되는 1차와 2차 담즙산의 함량을 비교 관찰하고자 하였다.

1. 실험계획 및 실험식이

고형사료로 7주간 사육한 Sprague Dawley종 수컷 흰쥐 100 마리를 체중에 따라 난괴법에 의해 4군으로 나누었다. 화학적 발암원으로 처리한 쥐를 식이 지방의 종류에 따라 크게 2군으로 즉, 옥수수기름(corn oil, CO)과 들기름(perilla oil, PO)군으로 나누고, 다시 Ca함량에 따라 각각을 2군(0.3%와 1.0% 수준)으로 나누어 Table 1에서와 같이 4군(low Ca-CO, low Ca-PO, high Ca-CO, high Ca-PO)으로 구성된 실험식으로 20주동안 사육하였다.

실험식은 식이무게 중 단백질이 22%, 당질이 54%, 지방이 15%(총 열량의 30%)로 구성되었으며 n-6 linoleic acid(C18 : 2, LA) 급원으로 CO를, n-3 α -linolenic acid(C18 : 3, α -LNA) 급원으로 PO를 사용했으며 지방산 조성은 Table 2에서와 같다. Ca은 mineral mixture의 형태로 무게에 비례해서 식이에 첨가하였고, 그 이외의 실험식이의 영양소 구성은 전 보고¹⁴⁾에서와 같게 하였다(Table 3). 발암원인 1, 2-dimethylhydrazine(DMH)(99%, Aldrich Chemical Co. Milwaukee, Wis)을 전 보고¹⁵⁾에서와 같게 처리하여 총 180mg/kg을 근육 주사하였다.

2. 시료준비

사육기간 20주가 끝나는 날 아침 공복상태에서 diethyl ether로 마취시킨 후 시료를 채취하였다. 하대 정맥에서 혈액을 채취하여 heparin으로 plasma를 분리하여 -70℃에 보관하였다. 간은 식염수로 씻은 후 1g

Table 1. Experimental design

Dietary groups	Dietary oil	Calcium level
Low Ca-CO	Corn oil	0.3%
High Ca-CO	Corn oil	1.0%
Low Ca-PO	Perilla oil	0.3%
High Ca-PO	Perilla oil	1.0%

All rats were intramuscularly injected with DMH for 6 weeks to give total dose of 180mg/kg body weight.

Table 2. Fatty acid composition of dietary groups

Fatty acids	Corn oil	Perilla oil
C16 : 0	10.83	6.08
C18 : 0	2.01	1.98
C18 : 1	27.45	15.5
C18 : 2	58.07	14.3
C18 : 3	1.64	62.1
Σ PUPA	59.71	76.4
n-3/n-6	0.03	4.34

Expressed as % distribution of fatty acid methyl esters

Table 3. Composition of diets

Ingredients(g)	Dietary groups			
	Low Ca-CO	Low Ca-PO	High Ca-CO	High Ca-PO
Corn starch	54.0	54.0	54.0	54.0
Casein	22.0	22.0	22.0	22.0
Corn oil	15.0	-	15.0	-
Perilla oil	-	15.0	-	15.0
α -Cellulose	3.5	3.5	3.5	3.5
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamin mix ¹⁾	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mix ²⁾	4.0	4.0	4.0	4.0
CaHPO ₄	-	-	1.3	1.3

1) AIN-76 vitamin mix(modified without vitamin E and vitamin A) : g/kg of mix : thiamine HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, nicotinic acid 3, D-calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D-biotin premix(1%) 2, cyanocobalamin(0.1%) 1, cholecalciferol (4,000,000 IU/g) 0.25, menaquinone 0.05, sucrose 990. Vitamin A and E were provided at the levels of 4800 and 180 IU/kg diet.

2) AIN-76 mineral mix : g/kg of mix : CaHPO₄ 500, NaCl 74, K₂H₆O₇·H₂O 220, K₂SO₄ 52, MgO 24, MnCO₃ 3.5, FeC₆H₅O₇ 6, ZnCO₃ 1.6, CuCO₃ 0.3, Na₂SeO₃·5H₂O 0.01, KIO₃ 0.01, CrK(SO₄)₂·12H₂O 0.55, Sucrose(finely powdered) 118.03

을 취하여 phosphate buffer(pH 7.0)를 넣고 균질화한 후 원심분리(500xg, 15min, 4℃)하여 상층액을 취한 다음 다시 고속 원심분리(100,000xg, 60min, 4℃)하여 침전된 microsome fraction을 취하여 -70℃에서 냉동 보관하였다가 효소와 인지질 및 cholesterol 분석을 하는데 사용하였다. 사육기간 20주가 끝나는 주에 같은 균끼리 2~3 마리씩 pool하여 3일간의 변을 수집하여 냉동 보관하였다가 말린 후 분쇄하여 사용하였다.

3. 생화학적 분석

1) Total cholesterol

혈장 총 cholesterol 농도는 McDougal¹⁶⁾의 방법을 참고로 하여 측정하였고 간 조직의 cholesterol 함량은 먼저 Folch¹⁷⁾의 방법으로 지질을 추출한 후 같은 방법으로 측정하였다.

2) Triglyceride(TG)

혈장 TG 농도는 Fletcher¹⁸⁾의 방법으로 분석하였으며, 간조직의 TG 함량은 지질을 추출한 후 혈장에서와 같은 방법으로 측정하였다.

3) Phospholipid(PL)

간 소포체막의 PL 함량은 Bligh와 Dyer¹⁹⁾의 방법으로 microsome에서 지질을 추출한 후 Bartlett²⁰⁾의 방

법으로 phosphorus를 정량하고 factor 25를 곱하여 PL값을 산출하였다.

