

간세포 배양에서 Linoleic Acid와 혈청알부민의 첨가가 지질대사에 미치는 영향

차재영·조영수*

동아대학교 생명자원과학부

초 록 : 사람 간세포 유래의 배양 세포인 HepG2 세포의 지질 합성과 분비에 미치는 linoleic acid(LA, 18:2 n-6) 및 우혈청알부민 (bovine serum albumin: BSA) 첨가 농도의 영향에 대하여 검토하였다. 간세포는 DMEM배지(기본 배지)에 0.2 mM LA를 첨가한 배지 및 LA와 BSA(0.2-1.0%)를 첨가한 배지(LA+BSA 배지)에서 배양하였다. 각 지질의 동위원소 표적에는 [¹⁴C]acetate를 이용하여 6시간 배양후의 지질합성과 분비를 측정하였다. 그 결과, 기본 배지중에 LA의 첨가는 콜레스테롤의 [¹⁴C]acetate 표적량을 저하시켰다. 한편, LA배지에 BSA의 첨가에 의해, 총 콜레스테롤의 [¹⁴C]acetate 표적량은 증가하는 경향을 나타내었다. LA+BSA 배지에서 간세포의 총 콜레스테롤 변동은 유리형 콜레스테롤에의 표적량 증가에 기인하는 것으로 나타났다. LA 배지에 BSA를 첨가 하였을때 콜레스테롤 분비가 증가 하였는데, 이는 지질의 분비과정에 BSA가 관여하는 것을 시사하는 것이다. 간세포내 총 지질에의 [¹⁴C]acetate 표적량은 각 군간의 유의차는 인정되지 않았다. 그러나, LA 배지에의 BSA 첨가는 [¹⁴C]표식 지방산의 중성지질 확보에의 표적량은 증가하고, 인지질 확보에 표적량은 감소하여, 양지질의 합성에는 상반되는 결과를 나타내었다. [¹⁴C]acetate 표적 중성지질, 인지질 및 유리지방산의 분비는 LA 배지에 비교해 LA+BSA 배지에서 현저하게 증가하였다. 이상의 결과에서, 사람 간배양 세포에서 LA와 BSA는 각각 지질대사에 다른 영향을 미치고, BSA 농도는 리포단백질 분비에 영향을 미치는 것으로 시사된다. (1999년 4월 21일 접수, 1999년 6월 24일 수리)

서 론

간장의 지질대사는 지질, 당, 아미노산 및 각종 호르몬 등의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 최근에는 지질의 총 섭취량 뿐만 아니라 단일 지방산의 섭취량도 지질대사에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 지방산 형태에 따른 지질 대사변화의 관심이 높아지고 있다.¹⁾ 일반적으로 포화지방산은 혈청 콜레스테롤 농도를 높이고, 불포화지방산은 이를 저하시키는 것으로 보고되어 있다.^{2,3)} 다불포화지방산 가운데 리놀레익산(linoleic acid: LA, 18:2)는 n-6 계열 지방산의 선구물질로 생체내의 필수지방산으로서 생체막의 구성성분 또는 생체막 기능의 유지에 있어서 중요한 역할을 하고 있다.⁴⁾ LA는 콜레스테롤 저하작용을 나타내고,^{5,7)} 리포단백질의 합성과 분비⁸⁾에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한, 마아가린 등의 식품제조시 천연의 LA는 수소첨가에 의해 기하이성체인 트랜스산 등이 만들어지며, 이들 지방산들도 생체내에서 뿐만 아니라 간배양세포 HepG2 에서도 지질대사에 영향을 크게 미치는 것으로 보고된 바 있다.^{9,10)} 한편, 혈청알부민은 혈중의 유리지방산과 복합체를 형성하여 각 조직에 운반하는 역할을 한다.¹¹⁾ 지금까지의 연구 결과에 의하면 세포배양의 배지에 우혈청 알부민을 첨가함으로써 리포단백질의 분비가 촉진되는데, 이는 지질합성의 변화에 의한 가능성이 시사되어져 있다.⁵⁾ 그러나, LA를 충분히 첨가한 조건에서 알부민 농도의 변화에 의한 간세포의 지

