

Orotic acid와 Di-(2-ethylhexyl)phthalate 투여 흰쥐의 간장 및 소장 Microsomal Triglyceride Transfer Protein(MTP) 활성과 mRNA 수준에 미치는 영향

차재영 · 조영수
동아대학교 생명자원과학부

Effects of Orotic Acid and Di-(2-Ethylhexyl)Phthalate on Microsomal Triglyceride Transfer Protein(MTP) Activity and mRNA Levels in Liver and Intestine of Rats

Jae-Young Cha and Young-Su Cho

Faculty of Life Science and Bioresource, Dong-A University

Microsomal triglyceride transfer protein(MTP) activity and mRNA level were investigated in the liver and small intestine of rats fed on di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) and orotic acid(OA) as serum triglyceride-reducing agents. The concentration of liver triglyceride was significantly increased in the OA group, but that was not increased in the DEHP group compared with the control group. The concentration of serum triglyceride was significantly decreased in the OA and DEHP groups compared with the control group, but this reduction was more pronounced in the OA group. MTP activity and mRNA level in liver were decreased in the OA group compared with the control group, while MTP activity in the small intestine was increased in the OA group compared with the control group. MTP activities and MTP mRNA levels in both liver and small intestine had no influence by the DEHP dietary feeding, despite the triglyceride-lowering action, compared with the control dietary feeding. The activity of liver microsomal phosphatidate phosphohydrolase(PAP), the rate-limiting enzyme in triglyceride synthesis, was increased in the OA group compared with the control group, but that of cytosolic PAP was decreased in the DEHP group compared with the control group. The result suggest that MTP activity and MTP mRNA level are involved in the triglyceride-lowering action of OA, but those are not involved in that of DEHP.

Key words : orotic acid, di-(2-ethylhexyl)phthalate, triglyceride, microsomal triglyceride transfer protein(MTP)

서 론

식생활과 생활습관의 변화와 따른 고지방 함유 식이를 장기간 섭취함으로써 생체 내에서 지질대사 이상을 일으켜 심근경색, 뇌경색 및 동맥경화 등과 같은 혈관순환기계 질환의 증가로 인하여 큰 사회적 문제로 대두되고 있다⁽¹⁾. 이러한 혈관순환기계 질환의 유발은 여러 인자가 복합적으로 작용하며, 그 중에서도 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증이 지적되고 있다⁽²⁾. 한편, 고중성지질혈증과 저HDL-콜레스테롤 혈증도 이러한 질환들의 주요 발증 인자로서 주목받게 되어, 구미에서 새로운 임상지침이 설정되었다^(3,4). 최근에 내분비

교란물질로 알려진 polychlorinated biphenyls(PCB), dichlorodiphenyltrichloroethane(DDT), di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP) 등도 생체내에서 지질대사에 이상을 일으켜 혈청 지질을 감소시키는 것으로 알려져 있다^(5,6). DEHP는 플라스틱 제품들에 가소성을 제공해 주기 위한 화합물로서 전체 가소제의 1/4을 차지할 정도로 광범위하게 사용되며, 지용성으로 유제품이나 축산물의 지방질에 농축되어 있을 가능성이 크며 주방기구 또는 도료 등에도 포함되어 있으므로 인체에 노출될 위험이 매우 높은 화합물이다. DEHP를 동물에 투여하게 되면 간장 비대증, 간장 퍼옥시즘 증대, 국제성 효소 catalase 활성 유도작용 및 간장의 인지질 대사변동 등이 보고된 바 있다^(7,8). 또한, DEHP는 간장내 퍼옥시즘의 β -지방산 산화계 효소를 유도하여 산화 활성을 촉진시킴으로서 혈중의 중성지질 저하를 초래하는 것으로 시사되어 있다⁽⁹⁾.

오로트산(Orotic acid)는 pyrimidine nucleotide 생합성의 중간 생성물로서⁽¹⁰⁾, 실험동물에 과잉투여 시킴으로서 간장에 중성지질이 이상적으로 축적 되어 지방간을 유발시킨다⁽¹¹⁻¹⁴⁾.