4) HMG-CoA reductase activity

이 효소의 활성도는 방사성 동위원소를 이용한 Willice와 Kroon²¹⁾의 방법으로 분석했다. 간소포체막에서 Lowry 등²²⁾ 방법에 의해 단백질을 정량한 후 microsome fraction을 일정량(60~240 μ g protein이 함유되도록)을 취해서 200mM phosphate buffer(200mM K₂HPO₄, 2mM EDTA, 10mM dithiothreitol, pH 7.4)를 넣어 50 μ l로 했다. 얼음위에서 tube에 sample을 넣고 25mM NADP⁺, glucose-6-phosphate를 각각 10 μ l 넣고, glucose-6-phosphate dehydrogenase 1 unit를 넣은후 phosphate buffer로 95 μ l가 되도록 하였다. 37℃에서 15분 동안 방치한 후 기질로서(R,S)-(3-¹⁴C-HMG CoA)(8Ci/mol, 1.0 mM) 5 μ l를 넣어 총 100 μ l를 만들고 37℃에서 60분간 incubation했다. 5 M HCl을 10 μ l 가해 반응을 종결시키고, internal standard로[5-³H]- mevalonolactone(0.01 μ Ci)을 1 μ l 넣고 다시 37℃에서 30분간 방치한 후 aliquots을 Silica gel G TLC plate에 넓게 spot하고 acetone/benzene (1 : 1 v/v) 용액으로 전개시켰다. Plate가 마르면 iodine vapor를 사용하여 mevalonolactone의 위치를 확인하여 굵은후 Scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정했다.

5) 변 중 bile acid와 neutral sterol

Bile acid는 Uchida 등²³⁾의 방법에 의해서 말린 변을 잘 분쇄한 후 1g을 취해 ethanol 20ml를 넣고 80℃에서 1시간 추출한 후 원심분리해서 상층액을 취했다. 이 과정을 2회 반복하고 ethanol층을 90℃에서 농축시켜서 1.25N NaOH 2~4ml를 넣고 120℃에서 6시간 동안 autoclave 했다. 동량의 증류수를 넣고 ether 20ml를 넣고 잘 섞은 뒤 수층을 취해 2N-HCl로 산성화시킨 후 동량의 ether로 3회 추출했다. 일정량의 ether층을 취해서 건조시킨후 다시 소량의 petroleum ether에 녹인 후 internal standard로 5 α -cholestane을 넣고 같이 diazomethane으로 methylation했다. 37℃에서 30분간 방치한 후 건조시켜 trifluoroacetic anhydride를 0.2~0.3ml 넣고 같은 조건으로 다시 방치한 후 건조시켜 chloroform에 녹여 gas chromatography(GC)로 분석했다. Neutral sterol은 bile acid와 같은 과정을 거쳐 추출하고 autoclave한 후 증류수와 ether를 섞은 후 ether 층을 취하는데 이 조작을 3회 반복하여 ether 층을 전부 모아 60℃에서 건조시킨 후 internal standard로 5 α -cholestane를

넣고 pyridine : hexamethyldisilazane : trimethylchlorosilane 혼합액(9 : 3 : 1, v/v/v)을 0.3 ml 넣어 37℃에서 30분간 방치하고 건조한 후 heptane 2ml를 넣고 원심분리해서 상층액을 취해 건조시켰다. 소량의 heptane에 다시 녹여 bile acid와 같은 조건으로 GC로 분석했다.

4. 통계처리

모든 실험결과와 통계처리는 statgraphic 통계 program을 이용하였으며 결과는 mean과 standard error(SE, 표준오차)로 표시하였다. 식이지방의 종류와 Ca 수준에 대한 상호 작용을 검증하기 위하여 2 way ANOVA로 분석하여 유의성을 검증하였다(p<0.05).

결 과

1. 혈장과 간조직의 지질농도

식이의 Ca 함량을 0.3%에서 1.0%로 증가시켰을 때 혈장과 간조직의 cholesterol과 TG 수준에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 Table 4에서 CO를 먹인 군끼리 또는 PO를 먹인 군끼리 각각 비교해 보면, 혈장과 간

조직의 cholesterol과 TG 농도는 유의하게 감소되지는 않았으나 cholesterol 함량은 Ca함량을 증가하였을 때 낮아지는 경향만을 보였다. 식이지방의 종류에 따른 영향을 살피기 위해서 low Ca(0.3%)을 먹인 군끼리 또는 high Ca(1.0%) 먹인 군끼리를 각각 비교해 본 결과 혈장의 cholesterol 농도는 식이의 Ca 함량과 상관없이 0.3%나 1.0% 수준 모두 CO에 비해 PO에 의해서 유의성있게 더 낮았으며(p<0.05), 간조직의 cholesterol 함량은 PO에 의해서 더 낮기는 하였으나 유의하지는 않았다. 혈장의 TG 농도는 같은 Ca 수준에서 PO에 의해서 더 낮았으나 유의적인 차이는 아니었다. 간조직의 cholesterol과 TG 함량도 같은 Ca 수준에서 비교하여 보았을 때 PO에 의해서 더 낮기는 하였으나 대부분 유의하지 않았으며, low Ca 수준일 때만 TG 함량이 유의하게 더 낮았다(p<0.0001).

2. 간소포체막의 유동성과 HMG-CoA reductase의 활성도

식이의 Ca량이 1.0%로 증가되었을 때 간 소포체의 cholesterol과 PL 함량에 일관성있는 영향을 주지는 않았으며, 막유동성의 지표로 이용되는 cholesterol과

Table 4. Effect of dietary oils and Ca level on plasma and hepatic cholesterol and triglyceride levels in DMH-treated rats

Dietary groups	Plasma		Liver	
	Cholesterol	Triglyceride	Cholesterol	Triglyceride
	mg/dl		mg/wet g liver	
Low Ca-CO	117.71±3.90 ^b	92.88±2.33	5.72±0.28 ^b	40.03±2.83 ^c
High Ca-CO	115.06±3.34 ^b	94.96±3.45	5.11±0.29 ^{ab}	37.66±3.63 ^{bc}
Low Ca-PO	67.71±3.67 ^a	86.74±3.19	5.09±0.38 ^{ab}	22.39±1.74 ^a
High Ca-PO	73.19±2.72 ^a	91.42±3.42	4.45±0.19 ^a	27.60±2.23 ^{ab}
P-value				
Oil	<0.0001	<0.0242	<0.0242	<0.0001
Ca	NS	NS	NS	NS
Oil x Ca	NS	NS	NS	NS

Values are mean±SE, Number of rats=25 for plasma and 10 for liver. Means sharing common superscript in the same column are not significantly different at p<0.05.