질합성과 분비의 영향에 대해서는 충분히 밝혀져 있지않다. 따라서, 본실험에서는 HepG2 세포를 이용하여 배지에 첨가된 0.2 mM LA 및 BSA의 농도 변화가 콜레스테롤과 중성지질 대사에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

사람 간세포 유래의 배양세포인 HepG2 세포는 Wister 연구소로부터 제공받았다. LA와 우혈청 알부민(Bovine serum albumin: BSA)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS) 및 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 Gibco(Grand Island, New York)로부터, penicillin-G 및 streptomycin은 Meiji Seiyaku(Tokyo, Japan)으로부터 구입하였다. [¹⁴C]acetate 및 scintillation cocktail(Sintisol Ex-H) 용액은 각각 Amersham International(Amersham, England) 및 Toijin Chemical Co.(Kumamoto, Japan)로부터 구입하였다.

세포배양

HepG2 세포를 10% FBS, 0.1 mg/ml penicillin-G, 0.01 mg/ml streptomycin을 함유한 DMEM(기본배지) 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂, 95% 공기의 조건하에서 10 cm Falcon dish로 실험에 제공될 세포수가 되기까지 약 1주일간 배양하였으며, 이때 배지는 2~3일에 한번씩 교환 하였다.^{12,13)} 실험 개시전 세포를 배양기에 2×10⁵개씩 접종하여 세포성장이 배양

찾는말 : 리놀레익산 (18:2, n-6), 알부민, HepG2 세포, 콜레스테롤, 트리아실글리세롤

*연락처

기 표면의 70~80% 정도 되었을 때 DMEM 배양액으로 세포를 2회 씻어준 다음 실험배지를 첨가하여 실험을 개시하였다. 실험배지의 교환과 동시에 방사성 동위원소를 포함한 지질 혼합물 전구체로서 [¹⁴C]acetate를 1.23 kBq(0.3 μCi)을 첨가하여 6시간 배양하였다.

실험배지의 조제

실험용 배지는 0.2 mM 농도의 LA를 취한다음 질소가스로 건조시키고, 0.2-1.0% BSA를 함유한 용액을 초음파 발생기(Sonifier 250, Branson)을 이용하여 15분간 초음파 처리하여 LA-BSA복합체(LA+BSA배지)를 만들었다. 이를 0.45 μm 필터(Millex-HD, Millipore Co.)를 이용하여 여과멸균시켜 지방산과 알부민을 함유한 실험배지를 조제하였다. 또한, LA만을 함유한 배지(LA배지)와 LA와 BSA를 함유하지 않은 배지도 조제하였다.

세포 및 배지중의 지질추출, 분획 및 방사능 활성측정

HepG2 세포를 각 배지 중에서 6시간 배양한 후 세포 및 배양액을 각각 회수하여 지질분석에 이용하였다. 회수한 세포 및 배지의 총 지질은 Bligh & Dyer의 방법으로 추출 순화하고,¹⁴⁾ 박층크로마토그래피법(TLC)으로 각 지질획분을 분획하였다.¹⁵⁾ 방사능 활성은 TLC법으로 분획된 각 지질획분에 scintillation용액을 가한다음 scintillation counter(WALLAC 1410, Phar-

macia, Sweden)에서 측정하였다.

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리 하였다.¹⁶⁾

결 과

세포내 콜레스테롤 생합성

배지중에 LA와 BSA를 함유하지 않은 기본배지와 비교하여 0.2 mM LA 만을 함유한 LA배지에서 총 콜레스테롤중의 동위원소 표적량은 현저하게 감소하여, LA가 콜레스테롤의 de novo 생합성을 저해시키는 것으로 나타났다(Table 1). 한편, LA와 BSA를 동시첨가한 배지에서는 LA단독 배지에 비교하여 총 콜레스테롤중의 동위원소 표적량은 증가하는 경향을 나타내었으나, BSA 첨가농도에 의한 영향은 유의성이 없었다($p < 0.05$). 유리형 콜레스테롤의 [¹⁴C]acetate의 표적량은 기본배지에 비교해서 LA단독 배지에서 유의적으로 저하(56%)하였다. 한편, LA단독 배지에 비해 0.6% BSA 배지를 제외한 LA+BSA 배지에서는 유리형 콜레스테롤중의 표적량이 BSA 첨가에 의하여 유의적으로 증가하였다. 기본배지와 LA단독배지사이의 에스테르형 콜레스테롤의 [¹⁴C]acetate의 표적량에는 현저한 차이가 없었으나, LA+BSA 배지에서는 에스테르형 콜

