

## 어유의 Docosahexaenoic Acid (DHA)가 인체혈관 내피세포 (ECV304 Cells)에서의 Apoptosis에 미치는 영향\*

김영연\*\* · 김효숙\*\* · 김매하\*\*\* · 장수정\*\*\* · 이명숙\*\*,\*\*\*§

성신여자대학교 가족건강복지센터 영양의학실 (FHCW),\*\* 성신여자대학교 식품영양학과\*\*\*

### Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on the Apoptosis of Human Endothelial ECV304 Cells\*

Kim, Young Youn\*\* · Kim, Hyosook\*\* · Kim, Mae-Ha\*\*\* · Jang, Soojeong\*\*\* · Lee, Myoungsook\*\*,\*\*\*§

Division of Nutritional Medicine,\*\* Family Health and Welfare Center (FHCW), Seoul 136-742, Korea

Department of Food and Nutrition,\*\*\* Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

#### ABSTRACT

DHA, one of w-3 fatty acids, modulates cell growth or death through the changes of apoptotic signaling in human endothelial ECV304 cells. We investigated the effects of DHA on the changes of apoptotic signaling in human vascular endothelial ECV304 cells using lipid peroxidation (LPO) metabolites. LPO could be originated by dietary polyunsaturated fatty acids such as linoleic acid (LA), arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA). DHA caused cell death of ECV304 cells compared to LA, AA or control as evidenced by changes in cell morphology and MTT assay. LPO levels was significantly elevated by 10 fold in DHA-treated ECV 304 cells and caspase-3 activity was increased by DHA corresponding to increasing incubation times compared to control. One of reasons of the cell death in DHA-treated ECV304 cells could be expected that caspase activity, marker for mitochondrial damages, might be triggered by the increasing LPO levels. Our results strongly indicated that DHA induced LPO production has an important role on apoptotic signaling pathway in ECV304 cells. LPO production in endothelial cells which was metabolized by oxidation of dietary PUFA, might be one of risk factors in the initial progression of atherosclerosis. (*Korean J Nutrition* 39(4): 357~365, 2006)

KEY WORDS : DHA, LA, AA, apoptosis, human endothelial ECV304 cells, caspase-3, mitochondrial damage.

#### 서 론

뇌혈관 및 심혈관 질환은 한국인의 사망률 남녀 모두에서 1위를 기록하고 있으며 2003년에는 뇌혈관 질환이 10만 명당 75.5명, 심장질환이 10만 명당 35.6명이다.<sup>1,2)</sup> 최근의 역학연구들을 바탕으로 제안되어지는 동맥경화의 위험인자들은 가족력, 비만, 음주, 흡연, 남성, 폐경, 나이, 혈중 지질농도 (cholesterol, HDL, LDL), 혈중 호모시스테인 농도의 증가, 유전자 다형성 (apolipoprotein) 및 기타 식이인자 등으로 압축되고 있다. 특히 최근 역학연구에서 직

접적인 원인으로 식이 지방산 (콜레스테롤이나 불포화 지방산)이 동맥경화 발생률에 관여하고 있음을 발표하였다.<sup>3-5)</sup>

혈중 지질 수준과 세포막의 지방산 조성을 변화시키는 식이 지방산은 에이코사노이드 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 질병과 관련되어 많은 연구가 선행되어 왔다.<sup>6,7)</sup> PUFA의 기능은 담즙으로의 콜레스테롤 분비를 증가시킴으로써 소장에서의 콜레스테롤 흡수를 저해하고, 간에서의 콜레스테롤 합성을 감소와 LDL 수용체를 상향 조절함으로써 혈장 LDL을 감소시킴으로써 동맥경화를 예방한다고 알려져 있다.<sup>8-11)</sup> PUFA 중에서도  $\omega$ -6 지방산 보다  $\omega$ -3 지방산 식이를 섭취할 때 항콜레스테롤 효과가 크다고 알려져 있으나 여전히 논란이 많다.<sup>12,13)</sup>  $\omega$ -6계열 지방산의 AA 전환은 혈소판에서의 TXA<sub>2</sub>를 증가시켜서 혈소판응집 및 혈관수축작용을 일으키는 반면  $\omega$ -3계열인 LNA, EPA 혹은 DHA를 섭취하면 PGI<sub>3</sub>와 TXA<sub>3</sub>가 AA의 대사산물로 생성되어 혈소판 응집 및 혈전성 질환

접수일 : 2006년 5월 29일

채택일 : 2006년 6월 17일

\*This work supported by the Sungshin Women's University research grants of 2003.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : mlee@sungshin.ac.kr

을 억제하기 때문에 동맥경화증을 예방할 수 있다고 알려져 있다.<sup>7,14,15)</sup> 특히, 뇌 조직에는 지방조직을 제외한 다른 어느 조직보다 지방산의 함량이 많고 그 중에서도  $\omega$ -3계의 DHA가 시냅스 막과 망막의 광수용체 바깥 체절에 많이 함유되어 있다고 알려져 있다.<sup>16,17)</sup>  $\omega$ -3지방산이 결핍된 쥐를 대상으로 한 실험에서 행동발달 정도가 정상 군에 비해 현저히 떨어졌고 DHA와 행동발달 능력사이에 양의 상관관계가 있었다고 한다.

그러나, PUFA의 과잉 권장량은 지방산의 산화적 스트레스로 생성되는 자유기 (free radical)는 LDL을 산화시키고, 동맥벽에 콜레스테롤을 부착시켜 동맥혈관을 손상시킴으로서 최종적으로는 동맥경화를 유발시킨다고 알려져 있다.<sup>18-20)</sup>  $\omega$ -3 지방산은 다른 지방산에 비해 지방산 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중결합을 지니고 있으므로 체내 외에서 산화되어 자유기와 과산화물을 생성할 가능성이 높으며 생성된 과산화물은 세포막 파괴, 지단백질의 산화, 체조직의 노화, 암 및 여러 종류의 퇴행성 질환을 일으켜 생체에 치명적인 영향을 줄 수 있다고 보고되었다. 어유가 체내에서 더 쉽게 산화되는 이유는 비타민 E 등 천연 항산화제함량이 불포화도가 높은 다른 기름 (종실유)에 비해 적기때문이다. 특히 C20 이상의 고도 불포화 지방산들은 산화작용에 더 민감하기 때문이라고 한다. 식이성 불포화지방산의 주된 과산화 생성물 형태인 MDA와 4-HNE는 세포막에서 고도 불포화 지방산과 지질 자유기가 반응하여 산소 라디칼 화합물을 생성하고, 과잉산소가 존재할 때 과산화 라디칼이 지질 과산화라고 하는 연쇄반응을 일으키게 되어 나오는 물질로써 지질 과산화물의 지표로서 많은 연구에서 널리 사용되고 있다.<sup>20,21)</sup>