Corresponding author : Cho Young-Su, Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Hadan-2-dong Sahagu, Busan 604-714, Korea
Tel: 82-51-200-7586
Fax: 82-51-200-7505
E-mail: choys@mail.donga.ac.kr

한편, 오로트산은 실험동물과 사람에게 있어서 저지질혈증을 유발시키는 것으로 알려져 있는데, 이러한 기작으로서는 간장으로부터 very low density lipoprotein(VLDL) 분비 저해가 시사되어 있다^(12,15). 간장은 각종의 지질과 apolipoprotein을 합성하여 lipoprotein으로서 혈중으로 공급하게 된다. 간장의 활면소포체(sER)에서 합성된 apolipoprotein B100은 골면소포체(rER)로 이동되면서 지질 성분과 함께 원시형의 VLDL를 만들어 Golgi 장치로 운반된다. 그 후 Golgi 내공을 통과하면서 지질 성분을 입자에 공급하여 성숙된 VLDL이 형성되어 혈중으로 분비된다⁽¹⁴⁾. 이때 소포체의 glycerol-3-phosphate 경로에서 새롭게 합성된 중성지질이 VLDL 입자 내로 운반될 때 microsomal triglyceride transfer protein(MTP)이 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다^(16,17). 최근, 현저한 저지질혈증을 나타내는 무 β -리포단백혈증의 환자(Abetalipoproteinemia)에서 MTP 유전자의 이상이 발견되어, apolipoprotein 함유 리포단백질의 합성과 분비에 MTP의 역할이 크게 주목받게 되었다⁽¹⁷⁾. 간장에서 VLDL 합성 및 분비는 중성지질의 합성량과 apolipoprotein의 합성 및 분해 등에 의해 주로 결정되는데, 이 대사과정에서 어느 하나라도 대사장애가 생기게 되면 간장에서 지방을 축적 시키거나, 저지질혈증 또는 고지질혈증을 유발시키기도 한다. 그러나, DEHP와 OA에 의한 혈청 중성지질의 저하 기작은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 따라서, 본 실험에서는 DEHP와 OA가 저지질혈증을 나타내는 대사기작을 밝혀내기 위하여 간장내 MTP 활성과 mRNA량을 측정하고, 소장 내에서의 MTP 활성과의 연관성에 대해서도 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

Orotic acid 및 Di-(2-ethylhexyl)phthalate는 Wako Junyaku Co.(Osaka, Japan) 으로부터 구입하였다. Vitamin mixture (AIN-93) 및 mineral mixture (AIN-93)은 Oriental Kobo Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. [¹⁴C]trioleic acid 및 [α -³²P]dCTP는 Amersham Corp. (England)에서 구입하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 특급을 사용하였다.

실험동물 및 식이 조성

본 실험에는 4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 스테인레스 망제의 개별 케이지를 사용하여 사육온도 22±2°C, 습도 50±5%의 동물 사육실에서 사육하였으며, 명암은 12시간 주기로서 07:00~19:00시까지는 명기, 19:00~07:00시까지는 암기로 하였다. 식이 및 음료수는 09:00~10:00시 사이에 급여하였으며, 이 시기에 식이 섭취량 및 체중 증가량 등의 작업을 실시하였다. 본 실험을 개시하기 전에 흰쥐에 반합성 대조 식이로 4일간 적응 사육시킨 후, 평균 체중이 거의 같도록 6마리씩 대조 식이군, DEHP 식이군 및 OA 식이군으로 나누었다. 본 실험에 사용한 식이 조성은 Table 1과 같으며, OA 및 DEHP는 각각 1.0% 수준으로 첨가하였다. 식이와 음료수는 실험기간 동안 자유섭취시켰다.