Table 1. Effects of linoleic acid and bovine serum albumin on the incorporation of [¹⁴C] acetate into total cholesterol, free cholesterol, and cholesteryl ester in HepG2 cells

	Total cholesterol	Free cholesterol	Cholesteryl ester
		[¹⁴ C] dpm × 10 ⁻² / dish	
Basal	36.84 ± 4.92 ^a	29.60 ± 4.05 ^a	7.24 ± 0.87 ^a
LA	23.41 ± 1.03 ^b	16.57 ± 0.48 ^b	6.84 ± 0.55 ^a
LA+0.2% BSA	30.56 ± 0.30 ^{ab}	27.10 ± 0.17 ^a	3.55 ± 0.13 ^b
LA+0.4% BSA	29.18 ± 1.03 ^{ab}	26.38 ± 0.81 ^a	2.80 ± 0.22 ^b
LA+0.6% BSA	25.62 ± 1.41 ^b	22.90 ± 1.09 ^{ab}	2.72 ± 0.32 ^b
LA+0.8% BSA	28.41 ± 2.24 ^{ab}	25.38 ± 2.07 ^a	3.03 ± 0.17 ^b
LA+1.0% BSA	39.66 ± 3.59 ^a	36.56 ± 3.31 ^c	3.08 ± 0.28 ^b

HepG2 cells were incubated in DMEM without FCS and with 0.2-1.0% BSA, 0.2 mM linoleate and 0.3 μCi [¹⁴C]acetate for 6 hrs. Values are the mean ± SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. LA ; linoleic acid, BSA ; bovine serum albumin.

Table 2. Effects of linoleic acid and bovine serum albumin on the secretion of [¹⁴C] in total cholesterol, free cholesterol, and cholesteryl ester from HepG2 cells

	Total cholesterol	Free cholesterol	Cholesteryl ester
		[¹⁴ C] dpm × 10 ⁻² / dish	
Basal	1.32 ± 0.07 ^a	1.04 ± 0.04 ^a	0.86 ± 0.03 ^a
LA	1.13 ± 0.04 ^a	0.62 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.03 ^c
LA+0.2% BSA	2.23 ± 0.21 ^b	1.89 ± 0.19 ^b	0.34 ± 0.02 ^b
LA+0.4% BSA	2.28 ± 0.25 ^b	2.03 ± 0.24 ^b	0.25 ± 0.01 ^b
LA+0.6% BSA	2.46 ± 0.12 ^b	2.13 ± 0.09 ^b	0.33 ± 0.03 ^b
LA+0.8% BSA	2.55 ± 0.19 ^b	2.22 ± 0.13 ^b	0.33 ± 0.06 ^b
LA+1.0% BSA	2.74 ± 0.26 ^b	2.36 ± 0.16 ^b	0.38 ± 0.07 ^b

HepG2 cells were incubated in DMEM without FCS and with 0.2-1.0% BSA, 0.2 mM linoleate and 0.3 μCi [¹⁴C]acetate for 6 hrs. Values are the mean ± SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. LA ; linoleic acid, BSA ; bovine serum albumin.

Table 3. Effects of linoleic acid and bovine serum albumin on the incorporation of [¹⁴C] acetate into total lipids, triglyceride, and phospholipid in HepG2 cells

	Total lipids	Triglyceride	Phospholipid
		[¹⁴ C] dpm × 10 ⁻³ / dish	
Basal	75.26 ± 8.51 ^a	28.08 ± 1.31 ^a	48.48 ± 3.10 ^a
LA	66.72 ± 6.13 ^a	20.12 ± 1.56 ^b	43.18 ± 2.54 ^a
LA+0.2% BSA	66.53 ± 3.74 ^a	33.20 ± 1.78 ^{ac}	30.32 ± 1.98 ^{bc}
LA+0.4% BSA	59.04 ± 6.89 ^a	33.29 ± 2.15 ^{ac}	26.94 ± 1.82 ^{bc}
LA+0.6% BSA	59.90 ± 1.45 ^a	31.92 ± 0.58 ^a	25.42 ± 0.73 ^{bc}
LA+0.8% BSA	71.85 ± 9.75 ^a	33.08 ± 1.71 ^{ac}	24.37 ± 1.97 ^b
LA+1.0% BSA	73.47 ± 4.44 ^a	37.96 ± 1.98 ^c	31.54 ± 2.10 ^c

HepG2 cells were incubated in DMEM without FCS and with 0.2-1.0% BSA, 0.2 mM linoleate and 0.3 μCi [¹⁴C]acetate for 6 hrs. Values are the mean ± SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at p < 0.05. LA ; linoleic acid, BSA ; bovine serum albumin.