Apoptosis (자가 사멸)란 조직의 기본단위인 세포가 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 능동적으로 조절하는 것으로 자가 사멸 또는 프로그램 세포 사멸이라고 한다.<sup>22)</sup> 이는 세포 내에 본래부터 존재하고 있던 자살 기작이 세포 내부와 외부의 자극에 의하여 활성화되어 계획한 대로 스스로 죽는 현상으로 세포의 괴사 (necrosis)와는 달리 죽어 가는 세포의 내용물이 세포 외로 유리되지 않아 다른 세포에 손상을 주지는 않는다. 형태학적으로는 세포의 비중 감소와 세포막의 파괴 및 염색체의 응축과 더불어 자가 사멸 체 (apoptotic body) 형성과 함께 식세포 작용을 거치는 작용을 의미하며, 생화학적으로는 염색체 DNA가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 DNA 분절을 의미한다.<sup>23)</sup> 다양한 세포사멸 신호전달체계가 있으나 caspase-3는 세포질에 존재하는 DNase를 활성화시켜 핵 내로 이동시킴으로써 염색체 DNA의 분절화를 초래케 하며 미

토콘드리아 손상에 따른 사멸체계로 볼 수 있으므로 caspase-3의 활성화도 측정은 자가사멸 정도를 파악하는데 도움이 된다.<sup>24,25)</sup>

따라서 본 연구의 목적은 인체 혈관 내피 세포(ECV304 cell)를 이용하여 지방산의 종류 (LA, DHA, AA)를 달리 처치한 후 세포증식과 심혈관 벽의 내피세포에 미치는 자가 사멸 영향을 살펴보고자 한다. 세부 목적은 1) 세포 지방산 조성의 변화, 2) 세포 증식에 있어서 과산화물 생성의 영향, 3) 생성된 과산화물의 종류에 따른 세포 증식을 변화, 4) 자가 사멸을 유발하는 기본적인 기전을 알기위해 시행하는 caspase-3 활성화도의 변화를 관찰하고자 한다.

## 대상 및 연구방법

### 1. 세포배양 및 처치

인체 혈관 내피세포 ECV304는 JCRB에서 분양받았으며 5% heat-inactivated FBS를 함유하는 DMEM 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, pH 7.2~7.4의 조건에서 배양하였다. 항생제로는 penicillin-streptomycin (10 ml/l)를 사용하였고, 세포 배양 접시에 80% 정도의 세포가 자라면 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO BRL, Ithersburg, MD U.S.A)를 처리하여 계대 배양하였으며, 실험 시에는 일정수의 세포를 배양하여 사용하였다. 계대배양은 5회 이상하지 않았다. LA, DHA, AA 각각의 지방산은 albumin 복합체로 만들어 종류별로 배지에 첨가하고, 50  $\mu$ M LPO (Calbiochem USA)은 negative control standard로 사용되었다.

### 2. 세포 형태학적 관찰

지방산과 과산화물이 처치된 세포의 형태는 AXIOVERT 25 현미경으로 관찰하였다 ( $\times$  200, ZEISS). 각 군별로 배양 시간 (12, 24, 48 h)에 따라 Dish의 배지를 제거하기 바로 직전에 현미경으로 세포형태를 관찰하였고, 현미경에 부착된 카메라 ( $\times$  200, ZEISS, CONTAX olympus)로 촬영하였다.

### 3. 세포의 증식률

96well plate에 ECV304 세포를 혈청이 포함된 배지로 균질하게 한 후  $5 \times 10^4$  cells를 각각의 well에 피펫을 이용하여 분주하였다. 24시간 배양 하였을 때 세포의 균집이 70% 정도 되었으며, 이때 배지를 제거하고 100  $\mu$ M의 LA, DHA AA와 50  $\mu$ M의 4-HNE와 MDA를 혈청이 없는 배지에 용해시켜 well에 분주하였다. 12, 24, 48시간에 걸쳐 세포를 배양한 후 MTT 시약 10  $\mu$ l (5 mg/ml in PBS)

를 첨가하고, 37°C에서 배양기에서 3시간 동안 배양한 뒤 배지를 모두 제거한 후 acid-isopropanol (0.04M in isopropanol) 100  $\mu$ l를 넣고 증류수 100  $\mu$ l를 넣어 혼합한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Paull 등이 고안한 non-radioactive 방법인 MTT의 측정 원리는 MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltriazolium bromide)가 미토콘드리아내의 dehydrogenase 활성에 의하여 분해됨으로써 대사적으로 활성 (metabolically activity)을 갖는 생세포의 수와 비례하여 formazan salt (보라색)을 생성하는 성질을 이용한 것이다.

#### 4. 지방산 조성

지방산으로 처리하고 수집된 세포 분쇄액 1 ml을 Folch<sup>26)</sup> 법에 따라 지질을 추출하였다. 추출한 지질에 methylation reagent (BF<sub>3</sub>-methanol : methanol : Benzen = 10 : 22 : 8) 7 ml 첨가하였고 Heptadecanoic acid (Sigma Co. #H-3500) 1 mg을 2,2,4-trimethyl-pentane (Sigma Co. #T-5053) 10 ml에 녹여서 internal standard로 GC (gas chromatography)의 정량 분석을 위해 200  $\mu$ l 첨가하였다. ECV304 세포의 지방산 조성은 GC (Hewlett Packard 6890 series)를 사용하여 분석하였다. 각각의 지방산의 면적은 총 지방산에 대한 면적 백분율 (area % of total fatty acid)로 계산하고, internal standard로서 사용된 Heptadecanoic acid (C17 : 0)를 기준으로 각 지방산의 함량을 구하였으며 2반복 실시한 평균을 이용하였다.

Amount of fatty acid

$$= \left( \frac{\text{Peak area of fatty acid}}{\text{Peak area of C17 : 0}} \right)$$

× Amount of C17 : 0 added during transmethylation

#### 5. 지질과산화물 (LPO) 함량 측정

지질 과산화 정도는 lipid peroxidation assay kit (Calbiochem, #437634, USA)를 이용하여 측정하였는데 식이지방산의 최종과산화물을 MDA와 4-HNE를 동시에 측정하는 방법이다. 전통적인 thiobarbituric acid (TBA) 방법에 의한 MDA의 측정법은 많은 상호물질에 의해 영향을 받고 재현성이 떨어지므로 MDA와 4-HNE 등 total LPO를 동시에 측정하였다. N-methyl-2-phenylindole과 45°C에서의 반응으로 발색하는 원리를 이용하여 spectrophotometer (Pharmacia) 586 nm에서 흡광도를 측정하여 1 mg protein 값으로 환산하였다.