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredients	Control	DEHP ¹⁾	OA ²⁾
Casein	20.0	20.0	20.0
α -Corn starch	15.0	15.0	15.0
Palm oil	10.0	10.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0
AIN-93 mimeral mixture	4.0	4.0	4.0
AIN-93 vitamin mixture	1.0	1.0	1.0
L-Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
DEHP ¹⁾	-	1.0	-
OA ²⁾	-	-	1.0
Sucrose	to make 100		

¹⁾DEHP: di-(2-ethylhexyl)phthalate (1%)

²⁾OA: orotic acid

간장 및 혈청의 지질 분석

실험기간 종료일의 오전 8:00~9:00시에 흰쥐를 에테르로 가볍게 마취시킨 후 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고, 간장은 즉시 적출 하여 생리식염수로 충분히 씻어서 여과지로 불기를 제거한 다음 중량을 측정하고, -80°C의 냉동고에 보관하면서 실험에 제공하였다. 간장 총 지질은 Folch 등의 방법⁽¹⁸⁾에 의하여 추출 순화하였으며, 간장의 중성지질 농도는 Fletcher의 방법⁽¹⁹⁾으로 정량 하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 정지시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 혈청을 얻었으며, 혈청 중성지질 농도는 Triglyceride E-test wako kit(Wako, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다.

간장 및 소장으로부터 microsome 분획의 조제

간장으로부터 microsome 분획과 cytosol 분획은 Croze 및 Morre의 방법⁽²⁰⁾으로 분리하였다. 즉, 간장을 일정량 취해 10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 10 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 및 250 mM sucrose를 함유한 homogenate 용액을 4 배량 첨가하여 균질물을 제조하였다. 이 용액을 냉각 원심분리기(Kubota, KR-20000 T, Tokyo, Japan)에서 12,000 rpm, 4°C, 20분간 원심분리한 후 상등액을 4 겹의 gauze로 여과하고, 여액을 초원심분리기(Hitachi 55p-72, Tokyo, Japan)에서 45,000 rpm, 4°C, 45분간 원심 분리하여 침전된 핵분에 homogenate 용액을 일정량 가하여 microsome 분획으로 하였고, 상등액은 cytosol 분획으로 하였다. 소장은 맹장 부위로부터 30 cm 정도 적출한 후 내장을 생리식염수로 씻어내고 절개한 다음 유리글라스로 상피세포 부분을 긁어모아 상기의 방법으로 각 분획을 분리하였다. 이렇게 각각 얻어진 분획의 단백질량은 BCA protein assay kit(Pierce, Illinois, USA)를 이용하여 Microplate reader(Model 1550, Bio-Rad Co., Tokyo, Japan) 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTP 활성 측정

MTP 활성은 Wetterau 등의 방법⁽¹⁷⁾에 의하여 측정하였다. 즉, 0.035 nM Egg phosphatidylcholine, 0.175 nM trioieic acid, 0.5 μ Ci [¹⁴C]trioieic acid 및 0.1% butylated hydroxy-

toluene을 함유한 donor-vesicle과 0.175 nM phosphatidylcholine, 0.875 nM trioleic acid, 8.8 nM cardiolipin 및 0.1% butylated hydroxytoluene을 함유한 acceptor-vesicle용액을 30 분 이상 초음파 처리하여 liposome particle를 조제하였다. 15 mM Tris-HCl(pH 7.0), 35 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% Na₂S₂O₅ 및 0.05% bovine serum albumin을 함유한 반응액중에 donor 및 acceptor vesicle를 각각 첨가한 후, microsomal 효소액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 DEAE-cellulose/반응액(=1:1)의 혼합 용액을 가하여 효소반응을 정지시키고, 충분히 교반하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층의 일정량을 취해 scintillation 용액을 가한후 잘 혼합하여 액체 scintillation counter(Wallic system 1410, Pharmacia, Sweden)에서 방사성 활성을 측정하였다. MTP 활성은 donor vesicle로부터 acceptor vesicle에 이동된 [¹⁴C]trioleic acid의 dpm을 상대치로 하여 나타내었다.