레스테롤의 표적량이 현저하게 저하하여 에스테르형 콜레스테롤 생성의 억제를 시사하였다.

배지중에 분비된 [¹⁴C] 콜레스테롤량

기본배지와 비교하여 LA배지에서 [¹⁴C] 총 콜레스테롤의 분비량은 저하경향을 나타내었다(Table 2). 그러나, LA+BSA 배지에서는 [¹⁴C] 총 콜레스테롤의 분비량은 BSA 첨가에 의해 현저하게 증가하였다. 각 확분중예의 영향을 살펴보면, 기본배지에 비교하여 LA배지 에서는 [¹⁴C] 유리형 콜레스테롤의 분비량은 저하경향을 나타내고, LA배지중에 BSA 첨가에 의해 현저하게 증가하였다. 이때 [¹⁴C] 유리형 콜레스테롤의 분비는 BSA농도에 의존적으로 증가하는 경향이였다. 기본배지에 비교하여 LA 배지에서 [¹⁴C] 에스테르형 콜레스테롤의 분비량은 유의적으로 낮았고, LA+BSA 배지에서 [¹⁴C] 에스테르형 콜레스테롤의 분비는 기본배지와 LA단독 배지보다 훨씬 낮았다 (p < 0.05).

중성지질 및 인지질중의 [¹⁴C] 지방산 표적량과 분비량

세포내 중성지질 및 인지질중의 [¹⁴C] 지방산 표적량은 기본

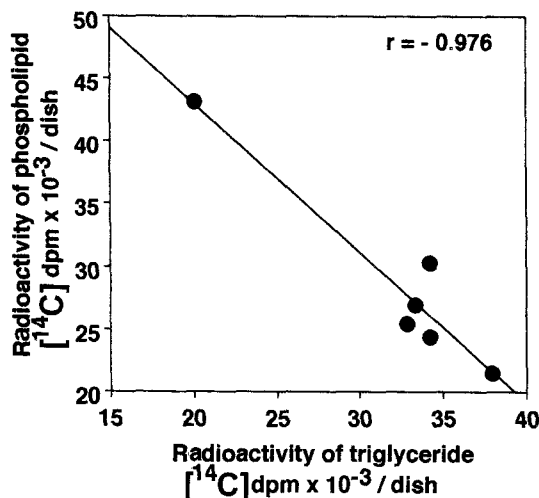


Fig. 1. Negative correlation between triglyceride and phospholipid radioactivity in HepG2 cells.

Table 4. Effects of linoleic acid and bovine serum albumin on the secretion of [¹⁴C] into triglyceride and phospholipid from HepG2 cells

	Triglyceride	Phospholipid
	[¹⁴ C] dpm × 10 ⁻² / dish	
Basal	12.77 ± 0.35 ^a	0.73 ± 0.13 ^a
LA	12.54 ± 0.52 ^a	0.74 ± 0.12 ^a
LA+0.2% BSA	29.23 ± 0.22 ^b	5.37 ± 0.46 ^b
LA+0.4% BSA	28.22 ± 0.96 ^b	6.05 ± 0.25 ^b
LA+0.6% BSA	35.66 ± 0.54 ^c	5.01 ± 0.55 ^b
LA+0.8% BSA	34.05 ± 0.89 ^c	5.31 ± 0.36 ^b
LA+1.0% BSA	35.24 ± 1.83 ^c	5.46 ± 0.49 ^b

HepG2 cells were incubated in DMEM without FCS and with 0.2-1.0% BSA, 0.2 mM linoleate and 0.3 μCi [¹⁴C]acetate for 6 hrs. Values are the mean ± SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at p < 0.05. LA ; linoleic acid, BSA ; bovine serum albumin.