#### 6. Caspase-3 activity 측정

Apo-One™ Homogeneous caspase 3/7 assay kit (Promega)를 이용하여 caspase 3/7 분해량에 따라 비례적으로 생성되는 형광물질을 detect하는 방법이다.

Homogeneous caspase 3/7 반응액과 96well에 존재하는 세포 량과 1 : 1이 되도록 처치한 후 37°C에서 4시간 이상 incubation한 다음 spectrophotometer (Pharmacia) 405 nm에서 흡광도를 측정하여 1  $\mu$ g protein에 해당하는 값으로 표기하였다.

#### 7. 단백질 정량

단백질 함량은 Bio-Rad protein assay 용액을 이용하여 Bradford법에 따라 측정하였다.

#### 8. 통계처리

본 실험에서 얻은 모든 결과는 minitab을 이용하여 평균 ± 표준편차 (mean ± SD)로 구하였고, ANOVA test 후 p < 0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의차를 나타내었다.

### 결과 및 고찰

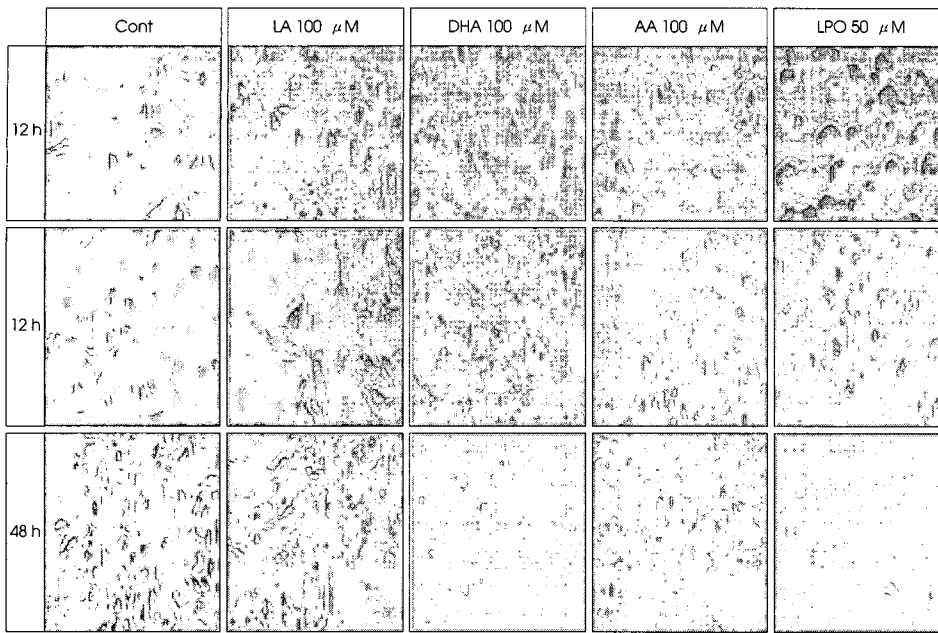
#### 1. 세포형태학적 (Cell morphology) 변화

처치된 지방산과 지질 과산화물 및 배양시간에 따른 인체 혈관 내피 세포의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군은 배양 시간이 지남에 따라 세포의 증식이 나타났고, LA와 AA처치군은 유사한 경향으로 배양시간이 증가함에 따라 자가 사멸적 세포 사멸이 나타났다. 특히 48시간 배양 후 이와 같은 현상이 뚜렷했다.

DHA 처치군은 12시간 배양 후부터 세포막이 붕괴되어 자가 사멸적 세포사멸이 뚜렷하게 나타났고, 48시간 배양 후에는 살아있는 세포가 거의 없는 것이 관찰됐다. LPO 군은 DHA군보다 세포 사멸이 심하게 나타났다.

#### 2. 세포 사망률

Table 1은 각 지방산의 배양별 세포 사망률을 살펴본 것이다. LA군과 AA군은 12시간 배양시에는 농도가 증가함에 따라 세포 사망률이 유의적으로 감소하였고 (p = 0.004) DHA군은 50  $\mu$ M보다는 100  $\mu$ M의 세포 사망률이 증가했으나 유의적인 차이가 없었다. 배양시간에 따른 지방산 종류별 세포사망률의 차이는 12시간에는 200  $\mu$ M, 24시간에는 100  $\mu$ M, 48시간에는 50  $\mu$ M농도에서 DHA > AA > LA순으로 사망률이 유의적으로 증가하였다 (Table 2). Terano 등의 연구에서  $\omega$ -6 지방산과  $\omega$ -3 지방산은 둘 다 평활근 세포의 증식을 저해하고, 특히 EPA와 DHA



**Fig 1.** The changes of ECV304 cell morphology in 100 μM LA, AA and DHA at different incubation times compared to LPO 50 μM as the positive control.

**Table 1.** Effect of various fatty acids on dose- and time-dependent cell death in ECV304 cells (% of control<sup>1)</sup>)

		12 h	24 h	48 h	p-value <sup>2)</sup>
50 μM	LA	-11.2 ± 2.7	-1.6 ± 3.2	-10.3 ± 6.9 <sup>a,3)</sup>	NS
	AA	6.8 ± 8.4	3.5 ± 27.5	16.8 ± 8.7 <sup>b</sup>	NS
	DHA	-4.4 ± 5.3	27.0 ± 4.7	14.0 ± 14.5 <sup>b</sup>	*
100 μM	LA	-20.3 ± 4.4	-18.3 ± 12.9 <sup>a</sup>	0.2 ± 25.8	NS
	AA	-15.2 ± 9.0	9.0 ± 6.1 <sup>b</sup>	5.2 ± 13.4	*
	DHA	-12.6 ± 18.8	9.7 ± 9.4 <sup>b</sup>	13.3 ± 19.6	NS
200 μM	LA	-38.1 ± 9.0 <sup>a</sup>	-14.3 ± 5.8	-16.8 ± 26.2	NS
	AA	-28.3 ± 8.9 <sup>a</sup>	-2.5 ± 6.7	-8.6 ± 20.6	NS
	DHA	-11.3 ± 8.7 <sup>b</sup>	48.5 ± 65.7	26.4 ± 9.5	NS

<sup>1)</sup> value are expressed mean ± SD (NS: non-significant)

<sup>2)</sup> p-values for the significance among the incubation time at each concentration of various fatty acids (\*: p < 0.05)

<sup>3)</sup> a, b, c values within incubation time of fatty acids groups with different superscripts are significant at p < 0.05