Table 5. Effect of dietary oils and Ca level on hepatic microsomal cholesterol and phospholipid ratio and HMG CoA reductase in DMH-treated rats

Dietary groups	Cholesterol	Phospholipid	Chol/PL ratio	HMG CoA reductase
	mg/g liver		pmol/mg prot/min	
Low Ca-CO	0.286±0.016	2.10±0.155 ^a	0.146±0.108 ^b	19.06±2.30
High Ca-CO	0.269±0.158	2.24±0.099 ^{ab}	0.134±0.051 ^b	25.44±5.61
Low Ca-PO	0.244±0.012	3.52±0.237 ^b	0.076±0.024 ^a	22.70±4.38
High Ca-PO	0.256±0.162	2.85±0.135 ^{ab}	0.096±0.098 ^a	21.54±2.77
P-value				
Oil	NS	<0.0001	<0.0001	NS
Ca	NS	NS	NS	NS
Oil x Ca	NS	NS	NS	NS

Values are mean±SE, Number of rats=6-8. Means sharing common superscripts in the same column are not significantly different at p<0.05.

PL의 ratio인 chol/PL 값에도 영향이 없었다. 이와 마찬가지로 cholesterol 합성에 관여하는 HMG CoA reductase 활성도에도 일관성있는 영향이 없었다(Table 5). 다음은 식이지방 종류에 의한 영향을 살펴보면 소포체막의 cholesterol 함량은 같은 Ca수준에서 각각 PO에 의해서 더 낮았으나 유의하지는 않았다. PL 함량은 Ca 수준과 상관없이 PO에 의해 더 높았으며 특히 low Ca(0.3%) 수준에서는 유의성이 있었다($p < 0.001$). Ca증가에 의해서는 소포체막의 chol/PL ratio에는 유의한 영향을 주지는 않았으나 지방종류에 따라 유의한 차이가 있어 모든 Ca수준에서 PO에 의해 이 ratio가 유의하게 낮아져 막유동성이 증가되었다. 그러나 PO에 의해 HMG CoA reductase 활성도에 유의한 영향을 미치지 못했다.

3. 변 중 bile acid와 neutral sterol 함량

Table 6은 변으로 배설된 bile acid의 함량을 보여준 것이다. Ca 함량을 증가시켰을 때 지방종류와 상관없이 CO와 PO를 먹인 두군에서 모두 변으로 total bile acid의 배설이 유의하게 감소하였고($p < 0.001$), 1차 bile acid중 chenodeoxycholic acid는 CO를 먹인군에서는 유의하게 감소하였으나 PO를 먹인 군에서는 낮

아진 경향만을 보였다. 또한 cholic acid는 CO를 먹인 군에서는 유의하게 증가하였으나 PO를 먹인군에서는 감소하여 일관성있는 결과를 얻지는 못하였다. 2차 bile acid인 deoxycholic acid와 lithocholic acid는 지방과 상관없이 모두 high Ca 식이에서 유의하게 더 적은량을 배설하였다($p < 0.001$). 3차 bile acid인 hyodeoxycholic acid는 지방과 상관없이 high Ca 식이시 더 많이 배설되었다($p < 0.001$). 식이지방의 종류에 따른 영향을 살펴보면 total bile acid 배설은 Ca 함량 0.3%와 1.0% 수준에서 모두 지방종류에 따른 차이가 없었으며, 1차 bile acid의 배설은 일관성없이 cholic acid는 low Ca 식이시에는 PO에 의해서 배설이 더 높았으나 high Ca 식이시에는 거의 차이가 없었다. 또한 chenodeoxycholic acid 배설도 low Ca 식이시에는 PO에 의해 더 낮았으며 high Ca 식이시에는 유의성이 없었다. 그러나 2차 bile acid의 배설은 Ca 함량에 상관없이 모두 PO에 의해서 더 낮았으며($p < 0.001$), 3차 bile acid 배설은 일관성이 없었다. Table 7은 변으로 배설된 neutral sterol 함량을 보여준 것이다. Ca 함량을 증가시켰을 때 지방과 상관없이 total neutral sterol 배설량이 증가하였으며 특히 CO를 먹인군에서는

Table 6. Effect of dietary oils and Ca level on fecal excretion of bile acids in DMH-treated rats

	Cholic acid	Chenodeoxycholic acid	Deoxycholic acid	Lithocholic acid	Hyodeoxycholic acid	Total bile acids
			$\mu\text{g/g dry feces}$			mg/g feces
Low Ca-CO	688.6 ± 33.2^b	154.2 ± 16.2^c	217.1 ± 19.5^c	317.7 ± 10.3^c	148.5 ± 15.0^a	12.0 ± 0.5^c
High Ca-CO	983.8 ± 64.4^{cd}	94.3 ± 11.7^{ab}	71.3 ± 7.3^a	107.3 ± 12.2^b	338.3 ± 19.6^c	8.6 ± 0.8^b
Low Ca-PO	1073.2 ± 90.1^d	114.5 ± 13.7^b	128.7 ± 13.4^b	247.1 ± 13.8^c	185.5 ± 14.6^a	11.7 ± 0.9^c
High Ca-PO	855.0 ± 58.8^{bc}	107.8 ± 7.67^{ab}	53.9 ± 6.3^a	70.6 ± 13.2^a	245.2 ± 15.1^b	8.6 ± 0.4^b
P-value						
Oil	NS	NS	<0.001	<0.001	NS	<0.001
Ca	NS	<0.019	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Oil x Ca	<0.001	NS	<0.015	NS	<0.001	<0.001