배지에 비교하여 LA배지에서 저하 경향을 나타내었다(Table 3). 그러나, LA배지와 비교하여 LA+BSA 배지에서 중성지질 중의 [¹⁴C] 지방산 표적량은 증가한 반면, 인지질중의 표적량은 저하 되었다. LA배지에 BSA 첨가에 의한 중성지질과 인지질중의 [¹⁴C] 지방산의 표적량 사이에는 역상관계(r = -0.976)가 인정되었다(Fig. 1). [¹⁴C] 중성지질의 분비량에는 기본배지와 LA배지 사이에는 유의적인 차이가 없었다(Table 4). 그러나, LA배지에 비교한 경우 LA+BSA 배지에서 [¹⁴C] 중성지질 분비량이 BSA 첨가에 의해 현저하게 증가하였으며, 특히 BSA 농도가 0.6% 이상 첨가된 배지에서 더욱 높게 증가되었다. [¹⁴C] 인지질의 분비량도 LA 첨가에 의한 영향은 없었으나, LA+BSA 배지에서 현저하게 증가하였다. [¹⁴C] 인지질의 분비량에는 BSA 농도에 따른 변화는 관찰되지 않았다(Table 4).

[¹⁴C] 유리지방산의 합성 및 분비

세포내 [¹⁴C] 유리지방산 량은 LA배지에 비교하여 LA+BSA 배지에서 현저하게 저하하였으나, BSA 농도에 의한 영향은 없었다(Table 5). [¹⁴C] 유리지방산의 분비량은 LA 첨가에 의한 영향은 없었으나, LA+BSA 배지에서는 BSA 농도의 증가와 함께 높게 증가하였다. 이러한 결과는 BSA가 리포단백질외에

Table 5. Effects of linoleic acid and bovine serum albumin on the incorporation of [¹⁴C]acetate into free fatty acid and the secretion of [¹⁴C] labeled free fatty acid from HepG2 cells

	Incorporation	Secretion
	[¹⁴ C] dpm × 10 ⁻² / dish	
Basal	18.98 ± 1.27 ^a	0.11 ± 0.02 ^a
LA	15.85 ± 0.61 ^b	0.10 ± 0.01 ^a
LA + 0.2% BSA	6.68 ± 0.33 ^{cd}	3.83 ± 0.13 ^b
LA + 0.4% BSA	5.08 ± 0.42 ^c	4.35 ± 0.55 ^b
LA + 0.6% BSA	6.05 ± 0.64 ^{cd}	6.29 ± 0.50 ^c
LA + 0.8% BSA	6.10 ± 0.41 ^{cd}	8.06 ± 0.45 ^d
LA + 1.0% BSA	7.38 ± 0.53 ^d	9.14 ± 0.78 ^d

HepG2 cells were incubated in DMEM without FCS and with 0.2-1.0% BSA, 0.2 mM linoleate and 0.3 μCi [¹⁴C]acetate for 6 hrs. Values are the mean ± SE of 5 samples. Values in the same column not sharing superscript letter are significantly different at p < 0.05. LA ; linoleic acid, BSA ; bovine serum albumin.

유리지방산 분비에도 크게 영향을 미치는 것으로 시사되었다.

고 찰

사람과 동물에서 LA의 섭취가 혈청 콜레스테롤 저하작용을 나타내는 것으로 알려져 있으나,^{3,7-9)} 간세포 지질 대사에 LA가 직접 영향을 미치는지에 대해서는 명백하게 밝혀져 있지 않다. 또한, BSA가 지질대사에 미치는 영향에 대해서도 아직 불명확하다. 본 실험에서는, 배지중에 0.2 mM LA 및 서로 다른 농도의 BSA 첨가가 사람 간배양 세포인 HepG2 세포의 지질 대사에 어느정도 영향을 미치는지를 검토하였다. 세포배양은 기본배지로서 DMEM배지를 이용하고, 기본배지에 LA를 첨가한 LA배지, LA와 BSA의 첨가농도를 달리하여 동시에 첨가한 LA+BSA 배지를 이용하였다. 콜레스테롤 대사에 미치는 영향을 검토한 결과, 기본배지에 비교하여 LA배지에서 세포내 총 콜레스테롤중 [¹⁴C]acetate의 표적량이 크게 감소하여 콜레스테롤 *de novo* 생합성의 억제가 시사되었고, 배지중의 [¹⁴C] 콜레스테롤 분비도 감소하였다. 지금까지 LA는 HepG2 세포로부터 콜레스테롤 분비를 저하시키는 결과^{4,5)}와 영향을 미치지 않는다고 하는 상반된 결과¹⁷⁾가 보고되어 있으나, 본실험의 결과는 전자를 지지하여 LA가 간세포의 콜레스테롤 대사에 관여하는 것을 보여주고 있다.