MTP mRNA 수준의 측정

신선한 간조직과 소장 상피세포를 일정량 취하여 액체 질소가스로 급속 동결 시킨 후 ISOGEN(Nippon Gene, Tokyo, Japan)을 이용하여 총 RNA를 추출하였으며, MTP mRNA (Saga Medical School, Saga, Japan)는 northern blot 방법으로 측정하였다. 즉, 총 RNA(50 µg)을 1.0% agarose gel로 전기영동시켜 nitrocellulose membrane에 옮기고 [³²P]-labelled MTP plasmid DNA probe로 65°C에서 하룻밤 혼성화 하였다. MTP plasmid DNA와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) plasmid DNA는 각각 Hind III와 Eco RI 제한효소로 처리한 후 전기영동시켜 DNA 추출 kit(Wizard)로 얻고, 각 DNA 단편은 [α -³²P]dCTP(110 TBq/mmol, Amersham Crop., England)와 Bca BESTTM Labelling system(Takara Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 random primer extension 방법⁽²¹⁾으로 혼성화 하였으며, 이때 결합되지 않은 probe는 sodium citrate/SDS washing 용액으로 제거하고, nitrocellulose membrane을 X-ray film (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)에 노출시킨 후 (-80°C, 72시간) autoradiography로 MTP mRNA를 확인하였다. 이때 MTP mRNA 수준은 GAPDH 발현량에 대한 비율로서 나타내었다.

통계처리

실험에 의하여 얻어진 결과치는 Duncan's multiple range test를 사용하여 통계 처리하였다⁽²²⁾.

결과 및 고찰

실험 기간중의 체중 증가량은 대조군에 비해 DEHP군 및 OA군에서 유의적으로 낮게 나타났다(Table 2). 이러한 변화는 식이 섭취량과 같은 경향으로서, 식이 섭취량의 감소에 의해 체중 변화가 일어난 것으로 생각된다. 체중에 대한 간장의 상대적 중량은 DEHP군 및 OA군에서 증가된 것으로 나타나 전보에서와 같이 간장 비대가 확인되었다^(6,11,12).

간장의 중성지방 농도는 대조군에 비해 DEHP군에서는 유의적인 차이가 없었으나, OA군에서는 현저한 증가를 보였다

Table 2. Effects of OA and DEHP on body weights, food intakes and liver weights in rats

	Body Weight (g)		Food Intake	Liver Weight
	Initial	Final	(g/day)	(g/100g B.W.)
Control	97.2±2.7	187±2.4 ^a	15.4±0.4 ^a	5.75±0.10 ^a
DEHP ¹⁾	97.7±1.7	152±1.6 ^b	9.70±0.2 ^b	7.38±0.18 ^c
OA ¹⁾	98.2±2.1	151±6.1 ^b	12.4±0.4 ^{ab}	6.23±0.18 ^b

¹⁾See the legend of Table 1. Rats were fed the semipurified diets supplemented with either di-(2-ethylhexyl)phthalate (1%) or orotic acid (1%) for 10 days. Values are the means ± SE of 6 rats. Values with different letters are significantly different at p<0.05

Table 3. Effects of OA and DEHP on the concentration of triglyceride in the liver and serum of rats

	Triglyceride	
	(mg/g liver)	(mg/100 mL serum)
Control	16.9±2.34 ^a	184±14 ^a
DEHP ¹⁾	16.5±0.87 ^a	70±2.7 ^b
OA ¹⁾	156±7.10 ^b	38±2.3 ^b

¹⁾See the legend of Table 1. Rats were fed the semipurified diets supplemented with either di-(2-ethylhexyl)phthalate (1%) or orotic acid (1%) for 10 days. Values are the means ± SE of 6 rats. Values with different letters are significantly different at p<0.05