Mean SE. Number of rats=5 of pooled samples

Means sharing common superscripts in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 7. Effect of dietary oils and Ca level on fecal neutral sterols in DMH-treated rats

	Cholesterol	Coprostanol	Coprostanone	Total
		$\mu\text{g/g dry feces}$		mg/g feces
Low Ca-CO	104.7 ± 21.7^b	315.5 ± 67.3^b	640.4 ± 146.3^b	3.9 ± 0.7^{ab}
High Ca-CO	57.3 ± 9.5^a	356.7 ± 35.0^b	420.1 ± 96.6^{ab}	7.6 ± 1.2^c
Low Ca-PO	33.8 ± 4.5^a	112.6 ± 12.7^a	368.3 ± 51.0^a	3.7 ± 0.6^{ab}
High Ca-PO	50.7 ± 11.4^a	202.7 ± 31.0^a	320.6 ± 42.4^a	5.4 ± 1.3^{bc}
P-value				
Oil	<0.010	<0.001	<0.065	NS
Ca	NS	NS	NS	<0.016
Oil x Ca	<0.028	NS	NS	NS

Mean SE. Number of rats=5 of pooled samples

Mean sharing common superscripts in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

유의성이 있었다($p < 0.05$). CO를 먹인 경우에는 Ca이 1.0%일 때 cholesterol과 coprostanone 배설이 감소하였으나 coprostanol 배설은 증가하는 경향만을 보였다. 그러나 PO를 먹인 경우 cholesterol, coprostanol, coprostanone 배설량은 유의한 차이가 아니었다. 지방종류에 따라 neutral sterol 배설량에 미치는 영향을 살펴보면 low Ca 식이를 할 때에 PO에 의해서 cholesterol, coprostanol, coprostanone의 배설이 모두 유의하게 감소되었으나 high Ca 식이때에는 모두 감소되진 하였지만 유의성이 낮았다.

고 찰

혈장의 지질조성은 식이지방을 구성하고 있는 지방산종류에 따라 영향을 받는다는 것은 이미 수없이 발표되었으며²⁴⁻²⁷, 또한 식이에 첨가된 Ca과 혈장과 간조직의 지질함량과의 상관관계를 밝힌 보고가 있었다²⁸⁻³¹. Fleischman 등⁵⁶ 보고에 의하면 쥐에서 atherogenic한 diet에 Ca을 첨가하였을 때 혈청 cholesterol이 35% 감소되었고, 토끼에게 저지방 식이에 Ca의 수준을 0.02, 0.8, 1.6%로 다양하게 첨가하여 12주동안 사육하였을 때 Ca 결핍군에서는 혈장 cholesterol과 PL 수준이 유의적으로 상승되었다³². 또한 4주된 양에게 콩기름과 쇠기름을 20주동안 공급하면서 Ca을 0.4% 수준으로 첨가하였을 때 Ca 무첨가군에 비해 혈장 cholesterol과 lipoprotein cholesterol의 농도는 지방종류와 Ca 함량에 의해 영향을 받지 않았으며 간조직의 cholesterol 함량은 오히려 증가하였다⁷. 돼지에게 19%(w/w) 고지방식이에 Ca함량을 1일 권장량의

1배, 3배로 차등해서 6주동안 공급하였을 때 혈장 cholesterol과 lipoprotein cholesterol의 농도에는 영향이 없었다³³. 본 연구에서는 Fig. 1에서 식이의 Ca 함량을 0.3%에서 1.0%로 증가시켰을 때 혈장의 cholesterol 함량이 유의하게 감소되지 않았으며, 식이의 Ca 함량과는 상관없이 옥수수유에 비해 들기름을 먹었을 때 혈장 cholesterol 농도가 유의하게 더 낮았다. 이와 같이 식이의 Ca 함량이 혈장이나 간조직의 지질 농도에 미치는 영향은 일관성이 없었으며 같이 먹인 지방종류에 따라서 다르게 반응하였을 가능성이 있었다.

한편, 혈중 cholesterol 농도는 포화지방산이 높게 함유된 쇠기름, lard, butter fat 같은 지방에 의해서는 혈장 cholesterol 농도가 상승되었으며 n-3계 또는 n-6계 불포화지방산 함량이 높은 어유나 들기름, 옥수수유에 의해서는 cholesterol 농도가 저하되었다²⁴⁻²⁷. 본 연구에서도 Fig. 1에서 다시 살펴보면 n-6계 LA가 높은 옥수수유에 비해 n-3계 α -LNA가 높은 들기름에 의해서 더욱 혈장 cholesterol 농도가 유의하게 낮았다. Salem 등³⁴의 연구에 의하면 세포막을 구성하는 인지질중 C22:6의 함량이 높을수록 막의 유동성이 증가한다. 식이지방의 종류에 의해 막의 지질성분이 영향을 받으며 또한 변화되면 막의 유동성도 변한다고 했다. Giron 등³⁵에 의하면 olive oil에 비해서 n-6계 지방산이 더 높은 sunflower oil을 개에게 공급한 결과 chol/PL이 높아져서 막의 유동성이 저하되는 것을 관찰했다. 반면, Wahnou³⁶등의 연구에서는 식이 형태에 의한 막유동성의 차이를 관찰할 수는 없었다. 그러나 본 연구에서는 Fig. 2에서 식이지방이 간세포막의 유동성에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 cholesterol과