는 세포주기에서 휴지기로부터 간기로 진행되는 과정을 저해한다고 했다.<sup>26)</sup> 이러한 효과는 세포 안에 있는 지질과산화물의 양과 관련이 있다고 Cornwell DG 등은 보고했다.<sup>27)</sup> 본 연구에서도 DHA ( $\omega-3$ )의 경우 세포의 증식이 저해되었으나 LA ( $\omega-6$ )의 경우는 세포의 증식이 저해되지 않았고 AA ( $\omega-6$ )의 경우 DHA보다 저해효과가 낮기는 하지만 세포의 증식이 저해되었다. 반면 LPO를 50 μM, 100 μM, 200 μM를 각각 ECV304 cell에 처치한 결과, 대조군에 비하여 LPO 50 μM는 12 hr, 24 hr, 48 hr 배양시간이 증가할수록 -2.1, 6, 20%로, LPO 100 μM은 8, 19, 45%로 LPO 200 μM 은 10, 41, 69%로 세포 사망률이 유의적으로 증가하였다(Fig. 2).

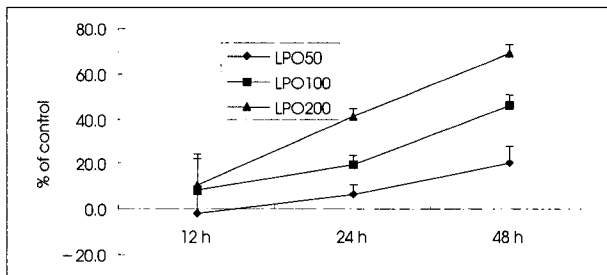
### 3. 지방산 조성

ECV304 세포는 모든 시간대에서 pamic acid (C16 : 0)과 stearic acid (C18 : 0)이 총 지방산의 80%를 차지했다. 배양시간에 따른 각군 별 LA, AA, DHA 각각의 유입율을 살펴보면 12시간 배양시 LA의 유입율은 LA군과 대조군이 유사하고 DHA군에서는 측정되지 않았으며 AA 군은 대조군보다 4.7배 유입율이 높았다 (Table 2). AA의 유입율을 살펴보면 LA와 AA군에서는 측정되지 않았고, DHA와 AA군이 유사하였다. DHA의 유입율은 LA군에서는 측정되지 않았으며, DHA군은 대조군에 비해 30배 가량 유입율이 증가하였고, AA군에서는 대조군보다 유입율이 낮게 측정되었다.

24시간 배양 후 지방산 조성을 분석해 보면 LA의 유입

**Table 2.** Fatty acid composition of ECV304 cell after 12 hrs of incubation with different fatty acids

Fatty acids	Cont mg/ml (%)	LA 100 $\mu$ M mg/ml (%)	DHA 100 $\mu$ M mg/ml (%)	AA 100 $\mu$ M mg/ml (%)
C14 : 0	6.25 ( 7.17)	4.77 ( 7.77)	4.60 ( 6.23)	0.96 ( 1.73)
C16 : 0	42.12 ( 46.46)	29.93 ( 48.74)	31.35 ( 42.47)	21.36 ( 38.38)
C18 : 0	31.70 ( 34.97)	22.39 ( 36.46)	30.03 ( 40.68)	24.71 ( 44.40)
C18 : 1	2.05 ( 2.26)	0.65 ( 1.06)	0.57 ( 0.77)	1.97 ( 3.54)
C18 : 2	0.28 ( 0.31)	0.21 ( 0.34)	0.0 ( 0.00)	0.82 ( 1.47)
C18 : 3 ( $\omega$ -6)	0.26 ( 0.29)	0.21 ( 0.34)	0.0 ( 0.00)	0.82 ( 1.47)
C18 : 3 ( $\omega$ -3)	0.14 ( 0.15)	0.14 ( 0.23)	0.0 ( 0.00)	0.05 ( 0.09)
C20 : 0	0.35 ( 0.39)	0.18 ( 0.29)	0.17 ( 0.23)	3.29 ( 5.91)
C20 : 1	3.95 ( 4.36)	2.11 ( 3.44)	0.62 ( 0.84)	0.18 ( 0.32)
C20 : 2	0.61 ( 0.67)	0.22 ( 0.36)	0.0 ( 0.00)	0.18 ( 0.32)
C20 : 3 ( $\omega$ -6)	1.21 ( 1.33)	0.38 ( 0.62)	0.0 ( 0.00)	0.11 ( 0.20)
C20 : 3 ( $\omega$ -3)	0.36 ( 0.40)	0.0 ( 0.00)	0.82 ( 1.11)	0.21 ( 0.38)
C20 : 4	0.0 ( 0.00)	0.22 ( 0.36)	0.0 ( 0.00)	0.24 ( 0.43)
C20 : 5	0.2 ( 0.22)	0.0 ( 0.00)	0.24 ( 0.33)	0.43 ( 0.77)
C22 : 0	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)
C24 : 0	0.69 ( 0.76)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.27 ( 0.49)
C22 : 6	0.23 ( 0.25)	0.0 ( 0.00)	5.42 ( 7.34)	0.05 ( 0.09)
Total	90.65 (100.00)	61.41 (100.00)	73.82 (100.00)	55.65 (100.00)
P/S	0.12	0.07	0.12	0.1
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	0.53	0.14	6.48	0.37



**Fig 2.** Dose and time dependent cell death in LPO-treated ECV 304 cells compared to control. Data were expressed as mean percentage of control. Cell death was significantly ( $p < 0.05$ ) increased with LPO concentration dependent manner at each incubation time.

율은 LA군이 대조군보다 8배가량 유입률이 증가했고, DHA 군과 AA군은 대조군과 비슷하였다 (Table 3). AA의 유입율을 살펴보면 대조군과 DHA군에서는 측정되지 않았고, AA군에 비해 LA군에서 3.7배 가량 높게 측정되었다. 이는 LA가 AA로 합성되는 비율이 다른 지방산 처치군 보다 높으므로 DHA군과의 차이는 에이코사노이드 대사의 변화에 따른 효과로도 해석할 수 있겠다. DHA의 유입율을 살펴보면 DHA 처치군 에서만 총 지방산량의 1.88% 가량 측정되었고, 다른 군에서는 측정되지 않았다.

48시간 배양 후 지방산 조성의 변화는 Table 4와 같다. LA의 유입율은 LA군은 대조군보다 2.7배가량 증가했고,

DHA군은 대조군과 비슷하였으며 AA군은 대조군보다 낮았다. AA의 유입율은 모든 처치군이 대조군보다 낮은 유입율을 보였다. DHA의 유입율은 DHA에서만 총 지방산량의 0.16% 가량 측정되었고, 다른 군에서는 측정되지 않았다.