(Table 3). 저자들은 OA를 섭취시킨 흰쥐에서 간장 중성지방은 3일째까지는 감소하다가 5일째부터 증가하기 시작하여 10 일째에는 지방 침착에 의해 지방간이 유발되는 것으로 보고 한 바 있다⁽¹²⁾. 한편, 혈청 중성지방 농도는 DEHP군 및 OA 군에서 현저하게 저하되었으며, 이러한 현상은 OA군에서 더욱 현저하였다(Table 3). OA군에서의 혈청 중성지방 농도의 저하는 혈중으로의 VLDL 분비저해가 하나의 요인으로 보고 된 결과와 일치하고 있다⁽²³⁾. OA는 간장으로부터 혈중으로의 HDL 분비에는 아무런 영향을 미치지 않고, 단지 apo-B 함유 VLDL 분비만을 저해시키는 것으로 보고된 바 있다⁽²⁴⁾. 정상 식이와 OA 식이로 사육한 흰쥐 간세포 분획의 지질량에 대해서 검토한 결과, OA를 섭취한 흰쥐의 간장으로부터 조제한 세포 분획인 ER 내공과 Golgi 장치에서 apo B는 정상군 수준과 동일한 양으로 존재하고, 단지 중성지방은 ER 내공에서 축적된 반면, Golgi 장치 내에서는 축적 되지 않았다^(14,25). 이것은 apo B 합성의 저해에 의한 것이 아니고, trans Golgi 장치 또는 그 이전의 지질과 apo B의 packing modify (집합 변형)에 의한 것으로 보고된 바 있다⁽²⁵⁾. 따라서, 이 과정에서 지질수송에 관여하는 MTP가 중요한 역할을 할 것으로 추측된다⁽¹⁷⁾.

간장에서 중성지방은 글리세롤-3-phosphate 경로에서 합성되어져⁽¹⁶⁾, MTP에 의해 수송을 받아서 활면소포체에서 합성된 apo B와 함께 원시형 VLDL 입자를 만들고 Golgi 체내로 이동하면서 당부가가 이루어진 후, 성숙된 VLDL 입자로서 Disse 내공을 개입시켜 혈중으로 분비되어 진다⁽²⁷⁾. MTP는 간세포와 소장 세포에만 존재하는 2 량체의 단백질로서 VLDL 입자중의 지질수송에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근, 가족성 무β-리포단백혈증의 환자에서 MTP 유전자의 이상이 발견되어 apo B 함유 리포단백질의 집합과 분

Table 4. Effects of OA and DEHP on the microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity and MTP mRNA level in the liver and intestine of rats

	Liver MTP		Intestine MTP
	Activity	mRNA	Activity
	(% of control)		
Control	100 ± 11 ^a	100 ± 16 ^a	100 ± 2.8 ^a
DEHP ¹⁾	84 ± 17 ^a	101 ± 2.9 ^a	117 ± 6.4 ^a
OA ¹⁾	58 ± 16 ^b	78 ± 2.4 ^b	144 ± 24 ^b

¹⁾See the legend of Table 1. Rats were fed the semipurified diets supplemented with either di-(2-ethylhexyl)phthalate (1%) or orotic acid (1%) for 10 days. Values are the means ± SE of 6 rats. Values with different letters are significantly different at p<0.05

비에 MTP가 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다¹⁷⁾. 가족성 무β-리포단백혈증은 VLDL의 구성 단백질인 apo B는 정상적으로 합성되지만, 여기에 결합하는 중성지질의 수송이 저해되어 VLDL의 분비가 억제됨으로서 저지질혈증을 유발시킨다. 따라서, OA에 의한 저지질혈증의 보다 명확한 대사기전을 밝혀내기 위하여 본 실험에서도 MTP 대사에 대하여 검토하였다. 그 결과, 간장에서 MTP 활성은 대조군에 비해 DEHP군에서는 유의적인 감소는 없었으나, OA군에서는 현저하게 감소하였다(Table 4). 또한, 간장에서 MTP 유전자 발현의 결과에서도 MTP 활성과 같은 경향을 나타냄으로서, OA에 의한 저지질혈증의 대사 기작은 MTP 유전자의 전사 단계에서부터 억제되는 것으로 시사되었다. 한편, OA 섭취 흰쥐의 소장 상피세포에서 분비되는 apo B 단백질 함유 chylomicron 합성 및 분비는 정상적으로 이루어진다는 결과가 보고되어 있다¹⁴⁾. 본 연구 결과에서도 간세포에서의 MTP 활성과는 달리 소장 상피세포에서의 MTP 활성은 대조군보다 OA군에서 증가하여 이전의 결과와 일치하였다¹⁴⁾. DEHP는 간장 피육시즘 증식촉진과 지방산 β산화계 효소를 유도하여 지방산의 산화를 촉진하고, 혈청지질의 농도를 저하시키는 것으로 알려져 있다⁹⁾. DEHP 투여에 의한 간장 중성지질 농도의 변동은 없었으나, 혈청 중성지질 농도는 현저히 감소하였다(Table 3). 이러한 결과는, 간장 내에서의 지질대사는 OA에 의한 것과는 다른 대사 경로를 거치는 것으로 생각된다. 즉, OA는 간장에서 MTP 활성과 유전자 전사를 억제시켜 혈중으로의 지질 분비를 억제시킴으로서 간장에 중성지질이 축적되며, DEHP는 간장 및 소장에서의 MTP 활성과 유전자 전사에는 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다. 따라서, DEHP에 의한 혈중 중성지질 농도의 저하 기작은 간장 내에서의 중성지질 대사변동에 기인하는 것을 시사한다. 실제로 DEHP는 간장의 피육시즘계 산화효소를 유도해서 지방산 산화를 촉진시키는 결과가 보고된 바 있다⁹⁾. 간장에서의 지방산 산화는 간장 내의 지방산 pool을 저하시켜, 중성지질 합성계에 이용되는 지방산의 availability를 저하시킴으로서 VLDL 분비가 감소된 것으로 생각된다.