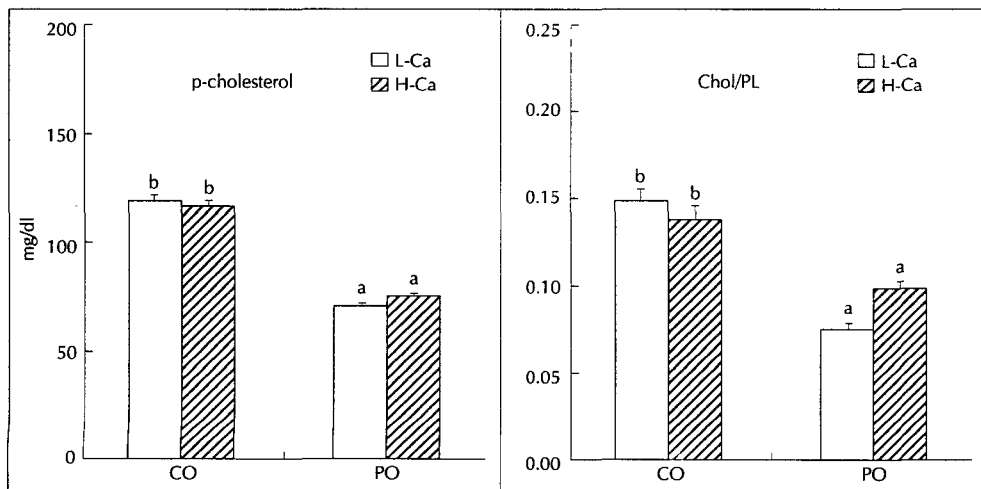


Fig. 1. Effect of dietary Ca levels on plasma cholesterol and the ratio Chol/PL in DMH-treated rats. Bars with different alphabet were significantly different at $p < 0.05$. L-Ca : low Ca, H-Ca : high Ca

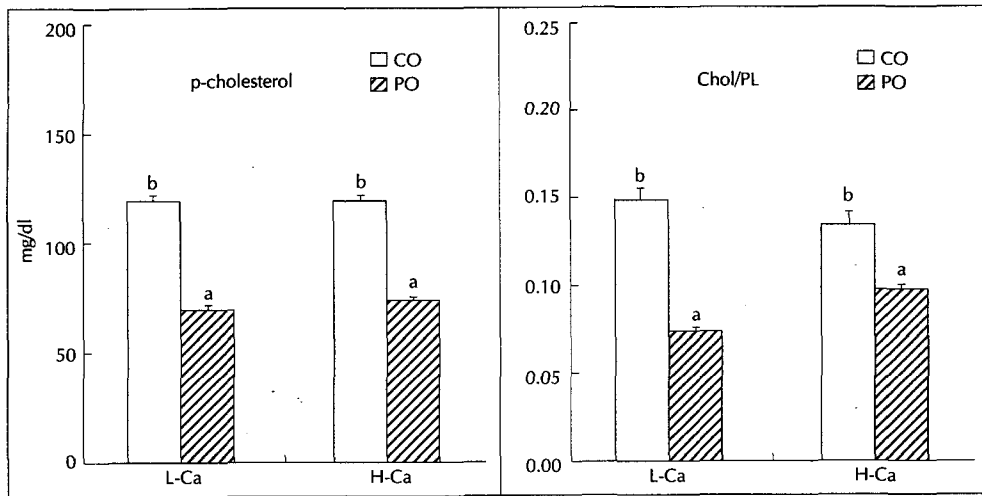


Fig. 2. Effect of dietary oils on plasma cholesterol and the ratio Chol/PL in DMH treated rats. Bars with different alphabet were significantly different at $p < 0.05$. L-Ca : low Ca, H-Ca : high Ca

PL 함량을 측정하고 그 비율을 살펴본 결과 PO에 의해서 chol/PL 비율이 유의적으로 더 낮았다. Lim & Park의 보고¹⁵⁾와 Grundy & Ahrens의 보고³⁷⁾에서도 n-6계 지방산이 높은 식이를 한 경우 간조직의 cholesterol 함량이 유의적으로 높았다고 하였으며 본 연구의 결과와 일치하였다. 이 보고³⁸⁾³⁹⁾에 의하면 식이중의 n-6계 LA에 의해 간조직의 acyl coA : cholesterol acyltransferase가 증가되면 혈장 cholesterol이 간조직으로 유입되어 esterification이 증가되고 결국 간조직에서 더욱 cholesterol 축적이 일어난다는 것이다.

그러므로 결과적으로 CO를 섭취했을 때는 간 조직내 cholesterol의 함량은 증가하고 인지질 중 C22 : 6의 함량은 적어서 소포체막의 chol/PL 비율이 증가되어 막의 유동성을 감소시켰을 것이며, 이에 따라 VL DL-chol과 LDL-chol의 흡수가 더 약화되었을 것이고 이로 인해서 혈장 cholesterol의 수준이 더 높았을 가능성이 있다고 사려된다. 그러나 CO와 PO 각 지방군에서 Ca함량을 0.3%에서 1.0%로 증가하여도 막유동성에는 유의한 영향을 주지는 않았으며, 이 결과는 혈장 cholesterol 농도에도 유의한 영향을 주지 못한 것과 일관성이 있었다.

간소포체막에 존재하는 HMG-CoA reductase는 cholesterol 합성을 조절하는 rate-limiting enzyme으로서 사람에게서 혈장 cholesterol의 농도를 일정하게 유지하는데 중요한 역할을 한다⁴⁰⁾⁴¹⁾. 본 연구에서는 식이지방의 종류와 Ca함량 증가 여부에 따라 cholesterol 합성과의 관계를 규명해보고자 하였으나 식이의 Ca함량이나 들기름의 α -LNA에 의해서 유의적인 영

향을 받지는 않았다. 또한 혈장의 cholesterol 수준은 간조직에서 합성되는 cholesterol 뿐만 아니라 간조직에서 cholesterol이 cholesterol 7 α -hydroxylase에 의해 1차 bile acid인 cholic acid나 chenodeoxycholic acid로 얼마나 전환되는지 그 정도에 따라 영향을 받는다⁴²⁾⁴³⁾.