생체내의 콜레스테롤은 유리형과 에스테르형으로 존재한다. 간세포내의 총 콜레스테롤 저하가 세포내 콜레스테롤 합성 저하에 있어서 어느형태에 기인 하는지를 검토한 결과, LA첨가에 의한 콜레스테롤 합성의 저하는 유리형 콜레스테롤중의 [¹⁴C]acetate 표적량 저하에 기인하는 것으로 나타났다. 다음으로 LA와 BSA를 동시에 첨가했을 경우 콜레스테롤 합성과 분비에의 영향을 검토하였다. LA배지에 비교하여 LA+BSA 배지에서는 0.6% BSA 첨가를 제외하고는 대체로 BSA의 농도 증가에 동반하여 세포중의 콜레스테롤 합성은 증가경향을 나타내었고, 이것은 유리형 콜레스테롤의 합성 증가에 기인하였다. 한편, LA+BSA 배지에서 에스테르형 콜레스테롤 합성량은 BSA 첨가에 의해 억제되는 것으로 시사되었다. LA+BSA 배

지에 있어서 콜레스테롤의 분비 증가는 주로 유리형 콜레스테롤 분비의 증가에 기인하고 있으며, 이는 유리형 콜레스테롤 합성의 증가를 반영하는 것으로 생각되어진다. LA+BSA 배지에서 에스테르형 콜레스테롤의 분비량은 낮은 수치를 나타내었으나, 합성량에 대한 분비 비율은 오히려 증가를 보여주었다. 이상의 결과에서, HepG2 세포에서 LA는 유리형 콜레스테롤 합성을 억제시키고, BSA는 에스테르형 콜레스테롤 합성을 억제시키는 작용을 가진 것으로 시사되어, Yanagita등¹⁸⁾ 및 Cianflone등⁴⁾의 보고와 일치하고 있다. LA와 BSA가 간세포내의 콜레스테롤 대사에 다른 영향을 나타내는 기작으로서 LA가 콜레스테롤 합성의 조절효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase(HMG CoA 환원효소)에 영향을 미치고, BSA는 유리형 콜레스테롤로부터 에스테르형 콜레스테롤을 합성하는 acyl CoA : cholesterol acyltransferase(ACAT) 활성에 영향을 미칠수 있는 가능성을 생각해 볼수 있다.

외인성 지방산은 일반적으로 지방산 합성의 조절효소인 acetyl-CoA carboxylase를 저해 하므로서 지방산의 생합성을 억제시키는 것으로 생각되고 있으나, 본실험에서의 LA의 첨가에 의한 효과는 그다지 현저하지 못하였다. 그러나, 새로 생합성된 지방산의 중성지질 합성에의 이용은 LA첨가에 의해 감소를 보여 주고 있는데, 이것은 배지중에 첨가된 LA가 직접 중성지질 합성의 기질로의 이용이 감소됨을 시사한다. 사실, HepG2 세포계에서도 LA첨가는 [³H] glycerol 또 [¹⁴C] LA로부터의 중성지질 생합성을 촉진시키는 것으로 보고되어 있으며,^{18,19)} 쥐 간장 관류실험계,²⁰⁾ 및 쥐의 생체내 실험계^{21,22)} 내에서도 첨가한 LA는 중성지질 획득에 많이 표적되는 것으로 보고 된바 있다. LA배지와 비교했을 경우 LA+BSA 배지에서 BSA 첨가에 의해 [¹⁴C] 지방산의 중성지질 획득중의 표적량은 높고, 인지질 획득에의 표적량은 저하를 보여, 양자간의 사이에 역상관계가 인정되었다. 즉, 사람 간세포에서는 BSA가 중성지질 합성을 증가시키고, 인지질 합성을 억제시키는 것으로 상반된 영향을 보여준다. 이러한 작용 기작은 명확하게 밝혀져 있지 않지만, BSA가 인지질 합성의 조절효소인 CTP : phosphocholine cytidyltransferase 활성을 저해 시키므로서, 인지질 합성이 억제 되어 글리세롤 지질의 전구체인 디아실글리세롤이 증가하여 중성지질 합성에 이용되어지는 가능성을 생각할수 있다. 앞으로 BSA가 중성지질 합성계 효소 diacylglycerol acyltransferase 활성에 미치는 영향에 대해서 검토가 있어야 할 것으로 사료된다. 또한, 탄소수가 18개로 이중결합이 하나인 oleic acid는 HepG2 세포에서 중성지질 합성과 분비를 촉진시키는 것으로 보고 된바 있다.^{23,24)} 본실험에서는 기본배지에 LA의 첨가에 의해 [¹⁴C] 중성지질 및 인지질의 분비량에는 차이가 없는 것으로 나타나 지방산의 이중결합 위치와 수가 간세포의 글리세롤 지질 대사에 다른 영향을 미치는 것으로 시사되었다.