포화지방산과 다가 불포화 지방산의 비율 (P/S)과  $\omega$ -3 지방산과  $\omega$ -6 지방산 조성비율도 Table 3~5에 나타내었다. 12시간 배양 후 불포화 : 포화 지방산 (P/S)의 비율이 대조군 0.12에 비해 LA군은 0.07로 감소하였고, DHA군과 AA군은 0.12과 0.1로 대조군과 비슷했다. 24시간 배양 시는 P/S 비율이 대조군 0.14 비해 LA군은 0.28로 2배가량 증가하였는데 이것은  $\omega$ -6 지방산, 특히 LA의 유입율이 증가했기 때문이다. DHA군은 0.14였고, AA군은 0.09로 대조군과의 차이가 없었다. 48시간 배양 시에는 P/S 비율이 대조군 0.37에 비해 LA군은 0.21, DHA군은 0.09, AA군은 0.08로 대조군보다 모두 낮았다. 이것은 ECV304세포에 CLA (C20 : 1 cis 10, cis 12)가 증가했기 때문으로 보여진다.  $\omega$ -3/ $\omega$ -6는 12시간에서 대조군이 0.53, LA군 0.14, DHA군 6.48, AA군 0.37로 DHA군은 대조군에 비해 12배 높았다. 이것은 12시간 배양 후  $\omega$ -3 지방산, 특히 DHA의 유입율이 증가했기 때문이며, LA군과 AA군은  $\omega$ -6 지방산이 많이 유입되었기 때문이 비율이 낮게 나타났다. 24시간에는  $\omega$ -3/ $\omega$ -6의 비율이

**Table 3.** Fatty acid composition of ECV304 cell after 24 hrs of incubation with different fatty acids

Fatty acids	Cont mg/ml (%)	LA 100 $\mu$ M mg/ml (%)	DHA 100 $\mu$ M mg/ml (%)	AA 100 $\mu$ M mg/ml (%)
C14 : 0	6.3 ( 9.06)	2.6 ( 2.60)	2.8 ( 6.59)	4.9 ( 5.30)
C16 : 0	33.9 ( 8.78)	37.7 ( 37.66)	20.1 ( 47.29)	48.4 ( 52.38)
C18 : 0	20.4 ( 29.35)	35.5 ( 35.46)	15.0 ( 35.29)	31.1 ( 33.66)
C18 : 1	2.6 ( 3.74)	4.8 ( 4.80)	0.8 ( 1.88)	4.0 ( 4.33)
C18 : 2	0.3 ( 0.43)	3.5 ( 3.50)	0.2 ( 0.47)	0.4 ( 0.43)
C18 : 3 ( $\omega$ -6)	0.1 ( 0.14)	0.4 ( 0.40)	0.0 ( 0.00)	0.1 ( 0.11)
C18 : 3 ( $\omega$ -3)	0.2 ( 0.29)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.47)	0.0 ( 0.00)
C20 : 0	0.3 ( 0.43)	0.5 ( 0.50)	0.2 ( 0.47)	0.1 ( 0.11)
C20 : 1	4.8 ( 6.91)	10.9 ( 10.89)	2.1 ( 4.94)	3.0 ( 3.25)
C20 : 2	0.1 ( 0.14)	0.5 ( 0.50)	0.2 ( 0.47)	0.1 ( 0.11)
C20 : 3 ( $\omega$ -6)	0.1 ( 0.14)	0.3 ( 0.30)	0.0 ( 0.00)	0.1 ( 0.11)
C20 : 3 ( $\omega$ -3)	0.1 ( 0.14)	0.4 ( 0.40)	0.1 ( 0.24)	0.0 ( 0.00)
C20 : 4	0.0 ( 0.00)	0.8 ( 0.80)	0.0 ( 0.00)	0.2 ( 0.22)
C20 : 5	0.2 ( 0.29)	0.7 ( 0.70)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)
C22 : 0	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)
C24 : 0	0.1 ( 0.14)	1.5 ( 1.50)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)
C22 : 6	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.8 ( 1.88)	0.0 ( 0.00)
Total	69.5 (100.00)	100.1 (100.00)	42.5 (100.00)	92.4 (100.00)
P/S	0.14	0.28	0.14	0.09
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	1.00	0.22	9.90	0.012

**Table 4.** Fatty acid composition of ECV304 cell after 48 hrs of incubation with different fatty acids

Fatty acids	Cont mg/ml (%)	LA 100 $\mu$ M mg/ml (%)	DHA 100 $\mu$ M mg/ml (%)	AA 100 $\mu$ M mg/ml (%)
C14 : 0	4.3 ( 3.36)	5.9 ( 7.87)	2.2 ( 3.55)	9.8 ( 9.17)
C16 : 0	52.9 ( 41.36)	37.0 ( 79.33)	35.9 ( 57.90)	57.0 ( 53.32)
C18 : 0	35.1 ( 27.44)	19.0 ( 25.33)	18.7 ( 30.16)	31.2 ( 29.19)
C18 : 1	14.1 ( 11.02)	5.4 ( 7.20)	2.0 ( 3.23)	3.0 ( 2.81)
C18 : 2	0.5 ( 0.39)	0.8 ( 1.07)	0.2 ( 0.32)	0.2 ( 0.19)
C18 : 3 ( $\omega$ -6)	0.0 ( 0.00)	0.2 ( 0.27)	0.1 ( 0.16)	0.2 ( 0.19)
C18 : 3 ( $\omega$ -3)	0.0 ( 0.00)	0.4 ( 0.53)	0.2 ( 0.32)	0.1 ( 0.09)
C20 : 0	1.8 ( 1.41)	0.3 ( 0.40)	0.0 ( 0.00)	0.3 ( 0.28)
C20 : 1	16.2 ( 12.67)	4.9 ( 6.53)	1.9 ( 3.06)	4.2 ( 3.93)
C20 : 2	0.2 ( 0.16)	0.3 ( 0.40)	0.3 ( 0.48)	0.2 ( 0.19)
C20 : 3 ( $\omega$ -6)	0.0 ( 0.00)	0.4 ( 0.53)	0.1 ( 0.16)	0.2 ( 0.19)
C20 : 3 ( $\omega$ -3)	0.3 ( 0.23)	0.1 ( 0.13)	0.1 ( 0.16)	0.0 ( 0.00)
C20 : 4	0.4 ( 0.31)	0.1 ( 0.13)	0.1 ( 0.16)	0.1 ( 0.09)
C20 : 5	0.6 ( 0.47)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)
C22 : 0	0.7 ( 0.55)	0.1 ( 0.13)	0.0 ( 0.00)	0.2 ( 0.19)
C24 : 0	0.8 ( 0.63)	0.1 ( 0.13)	0.1 ( 0.16)	0.2 ( 0.19)
C22 : 6	0.0 ( 0.00)	0.0 ( 0.00)	0.1 ( 0.16)	0.0 ( 0.00)
Total	127.9 (100.00)	75 (100.00)	62 (100.00)	106.9 (100.00)
P/S	0.37	0.21	0.09	0.08
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	1.00	0.33	0.80	0.14

대조군 1.00, LA군 0.22, DHA군은 9.90, AA군은 0.012 였다. DHA군은 대조군에 비해 9.9배 비율이 높았고, LA 군은 12시간에 비해 비율이 낮아졌다. 이것은 LA군의 LA 유입률이 증가했기 때문 때문이다. 48시간에서는 모든 처 치군에서 대조군보다  $\omega-3/\omega-6$ 의 비율이 낮았다.