본 연구에서는 cholesterol을 분해하는 효소를 직접 측정하지는 못했어도 변으로 배설되는 bile acid 함량을 측정한 결과 변 단위 무게당(g) total bile acid 배설량은 high Ca 식이일 때 두 군 모두 감소하였다. 이러한 결과로 보아 비록 high Ca 식이로 혈중 지질수준을 낮추지는 못하였으나 고지방식으로 증가된 bile acid의 배설을 감소시켜 대장암을 억제하는데는 효과적일 것으로 사려된다. 한편, 변으로 배설된 neutral sterol 함량은 지방종류에 상관없이 high Ca 식이를 하였을 때 더 많은 neutral sterol이 배설되었으며 특히 CO를 먹었을 경우에 유의하게 더 높았다. 식이중 다량 함유된 Ca때문에 biliary cholesterol의 흡수가 방해받아 변으로 더욱 배설되어 박테리아에 의해 분해되었기 때문에 총 neutral sterol 배설량이 더 높았을 것이라고 사려된다. 실제로 간조직에 남아있는 cholesterol 함량은 high Ca 식이에서 더 적은량이 존재하였다. 그러나 식이의 high Ca 때문에 간조직에서 cholesterol 합성을 증진시켜야 할 정도로 영향을 미치지 않았으며 이에 따라 혈장 cholesterol 농도에도 영향을 미치지 않는다고 본다.

본 연구에서 혈장의 TG 농도는 Ca 증가에 의해서 영향을 받지 않았으며, PO에 의해서 낮아지긴 하였으

나 유의한 차이는 아니었다. 다른 보고에서도^{32/33)} Ca 수준과 혈장 TG 농도에 대해서 더욱 일관성있는 결과를 얻지 못하였다. Grundy⁴⁴⁾의 보고에 의하면 포화지방산은 혈장 TG 농도에 크게 영향을 미치지 않았으며, n-6계 지방산은 일관성이 없었으나 n-3계 지방산은 다량 섭취시 유의하게 혈장 TG 농도를 감소시켰다. 이미 보고된 바⁴⁵⁾에 의하면 n-3계 지방산은 간에서 TG 합성을 감소시키고 VLDL-TG 분비를 저해하기 때문이라고 하였다. 어유의 n-3 지방산보다는 TG를 감소시키는 힘이 약하지만⁴⁶⁾ PO의 n-3 지방산도 이와같은 효과를 보일 것으로 간주하였으나 생각보다는 약하였으며 CO와 비슷하였다.

식이의 Ca 함량이 간조직에서 cholesterol 합성과 간소포체막의 유동성에는 영향을 미치지 못하였으며 혈장의 cholesterol 농도를 낮추지는 못하였어도 변으로 더 많은 neutral sterol을 배설하였으며, 장내에 존재하는 1차 bile acid는 bacteria에 의해 2차 bile acid인 deoxycholic acid나 lithocholic acid로 더욱 전환되었다. 보고된 바^{47/48)}에 의하면 2차 bile acid는 대장암을 직접적으로 유도하지는 않으나 대장의 암화과정을 촉진하는 인자로 알려져왔다. 저지방식이에 비해 고지방식이를 하였을 때 대장내 박테리아에 의해 deoxycholic acid와 lithocholic acid와 같은 독성이 있는 2차 bile acid의 배설이 증가되며⁴⁹⁻⁵¹⁾ 더욱 대장세포의 증식을 자극해서 tumorigenesis를 촉진하였다¹⁹⁾. 본 연구에서는 Fig. 3에서 다시 살펴보면 식이의 Ca함량을

1.0%로 증가시켰을 때 지방종류와 상관없이 모두 deoxycholic acid와 lithocholic acid의 배설을 유의하게 감소시켰다. 이와같은 결과로 미루어 보면 식이중 Ca 함량을 증가시켰을 때 혈장의 지질을 감소시키지는 못하였어도 대장암 발생을 억제시킬 수 있도록 위험인자를 감소시킬 수 있는 결과를 얻었다. 이 때 Ca이온은 장내에서 1차 bile acid와 결합해서 불용성인 Ca-soap을 형성하므로서 bacteria에 의한 전환이 적어서 2차 bile acid의 배설이 낮아진 것으로 사려된다. 실제로 보고된 역학조사⁵²⁾에 의하면 ovo-lacto vegetarian인 제 7일 안식교인들은 지방 섭취량도 낮았지만 Ca 섭취량이 높아 대장암의 발생율이 낮았다고 하였다.

요약 및 제언

본 연구는 쥐에서 식이의 Ca함량을 증가시켰을 때 같이 섭취하는 지방종류에 따라 혈장 cholesterol 수준에는 어떤 영향을 미치며, 이때 간조직에서 소포체막의 유동성과 cholesterol 합성에 관여하는 HMG CoA reductase 효소의 활성화도, 그리고 cholesterol이 분해되어 배설되는 변의 bile acid 조성에는 어떤 영향을 주는지 관찰하였다. 실험식은 모든 영양소의 구성은 같게 하였으나 식이의 지방종류를 2가지, 즉 n-6계 지방산이 높은 옥수수유와 n-3계 지방산이 높은 들기름을 각각 15%(w/w) 수준으로 하면서 각 지방마다 Ca함량을 0.3%와 1.0%(w/w)로 조절한 실험식으로 20주동안 사육하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

식이 Ca 함량을 0.3%에서 1.0%로 상승시켰을 때 혈장 cholesterol과 TG 농도에는 유의한 영향을 미치지 않았다. 이때 Ca은 간조직의 소포체막의 유동성과 cholesterol 합성효소인 HMG CoA reductase 활성화도에 유의한 영향을 주지는 않았으나 변으로 더 많은 neutral sterol을 배설시켰고, 2차 bile acid를 배설을 유의하게 감소시켜 대장암을 촉진하는 위험인자를 낮추어 주었다.