이상의 결과에서, 사람 간배양 세포 유래의 HepG2에 있어서 LA는 콜레스테롤 합성을 억제하고, BSA는 콜레스테롤 합성을 증가시키는 작용을 나타내는 것으로 인정되었다. LA와 BSA의 동시 첨가는 리포단백질의 구성성분인 지질분비를 촉진시키고, BSA는 간장의 중성지질 합성을 촉진시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Kim, D. -J. and Cho, B. -H. (1996) Effects of stearic, oleic and elaidic acids on cellular lipids and their fatty acid composition in HepG2 cells. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 399-405.
2. Hegsted, D. M., McGandy, R. B. and Stare, F. J. (1965) Quantitative effect of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **17**, 281-289.
3. Cha, J. Y. and Yanagita, T. (1998) Impact of cholesterol on the liver microsomal phospholipid metabolism in rats fed a diet containing fish oil or beef tallow oil. *Bull. Fac. Agr., Saga Univ.* **83**, 59-69.
4. Holman, R. T. (1977) Essential fatty acids in human nutrition. *Adv. Exp. Med.* **88**, 515-521.
5. Harris, W. S., Connor, W. E. and McMurphy, M. P. (1983) The comparative reduction of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: salmon oil, versus vegetable oils. *Metabolism* **32**, 179-184.
6. Balasubramaniam, S., Simons, L. A., Chang, S. and Hickie, B. J. (1985) Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich n-3 fatty acids in the rat. *J. Lipid Res.* **26**, 684-689.
7. Shepherd, J., Pckard, C. J., Grundy, S. M., Yeshurum, D., Gotto, Jr. A. M. and Taunton, O. D. (1985) Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoprotein in man. *J. Lipid Res.* **26**, 91-99.
8. Wong, S. H., Nsetel, 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.
9. Cianflone, K., Vu, H., Zhang, Z. and Sniderman, D. A. (1994) Effects of albumin on lipid synthesis, apo B-100 secretion and LDL catabolism in HepG2 cells. *Atherosclerosis* **107**, 125-135.
10. Pullinger, R. C., North, D. J., Teng, B., Rificii, A. V., Ronhild de Brito, A.E. and Scott, J. (1989) The apolipoprotein B gene is constitutively expressed in HepG2 cells: regulation of secretion by oleic acid, albumin and insulin, and measurement of the mRNA half-life. *J. Lipid Res.* **30**, 1065-1077.
11. Ascoli, G. A., Bertucci, C. and Salvadori, P. (1998) Ligand binding to a human serum albumin stationary phase: use of same-drug competition to discriminate pharmacologically relevant interactions. *Biomed. Chromatogr.* **12**, 248-254.
12. Dashti, N. (1992) The effect of low density lipoproteins, cholesterol and 25-hydroxycholesterol on apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 7160-7169.
13. Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, J. -Y. and Mori, Y. (1997) Inhibitory effects of Oren-Gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: Evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay ACAT. *Planta Med.* **63**, 141-145.
14. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
15. Yanagita, T., Satoh, M., Enomoto, N. and Sugano, M. (1987) Di (2-ethylhexyl) phthalate enhances hepatic phospholipid synthesis in rats. *Biochim. Biophys. Acta* **919**, 64-70.
16. Duncan, D. B. (1957) Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* **13**, 164-176.
17. Erickson, K. S. and Fielding, E. P. (1986) Parameters of cholesterol metabolism in human hepatoma cell line, HepG2. *J. Lipid Res.* **27**, 875-883.
18. Yanagita, T., Shinkai, K., Yamamoto, K., Ikeda, I. and Sugano, M. (1993) Effect of trans-isomers of linoleic acid on lipid synthesis and secretion in HepG2 cells. *Trans Fatty Acid; Nutrition and Physiology at Xth international Congress of Nutrition, Adelaide, Australia, Abstract 37.*
19. Banfi, C., Rise, P., Mussoni, L., Galli, C. and Tremoli, E. (1997) Linoleic acid enhances the secretion of plasminogen activator inhibitor type 1 by HepG2 cells. *J. Lipid Res.* **38**, 860-869.
20. Ide, T. and Sugano, M. (1984) Oxidation and esterification of cis- and trans-isomers of octadecanoic acid and octadecadienoic acid in isolated rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 281-291.
21. Cha, J. -Y., Kim, K. -S. and Cho, Y. -S. (1998) Change of fatty acid compositions during hepatic triacylglycerol accumulation in dietary orotic acid-induced fatty liver. *Kor. J. Food Nutr.* **11**, 542-549.
22. Kumihara, A. and Suzuki, H. (1994) Effect of linoleic acid administration on liver triacylglycerol accumulation in rats during fasting. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **47**, 369-373.
23. Homen, R., Grossman, E. J. and Pownall, J. H. (1991) Differential effects of eicosapentaenoic acid and oleic acid on lipid synthesis and secretion by HepG2 cells. *J. Lipid Res.* **32**, 231-241.
24. Frukawa, S. and Hirano, T. (1993) Rapid stimulation of apolipoprotein B secretion by oleic acid is not associated with cholesteryl ester biosynthesis in HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1170**, 32-37.