간장에서의 중성지질은 glycerol-3-phosphate 경로에서 합성되는데, 이 경로의 주요 조절효소는 phosphatidic acid에서 diacylglycerol 생성을 촉매 하는 효소인 phosphatidate phosphohydrolase(PAP)가 알려져 있다^{12,16)}. 이것은 중성지질 합성

Table 5. Effects of OA and DEHP on the activity of phosphatidate phosphohydrolase in rats

	Phosphatidate phosphohydrolase	
	Microsome	Cytosol
Control	10.1 ± 1.25 ^a	15.7 ± 1.57 ^a
DEHP ¹⁾	10.0 ± 0.94 ^a	9.94 ± 1.56 ^b
OA ¹⁾	14.2 ± 0.44 ^b	15.3 ± 0.47 ^a

¹⁾See the legend of Table 1. Rats were fed the semipurified diets supplemented with either di-(2-ethylhexyl)phthalate (1%) or orotic acid (1%) for 10 days. Values are the means ± SE of 6 rats. Values with different letters are significantly different at p<0.05

에 관련된 다른 효소 활성보다도 민감하게 작용하며, 혈청 중성지질 농도의 변화에 좋은 지표로 이용되고 있기 때문이다. PAP는 간세포내의 microsome, 세포질 및 plasma membrane에 국재 하는데, 중성지질의 생합성에는 microsomal PAP와 세포질형 PAP가 관여하고, 세포질형 PAP는 지방산 등의 외부 영향에 의해서 막으로 이동되어 막결합형인 microsomal PAP로 전환됨으로서 활성화된다¹²⁾. 따라서, microsomal PAP가 중성지질 생합성의 중요 조절효소로 알려져 있다^{12,28)}. 본 연구에서도 microsomal PAP 활성이 OA 투여에 의해 현저하게 증가함으로써 간장 중성지질 농도와 상관관계를 나타내어(Table 5) 이전의 결과와 일치하였다^{12,29)}. OA 투여에 의한 간장 지질농도의 변동은, 초기단계(1-3일)에서는 혈청 중성지질 농도와 함께 감소하다가 차츰 증가하는데 비해 혈청 중성지질 농도는 계속 저하된 수준을 유지한다^{12,30)}. 이러한 결과는, OA에 의한 간장 중성지질의 축적으로 인하여 혈중으로의 지질분비 만으로는 설명할 수 없다. 따라서, 저자들은 OA 투여시의 경시적인 간장 중성지질 대사계를 검토한 결과, 간장 중성지질 농도의 변동과 PAP 활성의 변동은 동일한 경향을 나타내었고, 그 결과 높은 상관관계를 보였다¹²⁾. 본 실험의 결과에서도(Table 5), OA에 의한 microsomal PAP 활성이 증가되었고, 세포질형 PAP 활성은 변동이 없는 것으로 나타나 이전의 실험 결과와 일치하였다¹²⁾. 또한, DEHP 섭취에 의한 microsomal PAP 활성은 대조군과 차이가 없었으나, 세포질형 PAP 활성은 대조군에 비해 DEHP군에서 현저히 감소되었다. 이는 DEHP에 의해 간세포내에서 지방산 pool의 변화에 의해서 세포질형 PAP가 중성지질을 합성하는 활성화형 microsomal PAP로 전환되지 못함으로써 VLDL 입자인 중성지질을 합성하지 못하여 혈청 중성지질 농도가 감소되는 것으로 사료된다. 따라서, PAP 활성에도 DEHP와 OA는 상당히 다른 양상으로 영향을 미치는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서, OA에 의한 저지질혈증에는 간장 MTP 활성과 유전자 발현의 저해가 관여하였으나, DEHP에 의한 저지질혈증에는 간장 MTP 활성과의 관계는 없는 것으로 시사되었다.