그러나 Ca 함량과 상관없이 들기름은 옥수수유에 비해 혈장의 cholesterol 농도를 유의하게 감소시켰으며, 특히 Ca이 0.3%일 때는 들기름은 혈장의 TG 농도를 유의하게 더 낮추었다. 이때 들기름은 간조직에서 소포체막의 HMG CoA reductase 활성화도에는 유의한 영향을 주지는 않았지만 막유동성을 증진시켜 혈장에서 cholesterol 제거가 더 활발하였을 것이다. 그러나 식이의 Ca과는 다르게 지방은 변으로 1차 bile acid의 배설에는 유의한 영향을 주지는 않았지만 들기름에 의해서 2차 bile acid와 coprostanol의 배설이 유의적으로

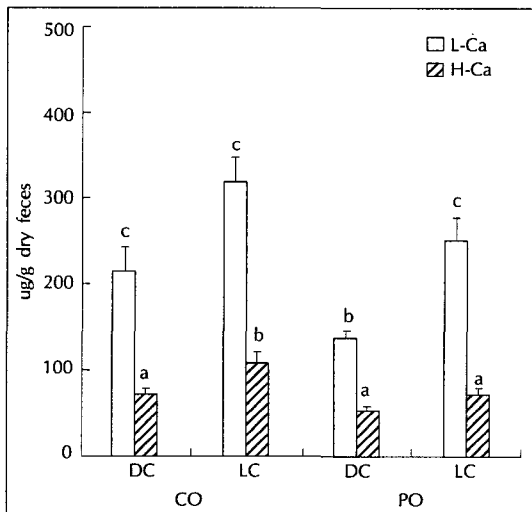


Fig. 3. Effect of dietary oils and Ca levels on secondary bile acids DMH treated rats. Bars with different alphabet were significant different(p<0.05). L-Ca : low Ca, H-Ca : high Ca, DC : deoxycholic acid, LC : lithocholic acid

감소하였다.

결론적으로 식이의 Ca 함량을 증가시켰을 때 혈장의 지질을 낮추지는 않았으나 n-3 α -linolenic acid가 풍부한 들기름은 혈장의 cholesterol을 유의하게 감소시켰다. Ca과 들기름은 모두 변으로 2차 bile acid 배설을 감소시켜 대장암 발생을 예방하는 효과가 있으므로 특히 지방을 많이 섭취하는 경우에는 생선이나 들기름을 더욱 애용하도록 하며 Ca의 함량이 높은 식품을 더욱 섭취할 것을 권장하고자 한다.

Literature cited

- 1) Simopoulos AP. ϵ -3 fatty acids in growth and development and in health and disease. Part I : The role ϵ -3 fatty acids in growth and development. *Nutr Today* 2 : 10-19, 1988
- 2) Simopoulos AP. ϵ -3 fatty acids in growth and development and in health and disease. Part II : The role ϵ -3 fatty acids in health and disease : Dietary implications. *Nutr Today* 3 : 12-18, 1988
- 3) Herold PM, Kinsella J. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease : A comparison of findings from animal and human feeding trials. *Am J Clin Nutr* 43 : 566-598, 1986
- 4) Rifkind BM. Diet, plasma cholesterol and coronary heart disease. *J Nutr* 116 : 1578-1580, 1986
- 5) Fleischman AI, Yagowitz H, Hayton T, Bierenbaum ML. Effects of dietary calcium upon lipid metabolism in mature male rats fed beef tallow. *J Nutr* 66 : 255-260, 1988
- 6) Fleischman AI, Yagowitz H, Hayton T, Bierenbaum ML. Long-term studies on the hypolipemic effect of dietary calcium in mature male rats fed cocoa butter. *J Nutr* 67 : 151-158, 1988
- 7) Diersen-schade DA, Richard MJ, Jacobson NL. Effects of dietary calcium and fat on cholesterol in tissues and feces of young goats. *J Nutr* 114 : 2292-2300, 1984
- 8) Stemmermann GN, Nomura AM, Heilbrun LK. Dietary fat and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 44 : 4633-4637, 1984
- 9) Caroll KK. Dietary fats and cancer. *Am J Clin Nutr* 53 : 1064s-1067s, 1991
- 10) Weisburger JH. Causes, relevant mechanism and prevention of large bowel cancer. *Seminars in Oncol* 18(4) : 316-336, 1991
- 11) Van Der Meer R, Welberg JWM, Kuipers F, Kleibeuker JH, Mulder NH, Termont DSML, Vonk RJ, De Vries HT, and De Vries EGE. Effects of supplemental dietary calcium on the intestinal association of calcium, phosphate, and bile acids. *Gastroenterol* 99 : 1653-1659, 1990
- 12) Sorenson AW, Slattery ML, Ford MH. Calcium and colon cancer : A review. *Nutr Cancer* 11 : 135-145, 1988
- 13) Reddy BS, Wisburger JH, Wynder EL. Effect of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in men. *J Nutr* 105 : 878-884, 1975
- 14) Kim CJ, Park HS. Effect of dietary calcium on cell proliferation and colonic mucosal levels of eicosanoid and 1, 2-diacylglycerol in colon carcinogenesis of rats. *Korean J Nutr* 31(1) : 21-27, 1998
- 15) Lim YS, Park HS. Effect of dietary fats on plasma lipids and the level of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats treated with dimethylhydrazine. Kyung hee Univ. Master thesis, 1992
- 16) McDougal DB, Farmer HS. A fluorometric method for total serum cholesterol. *J Lab and Clin Med* 50 : 485-488, 1987
- 17) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipies from animal tissue. *J Biol Chem* 226 : 497-509, 1957
- 18) Fletcher MJ. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin Chem Acta* 22 : 393-397, 1968
- 19) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911-917, 1959
- 20) Bartlett GR. Phosphorous assay in coloum chromatography. *J Biol Chem* 234 : 466-468, 1959
- 21) Wilce PA, Kroon PA. Lipoprotein analysis a practical approach : Assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A(HMG-CoA reductase). pp203-214, 1991
- 22) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J Biol Chem* 193 : 265, 1951
- 23) Uchida K, Nomura Y, Kadowaki M, Takeuchi N, Yamamura Y. Effect of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid metabolism in rats. *Japan J Pharmacol* 27 : 193-204, 1977
- 24) Kromhout D, Bosscheiter ED, de Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20 year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 312 : 1209-1209, 1985
- 25) Reddy BS, Maruyama H. Effects of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res* 46 : 3367-3370, 1986
- 26) Lee SM, Park HS. Effect of dietary n-3 fatty acids fat unsaturation on plasma lipids and lipoproteins in rats. *Korean J Nutr* 25(7) : 555-568, 1992
- 27) Kinsella JE. Dietary fish oils : Possible effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in reduction of thrombosis and heart disease. *Nutr Today* 6 : 7-15, 1986
- 28) Appleton GVN, Davies PW, Williamson RCN. Inhibition