결론적으로 1) ECV304 세포의 80% 이상을 차지하는 것은 palmitic acid (C16 : 0)와 stearic acid (C18 : 0)이다. 2) 세포내 지방산 조성 중에서 LA, DHA, AA 처치군은 각각 처치한 지방산의 세포내 유입이 잘 이루어졌다. 3) LA는 24시간 배양 후에 유입율이 대조군의 8배로 가장 높았고, DHA는 12시간 배양 후에 유입율이 대조군의 30배로 가장 높았다. 3) 모든 시간대에서 세포내 지방산의 조성 중 LA군은 LA의 비율이 가장 높았고, DHA군에서의 DHA 비율이 가장 높았고, AA군은 AA의 비율이 가장 높았다. 4) 3)의 결과는 P/S 비율과  $\omega-3/\omega-6$ 의 비율에 영향을 준다. 즉 LA군이 DHA군에 비해서 P/S 비율이 12시간을 제외하고는 모두 높았으며, 모든 시간대에서 LA군이 DHA군에 비해서  $\omega-3/\omega-6$  비율이 낮은 것을 알 수 있었다.

**4. 지질 과산화물 함량**

지질 과산화물은 암화과정에서 유리기를 생성하여 DNA 의 single-strand breaks를 일으키고 DNA와 단백질과의 상호결합도 촉진한다.<sup>28)</sup> 암 촉진단계에서 이런 유전적 손상 부위가 늘어나고 유전적으로 불안정한 상태가 지속되면 악성암으로의 전환 확률은 높아진다고 보고되고 있다. 처 치된 지방산의 종류에 따른 LPO 생성결과를 살펴보면 12 시간 배양시 DHA군에서 생성이 대조군보다 10배 증가하여 가장 높았으며 (Table 5) LA군과 AA군은 대조군과 비슷한 량의 과산화물을 생성했다. 24시간 배양시 DHA군 에서 대조군보다 2.7배 증가하여 가장 높았으며, LA군과 AA군은 대조군과 비슷했다. 48시간 배양했을 때는 12시간 배양했을 때와 비슷한 경향으로 DHA군이 대조군보다

10배 증가하였다. 이것은  $\omega-6$  지방산에 비해  $\omega-3$  지방 산을 섭취할 경우 cis형의 불안정한 이중 결합과 지방산 자체의 불포화도로 인해 자유 라디칼과 과산화물 등의 지 질과산화물이 더욱 많이 생성되어 세포에 손상을 초래했기 때문으로 본다.

또한 최종과산화물인 LPO 50  $\mu$ M를 직접 혈관내피세포에 처치한 후 LPO 생성결과를 살펴보면 12시간 배양 시 대조군의 30배, 24시간 배양 시는 10배, 48시간 배양 시는 25배로 각각 증가했다. 이는 조 등의 연구와 같이  $\omega-3$  지방산 중에서도 EPA와 DHA가 풍부한 어유식이 에서 과산화물이 더 많이 생성되었다고 보고와 유사하다.<sup>29)</sup> 장 등의 연구에서는 어유식은 다른 식이에 비해 식이 자체 내 과산화물량이 많으며 이러한 식이 자체 내의 지질 과산화물은 간으로 들어가 축적되고 혈액으로 분비되지 않으므로써 간 내 과산화물함량이 많아지는 것이라 보고 있다.<sup>30)</sup> 본 실험에서도 LA나 AA군에 비해 DHA군에서 지 질 과산화물 생성이 증가하였다.

**5. Caspase-3 활성도 측정**

배양시간에 따른 결과를 살펴보면 LA군은 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 감소하였고, AA군과 DHA 군은 24시간 배양 시 12시간에 비해 caspase-3 활성도가 다소 감소하긴 하였지만, 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하는 경향을 보였다. LPO군은 배 양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하는 경향 을 보였지만 유의적이지는 않았다. 12시간 배양시 DHA군 은 caspase-3 활성이 LA군과 AA군에 비해 1.3배, 24시간 배양 시 1.4배, 48시간 배양 시 LA 처치군에 비해서는 3배, AA 처치군에 비해서는 1.6배 가량 caspase-3 활성도가 높았으며 유의적인 값을 나타냈다(Table 6).

Arita 등은 인체 백혈병세포 (HL-60 cell: human promyelocytic leukemia cells)에 AA, EPA, DPA를 60  $\mu$  M로 처치 했을때 caspase-3 활성도가 EPA > DPA > AA

**Table 5.** Effect of various fatty acids on the LPO production in ECV304 cells compared to LPO 50  $\mu$ M as the positive control ( $\mu$ M/1 mg protein<sup>1)</sup>)

	12 h	24 h	48 h	p-value <sup>2)</sup>
Cont	<sup>z</sup> 3.9 ± 0.4 <sup>c</sup>	<sup>y</sup> 4.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	<sup>x</sup> 5.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	*
LA 100 $\mu$ M	<sup>z</sup> 4.0 ± 0.3 <sup>c</sup>	<sup>y</sup> 3.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	<sup>x</sup> 2.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	*
DHA 100 $\mu$ M	<sup>y</sup> 35.9 ± 12.9 <sup>b</sup>	<sup>x</sup> 11.5 ± 8.0 <sup>b</sup>	<sup>x</sup> 49.5 ± 15.9 <sup>b</sup>	NS
AA 100 $\mu$ M	<sup>z</sup> 3.0 ± 0.3 <sup>c</sup>	<sup>y</sup> 3.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	<sup>x</sup> 11.2 ± 1.2 <sup>b</sup>	**
LPO 50 $\mu$ M	<sup>y</sup> 97.6 ± 38.8 <sup>c</sup>	<sup>x</sup> 46.2 ± 12.3 <sup>c</sup>	<sup>x</sup> 129.9 ± 29.5 <sup>c</sup>	*
p-value <sup>3)</sup>	**	**	**	