Effects of Linoleic Acid and Serum Albumin Concentrations on Lipid Metabolism in HepG2 Cells

Jae-Young Cha and Young-Su Cho*(*Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Hadan-2-dong Sahagu, Pusan, 604-714, Korea*)

Abstract : The effects of linoleic acid(LA, 18 : 2) and/or bovine serum albumin(BSA) on the lipid metabolism in human hepatoma cell line HepG2 cells were evaluated. HepG2 cells were cultured in basal Dulbecco's modified Eagle's(DME) medium(Basal medium), DME medium containing 0.2 mM LA(LA medium), or DME medium containing both 0.2 mM LA and 0.2-1.0% BSA(LA+BSA medium). [¹⁴C]Acetate(0.3 μCi/ml medium) was added as a radioactive lipid precursor and the cells were incubated for 6 hours. An addition of LA to basal medium resulted in a decrease in the incorporation of [¹⁴C]acetate into total cholesterol fraction. In contrast, an addition of BSA to LA-containing medium tended to increase the incorporation of [¹⁴C]acetate into total cholesterol. The alteration of cholesterol metabolism in HepG2 cells incubated in LA+BSA medium was attributed by an increase in the incorporation of [¹⁴C]acetate into free cholesterol, but not cholesteryl ester fraction. In addition, the secretion of cholesterol was increased by LA+BSA medium, suggesting that BSA stimulates cholesterol secretion. No significant change in the incorporation of [¹⁴C]acetate into cellular total lipids was observed among the experimental groups. However, an increased incorporation of [¹⁴C]-labelled fatty acid into cellular triacylglycerol and decreased incorporation into phospholipid were observed in cells incubated with LA+BSA medium as compared to those of LA medium. The secretions of [¹⁴C]-labelled triacylglycerol, phospholipid, and free fatty acid were also stimulated in HepG2 cells incubated with LA+BSA medium. In conclusion, the present study suggests that in human hepatocytes, LA and BSA influence lipid metabolism, and BSA enhances the secretion of lipids.

Key words : linoleic acid, albumin, HepG2 cells, cholesterol, triacylglycerol

*Corresponding author