- of intestinal carcinogenesis by dietary supplementation with calcium. *Br J Surg* 74 : 523-525, 1987
- 29) Sorenson AW, Slattery ML, Ford MH. Calcium and colon cancer. *A Review Nutr Cancer* 11 : 135-145, 1988
 - 30) Appleton GVN, Owen RW, Wheeler EE, Challacombe DN, Williamson RCN. Effect of dietary calcium on the colonic luminal environment. *Gut* 32 : 1374-1377, 1991
 - 31) Lapre JA, DeVries T, Koeman JH, Vander Meer R. The antiproliferative effect of dietary calcium on colonic epithelium is mediated by luminal surfactants and dependent on the type of dietary fat. *Cancer Res* 53 : 784-789, 1993
 - 32) Lacono JM. Effect of varying the dietary level of calcium on plasma and tissue lipids of rabbits. *J Nutr* 104 : 1165-1171, 1974
 - 33) Foley MK, Galloway ST, Luhman CM, Faidley TD, Beitz D. Influence of dietary calcium and cholecalciferol on composition of plasma lipids in young pigs. *J Nutr* 120 : 45-51, 1990
 - 34) Salem N, Kim HY, Yergey JA. Docosahexaenoic acid : Membrane function and metabolism. *Health Effect of Polyunsaturated* 15 : 263-303, 1986
 - 35) Giron MD, Mataix FJ, Suarez MD. Long-term effects of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the lipid composition of erythrocyte membranes in dogs. *Comp Biochem Physiol A* 102(1) : 197-201, 1992
 - 36) Wahnon R, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Nutr* 122(5) : 1077-1084, 1992
 - 37) Grundy SM, Ahrens EH. The effect of unsaturated dietary fats on absorption, excretion, synthesis and distribution of cholesterol in man. *J Clin* 49 : 1135-1152, 1970
 - 38) Nam JH, Park HS. Differential effect of ϵ -6 and ϵ -3 polyunsaturated fatty acid on plasma lipids in rats fed low and high fat diets. *Korean J Nutr* 24(4) : 314-325, 1991
 - 39) Reiber H. Cholesterol-lipid interactions in membranes : the saturation concentration of cholesterol in bilayers of various lipids. *Biochim Biophys Acta* 512 : 72-83, 1978
 - 40) Akira Endo. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 33 : 1569-1582, 1992
 - 41) Govers MJAP, Termont DSML, VanAken, GA, Vander Meer R. Characterization of the adsorption of conjugated and unconjugated bile acids to insoluble, amorphous calcium phosphate. *J Lipid Res* 35 : 741-748, 1994
 - 42) Singhal AK, Finver-Sadowsky J, Mcsherry CK, Mosbach EH. Effect of cholesterol and bile acids on the regulation of cholesterol metabolism in hamster. *Biochim Biophys Acta* 752 : 214-222, 1983
 - 43) Hill MJ, Drasar BS, Aries V, Crowther JS, Hawksworth GB, Williams REO. Bacteria and etiology of cancer of large bowel. *Lancet* 1 : 95-100, 1971
 - 44) Grundy SM. Effects of polyunsaturated fats on lipid metabolism in patients with hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 55 : 269-282, 1975
 - 45) Grundy SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 31 : 1149-1171, 1990
 - 46) Harris WS. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans : a critical review. *J Lipid Res* 30 : 785-807, 1989
 - 47) Bandary S, Reddy BS. Dietary fat and its relationship to large bowel cancer. *Cancer Res* 41 : 3700-3705, 1981
 - 48) Bandary S, Reddy BS. Diet and excretion of bile acids. *Cancer Res* 41 : 3766-3768, 1981
 - 49) Chang WC, Lupton JR, Frolich W, Schoeffler GL, Peterson ML, Chen XQ. A very low intake of fat is required to decrease fecal bile acid concentrations in rats. *J Nutr* 124 : 181-187, 1994
 - 50) Galloway DJ, Owen RW, Jarett F, Boyle P, Hill MJ, George WD. Experimental colorectal cancer : The relationship of diet and faecal bile acid concentration to tumor induction. *Br J Surg* 73 : 233-237, 1986
 - 51) Gregoire RC, Stern HS, Yeung KS, Standler J, Langley S, Furrer R, Bruce WR. Effect of calcium supplementation on mucosal cell proliferation in high risk patients for colon cancer. *Gut* 30 : 376-382, 1989
 - 52) Lipkin M, Newmark H. Effect of added dietary calcium on colonic epithelial cell proliferation in subjects at high risk for familial colonic cancer. *N Engl J Med* 313 : 1381-1384, 1985