요 약

혈청 중성지질 저하작용을 가지고 있는 것으로 알려진 OA 식 및 DEHP식을 각각 투여한 흰쥐의 간장 및 소장에서 MTP 활성과 mRNA 수준을 검토하였다. 간장 중성지질 농도는 대

조군에 비교해서 OA군에서 유의하게 증가하였으나, DEHP군에서는 유의한 차이가 없었다. 혈청 중성지방 농도는 대조군에 비해서 OA군 및 DEHP군에서 유의하게 감소하였는데, 이러한 저하는 OA군에서 더욱 현저하였다. 간세포에서의 MTP 활성과 mRNA 수준은 대조군에 비해서 OA군에서 유의하게 저하하였으나, 소장에서의 MTP 활성은 증가하였다. 그러나, 간장 및 소장의 MTP 활성과 mRNA 수준은 대조군과 DEHP군 사이에서는 유의적인 변화가 없었다. 간장에 있어서 중성지방 합성의 중요 조절효소인 microsomal PAP 활성은 대조군에 비해 OA군에서 유의하게 증가하였으나, DEHP군에서는 cytosolic PAP 활성이 감소하였다. 이상의 결과로부터, OA에 의한 혈청 중성지방 저하 작용에는 간장 MTP 활성과 mRNA 유전자 발현이 깊이 관여하였으나, DEHP에 의한 혈청 중성지방 저하 작용에는 MTP 대사와는 무관한 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 논문은 2000년 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2000-FA001)에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