<sup>1)</sup> values are expressed mean ± S.D (NS: non-significant data)

<sup>2)</sup> x, y, z values within the treated types of fatty acids groups with different superscripts are significant (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01)

<sup>3)</sup> a, b, c values with in incubation time of fatty acids groups with different superscripts are significant (\*\*: p < 0.01)

**Table 6.** Dose- and time-dependent caspase-3 activities compared to the positive control LPO 50  $\mu$ M in fatty acids treated ECV304 cells (pnmol/pNA/hour/ $\mu$ g protein<sup>1</sup>)

	12 h	24 h	48 h	p-value <sup>2</sup>
LA 100 $\mu$ M	<sup>x</sup> 24.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	<sup>y</sup> 20.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 16.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	*
DHA 100 $\mu$ M	<sup>x</sup> 32.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	<sup>y</sup> 28.9 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	<sup>z</sup> 53.0 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	**
AA 100 $\mu$ M	<sup>x</sup> 21.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	<sup>y</sup> 19.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	<sup>z</sup> 32.7 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	**
LPO 50 $\mu$ M	<sup>y</sup> 56.4 $\pm$ 24.9 <sup>b</sup>	<sup>y</sup> 53.3 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	<sup>y</sup> 66.3 $\pm$ 14.9 <sup>d</sup>	NS
p-value <sup>3</sup>	NS	**	**	

<sup>1</sup>values are expressed mean  $\pm$  S.D (NS: non-significant data)

<sup>2</sup>x, y, z values within the treated fatty acids groups with different superscripts are significant (\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01)

<sup>3</sup>a, b, c values within incubation time of fatty acids with different superscripts are significant (\*\*: p < 0.01)

순으로 높았다.<sup>31)</sup> 즉  $\omega$ -3 지방산이  $\omega$ -6 지방산보다 caspase-3 활성도 및 미토콘드리아에서 세포질로 분비되는 Cytochrom C의 양이 많으므로 자가 사멸로 잘 유도된다고 하였다. Turner 등은 쥐 결장세포 (YAMC: immortalized young adult mouse colon cell)에서 50  $\mu$ M의 LA와 DHA를 처리했을 때 LA와는 달리 DHA군에 caspase-3 활성도가 증가했다고 하였다.<sup>32)</sup> QN 등은 평활근 세포에서 고농도의 (40~80  $\mu$ M/L)의 DHA가 caspase-3 활성을 유도하고, 자가 사멸의 구조적 특징인 핵융합을 시작한다고 하였고, DHA와 EPA가 p38의 활성화기에 의해 자가 사멸을 유도한다고도 하였다.<sup>33,34)</sup> Igrashi 등은 DHA와 EPA가 종양세포에서 지질과산화물에 의해 apoptosis를 시작한다고도 하였다.<sup>35)</sup> Sylvania 등은 뇌의 해마 세포 (hippocampal cell)에서 LPO로 인한 세포사멸 과정에서 caspase-3가 활성화된다고 하였다.<sup>36)</sup>

본 연구에서는 LA, DHA, AA 처리군 모두 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하였고, 위의 선행 연구와 같이 본 연구에서도 DHA 처리군은 다른 군에 비해 caspase-3 활성도가 1.5~3배정도 높았다. Sylvania 등의 연구와 같이 LPO군은 모든 시간대에서 caspase-3 활성도가 가장 높았다.<sup>36)</sup>

## 요약 및 결론

본 연구는 인체 혈관내피세포 (ECV304 cell)에 지방산의 종류 (LA, DHA, AA)를 달리 처리한 후 세포독성과 심혈관벽의 내피세포에 미치는 apoptosis 영향을 살펴보고자 세포독성 및 세포 형태학적 변화, 지질과산화물 함량, 세포막의 지방산조성, caspase-3 활성도 등을 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1) 12시간 배양에서는 200  $\mu$ M, 24시간에는 100  $\mu$ M, 48시간에는 50  $\mu$ M농도에서 DHA > AA > LA순으로 사망률이 유의적으로 증가하여 DHA군이 농도와 시간에 비해

하여 apoptosis 변화가 나타났다.

2) LA, DHA, AA처리군은 각각 처리한 지방산의 세포 내 유입이 잘 이루어졌으며 LA는 24시간 배양 후 대조군보다 8배, DHA는 12시간 배양 후 대조군보다 30배 가량 높았다. 따라서 지방산 처리 군에 따라 세포내 지방산의 분포도 변화되었으며 P/S 비율과  $\omega$ 3/ $\omega$ 6의 비율도 영향을 받는다.

3) DHA군에서 과산화물 생성이 대조군보다 10배 증가하여 가장 높았으며 LA군 군과 AA군은 대조군과 비슷하여  $\omega$ -3 지방산이  $\omega$ -6 지방산보다 혹은 불포화도가 높은 순으로 과산화물 생성이 증가함을 보여주었다.

4) 미토콘드리아 병변에 의한 apoptosis지표인 caspase-3 활성도에서도 DHA군은 다른 군에 비해 caspase-3 활성도가 1.5~3배 정도 높았으며 LPO군의 50%에 이르렀다.

결론적으로  $\omega$ -3계열 지방산 특히 고도불포화지방산으로 항 동맥경화 및 항암효과가 있는 것으로 알려진 DHA는 다른 지방산에 비해 지방산 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중결합을 지니고 있어서 과산화물이 많이 생성되었다. 생성된 과산화물질이 미토콘드리아를 손상시켜 caspase-3 활성도를 높임으로서 ECV 304 세포의 자가 사멸을 유발시켰다. 따라서 고농도의 DHA는 LA와 AA 보다 혈관 내피세포의 자가 사멸을 유도하여 결과적으로는 동맥경화의 원인이 될 것으로 예상된다. 이와 같은 결과는 식사성 스트레스 인자에 의한 동맥경화 예방의 기초 자료로 제공될 수 있다.