문헌

- Annual statistical report on the causes of death. National Statistical Office, Republic of Korea (1996)
- Castelli, W.P., Garrison, R.T., Wilson, P.W., Abbott, R.D., Kalousdian, S. and Kannel, W.B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study. *JAMA* 256: 2835-2844 (1986)
- Anonymous. Prevention of coronary heart disease: Scientific background and new clinical guidelines. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2: 113-156 (1992)
- Anonymous. NIH Consensus Development Panel on triglyceride, HDL and coronary heart disease. *JAMA*, 269: 505-510 (1993)
- Oda, H., Matsushita, N., Hirabatashi, A. and Yoshida, A. Cholesterol-rich very low density lipoprotein and fatty liver in rats fed polychlorinated biphenyls. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 2152-2158 (1994)
- Yanagita, T., Satoh, M., Nomura, H., Enomoto, N. and Sugano, M. Alteration of hepatic phospholipids in rats and mice by feeding di-(2-ethylhexyl)adipate and di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Lipids* 22: 572-577 (1987)
- Yanagita, T., Satoh, M., Enomoto, N. and Sugano, M. Di-(2-ethylhexyl)phthalate enhances hepatic phospholipid synthesis in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 919: 64-70 (1987)
- Yanagita, T., Kobayashi, K. and Enomoto, N. Accumulation of hepatic phospholipids in rats fed di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2283-2288 (1978)
- Osumi, T. and Hashimoto, T. Subcellular distribution of the enzymes of the fatty acyl-CoA beta-oxidation system and their induction by di-(2-ethylhexyl)phthalate in rat liver. *J. Biochem.* 85: 131-139 (1979)
- Hurlbert, R.B. and Potter, V.R. Nucleotide metabolism. I. The conversion of orotic acid [$6\text{-}^{14}\text{C}$] to uridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 209: 1-21 (1954)
- Cho, Y.S., Kim, S.H. and Cha J.Y. Effect of ingested orotic acid on serum, liver and kidney lipid concentration in rats. *Agri. Chem. Biotech.* 39: 206-211 (1996)
- Cha, J.Y., Mameda, Y., Oogami, K., Yamamoto, K. and Yanagita, T. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 508-513 (1998)
- Cho, Y.S. and Cha, J.Y. Effect of dietary orotic acid on triacylglycerol metabolism in rats and mice. *Korea J. Life Science* 6: 159-164 (1996)
- Catwright, I.J., Hebachi, A.M. and Higgins, J.A. Transit and sorting of apolipoprotein B within the endoplasmic reticulum and Golgi compartments of isolated hepatocyte from normal and orotic acid-fed rats. *J. Biol. Chem.* 268: 20937-20949 (1993)
- Kelley, W.N., Greene, M.L., Fox, I.H., Rosenbloom, W.M., Levy, R.I. and Seegmiller, J.E. Effect of orotic acid on purine and lipoprotein metabolism in man. *Metabolism* 19: 1025-1035 (1970)
- Lamb, R.G. and Fallon, H.J. Glycerolipid formation the glycerol-3-phosphate by rat liver cell fractions. The role of phosphatidate phosphohydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* 348: 166-178 (1974)
- Wetterau, J.R., Aggerbeck, L.P., Bouma, M.E., Eisenberg, C., Munck, A., Hermier, M., Schmitz, J., Gay, G., Rader, D.J. and Gergg, R.E. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 258: 999-1001 (1992)
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Starley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509 (1957)
- Fletcher, M.J. Colorimetric method for estimating serum triglyceride. *Clin. Chem. Acta* 22: 393-397 (1968)
- Croze, E.M. and Morre, D.J. Isolation of plasma membrane, Golgi apparatus, and endoplasmic reticulum fractions from single homogenates of mouse liver. *J. Cell. Physiol.* 119: 46-57 (1984)
- Yoo, U.J. Biomedical research. *Shinkihyok* pp.71-130 (1996)
- Duncan, D.B. Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* 13: 164-176 (1957)
- Pottenger, L.A. and Getz, G.S. Serum lipoprotein accumulation in the livers of orotic acid-fed rats. *J. Lipid Res.* 12: 450-459 (1972)
- Hamilton, R.L., Guo, L.S.S., Felker, T.E., Chao, Y. and Havel, R.J. Nascent high density lipoprotein from liver perfusates of orotic acid fed rats. *J. Lipid Res.* 27: 967-978 (1986)
- Cha, J.Y., Kim, K.S. and Cho, Y.S. Change of fatty acid composition during hepatic triacylglycerol accumulation in dietary orotic acid-induced fatty liver. *Korean J. Food Nutr.* 11: 542-549 (1998)
- Higgins, J.A. and Hutson, J.L. The role of Golgi and endoplasmic reticulum in the synthesis and assembly of lipoprotein lipid in rat hepatocytes. *J. Lipid Res.* 25: 1295-1305 (1984)
- Swift, L.L. Assembly of very low density lipoprotein in rat liver: A study of nascent particles recovered from rough endoplasmic reticulum. *J. Lipid Res.* 36: 395-406 (1995)
- Fremont, L. and Gozzelino, M.T. 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 (1996)
- Cha, J.Y., Cho, Y.S., Kim, I., Anno, T., Rahman, S.H. and Yanagita, T. Effects of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Food Human Nut.* 56: 1-10 (2001)
- Novikoff, P.M., Roheim, P.S., Novikoff, A.B. and Edelman, D.B. Production and prevention of fatty acid liver in rats fed clofibrate and orotic acid diets containing sucrose. *Lab. Investigation* 30: 732-740 (1974)

(2001년 4월 17일 접수)