## Literature cited

- 1) 보건복지부. 1996-1998
- 2) 통계청. 1998 & 2003.
- 3) Oh HH, Mun HJ, Lee MY. Effect of CLE (Conjugated Linoleic Acid) on the Anti-atherosclerotic Factor in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Korean J Nutrition* 37 (3): 82-192, 2004
- 4) Kim WS, Kim YS. Paraoxonase Polymorphism as a New



- Genetic Maker of Atherosclerosis. *Journal of the Geological Society of Korea* 6(2) : 81-86, 1996
- 5) Yang SJ, Kim OY, Kwon SJ, Lee JH, Jung NS, Lee HC, Huh KB. Influence of alcohol consumption and smoking habits on cardiovascular risk factors and antioxidant status in healthy men. *Korean J of Medicine* 56(4) : 437-449, 1999
  - 6) 이명숙. 질병과 지단백질, In: *아포지단백질대사*, pp.205-245, 효일출판사, 2000
  - 7) Salem N Jr, Pawlosky R and Hibbein WJ. In vivo conversion of linoleic acid to arachidonic acid in human adults. *Prostaglandin Leukotriens and Essential Fatty Acids* 60(586) : 407-410, 1999
  - 8) Smit MJ, Verkade HJ, Havinga R, Vonk RJ, Scherphof GL, In't Veld G, Kuipers F. Dietary fish oil potentiates bile acid-induced cholesterol secretion into bile in rats. *J Lipid Res* 33: 77-88, 1992
  - 9) Woollet LA, Spady DK, Dietschy JM. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J Lipid Res* 33: 77-88, 1992
  - 10) Tripody A, Loria P, Dilengite MA, Carulli N. Effect of fish oil and coconut oil diet on the LDL receptor activity of rat liver plasma membrane. *Biochem Biophys Acta* 1083: 293-334, 1991
  - 11) Huff MW, Telford DE, Edmonds BW, McDonald CG, Evans AJ. Lipoprotein lipase, lipoprotein density gradient profile and LDL receptor activity in miniature pigs fed fish oil and corn oil. *Biochem Biophys Acta* 1210: 113-122, 1993
  - 12) Spady DK. Regulatory effects of individual n-3 polyunsaturated fatty acids on LDL transport in the rat. *J Lipid Res* 34: 1337-1346, 1993
  - 13) 이명숙. 한국인의 지질권장량, In: *아포지단백질대사*, pp.257-307, 효일출판사, 2000
  - 14) Omega-3 fatty acids: Epidemiological aspects of  $\omega$ -3 fatty acids, In: *Handbook of Lipid in Human Nutrition*, pp.75-99, CRC press, 1996
  - 15) Meade EA et al. Prostaglandin and related compounds: Lipid messenger with any actions, In: *Lipid Second Messenger*, Bell RM, Exton JH and Prescott SM, pp.285-299, Plenum Press, New York 1996
  - 16) Salem N Jr, Litman B, Kim HY, Gawrisch K. Mechanism of action of DHA in nervous system. *Lipid* 36(9) : 945-959, 2001
  - 17) Moriguchi T, Loewke J, Garrison M, Catalan CJ, Salem N Jr. Reversal of DHA deficiency in the rat brain, retina, liver and serum. *J of Lipid Research* 42: 429-427, 2001
  - 18) Napolitano M, Bravo E, Avella M, Chico Y, Ochoa B, Botham KM, Rivabene R. The fatty acid composition of chylomicron remnants influences their propensity to oxidate, Nutrition. *Metabolism and Cardiovascular Diseases* 14(5) : 241-247, 2004
  - 19) Thomas SR, Stocker R. Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: Implications for atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(12) : 1795-1805, 2000
  - 20) Schneider et al. Two distinct pathways of formation of 4-HNE. *JBC* 276(24) : 20831-20838, 2001
  - 21) Easterbauer H et al. Chemistry and biochemistry of 4-HNE, MDA and related aldehyde. *Free Radic Bio Med* 11: 81-128, 1991
  - 22) Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449, 1995
  - 23) Lee CH, Chung MC, Lee HJ, Kho YH. An apoptosis regulator isolated from petasites japonicum. *Korean J Food Sci Technol* 32(2) : 448-453, 2000
  - 24) Jaruga E, Sokal A, Chrul S, Bartosz Z. Apoptosis-independent alteration in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp Cell Res* 245: 303-312, 1998
  - 25) Xiaoling Qu, Leuting Qing. Abrin Induces HeLa Cell Apoptosis by Cytochrome c Release and Caspase Activation. *J Bio & Molecular Biology* 37(4) : 445-453, 2004
  - 26) Terano T, Shiina T, Yamamoto K, Ban T, Hirai A, Tamura Y, Saito Y, Kitagawa M. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit DNA synthesis through inhibiting cdk 2 kinase in vascular smooth muscle cells. *Ann NY Acad Sci* 811: 369-377, 1997
  - 27) Cornwell DG, Hutter JJ, Milo GE, Panganamala RV, Sharma HM, Geer JC. Polyunsaturated fatty acids, vitamin E and the proliferation of aortic smooth muscle cells. *Lipids* 14: 194-207, 1979
  - 28) Hartley JA, Gibson NW, Qwelling LA, Yuspa SH. The association of DNA strand breaks with accelerated terminal differentiation in mouse epidermal cells exposed to tumor promoters. *Cancer Res* 45: 4864-4871, 1985
  - 29) Choi YS, Cho SH, Im JK. Lipid peroxidation and Vitamins E and A Levels in Tissues of Rat Fed Fish Oil or Soybean Oil Supplemented with Vitamin E. *Korean J Nutrition* 28(10) : 967-975, 1995
  - 30) Jang SD, Rho SN. Effect of Dietary perilla Seed Oil on Lipid Metabolism in Rat. *Korean J Nutrition* 24(5) : 408-419, 1991
  - 31) Kayo Arita, Hirotsugu Kobuchi, Toshihiko Utsumi, Yoshiki Takehara, Jitsuo Akiyama, Alan A Horton, Kozo Utsumi. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochemical Pharmacology* 62: 821-828, 2001
  - 32) Nancy D Turner, Jianhu Zhang, Laurie A Davidson, Joanne R Lupton, Robert S Chapkin. Oncogenic ras alters sensitivity of mouse colonocytes to butyrate and fatty acid mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Letters* 186: 29-35, 2002
  - 33) Diep QN, Intengan HD, Schiffrin EL. Endothelin-1 attenuates  $\omega$ 3 fatty acid-induced apoptosis by inhibition of caspase-3. *Hypertension* 35: 287-291, 2000
  - 34) Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxysome proliferator-activated receptor- $\alpha$  ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p-38 mitogen-activated protein kinase. 36: 851-855, 2000
  - 35) Igarashi M, Miyazawa T. Do conjugated eicosapentaenoic acid and conjugated docosahexaenoic acid induce apoptosis via lipid peroxidation in cultured human tumor cell? *Biochem Biophys Res Commun* 270: 649-656, 2000
  - 36) Sylvia A Rabacchi, Wilma J Friedman, Michael L, Shelanski, Carol M Troy. Divergence of the apoptotic pathways induced by 4-hydroxynonenal and amyloid  $\beta$ -protein. *Neurobiology of Aging* 25: 1057-1066, 2004