

식이불포화지방산을 섭취한 Apo E KO Mice에서의 녹차의 항동맥경화억제 효과

김 효 숙 · 이 명 숙[§]

성신여자대학교 식품영양학과, 비만과학연구소

Anti-atherosclerotic Effect of Green Tea in Polyunsaturated Fatty Acids-treated Apo E KO Mice

Kim, Hyo-Sook · Lee, Myoungsook

Food and Nutrition and Research Institute of Obesity Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

ABSTRACT

Dietary fatty acids are under intense research to identify anti-atherogenic mechanisms, so we investigated green tea powder (GT) as a protector against atherogenesis originating from lipid peroxidation such as 4-hydroxynonemal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA) in different dietary fatty acid-treated apo E KO mice. Growth rate and dietary efficiency were lower in apo E KO mice with or without LA compared to wild type. Plasma total cholesterol (TC) and triacylglycerol (TG) did not correspond to values in other tissues, but TG in heart tissue decreased significantly by GT after linoleic acid (LA) or docosahexaenoic acid (DHA) was administered. LA induced apoptosis as evidenced by changes in aorta morphology and immunohistochemistry. Lipid peroxides (LPO) was increased in apo E KO mice with or without LA corresponding to the accumulation of 4-HNE or MDA in the proximal aorta above the atria. GT consumption tended to reduce the primary causal mechanism of atherogenic phenomena such as oxidizability in both LA and DHA treated atherogenic mice. A high polyunsaturated fatty acids (PUFA) diet involved the changes on stress-induced apoptotic signaling by increasing caspase 3, cytochrome c, and nuclear factor- κ B in the heart tissue, but decreasing the bcl-2 protein. However, GT remarkably reduced the expression of apoptotic signaling, in contrast to the PUFA diet. Therefore, the potential of GT as an anti-atherosclerotic dietary antioxidant was tested in this study. (Korean J Nutr 2011; 44(6): 465 ~ 473)

KEY WORDS: green tea, antiatherosclerosis, 4-HNE, aorta morphology, apoptosis.

서 론

2008년 통계청 '사망원인 통계결과'에 의하면 인구 10만 명 당 사망자수의 원인으로 심혈관계 질환이 여전히 남녀 모두에서 한국인 사망률에 직접적인 원인이 되고 있다.¹⁾ 순환기계 질환의 발병은 비정상적인 지질대사가 주요 위험인자 중의 하나이며, 식이 지방의 종류가 혈장 지질 농도에 중요한 결정인자가 된다고 알려져 왔다. 최근의 역학연구들을 바탕으로 제안되고 있는 동맥경화의 위험인자들은 가족력, 비만, 음주, 흡연,

혈중 지질농도 및 기타 식이인자 등으로 압축되고 있으며 특히 혈중 저밀도 지단백질 (low-density lipoprotein, LDL)의 농도 증가가 가장 중요한 발병요인으로 알려져 있다.²⁻⁵⁾ 뿐만 아니라 최근의 역학연구에서 직접적인 원인으로 식이 지방산이 동맥경화 발병률에 관여하고 있음을 발표하였다.^{6,7)} 고지방 식이로부터 유래된 콜레스테롤은 과량의 LDL로 전환되어 혈관세포에서 발생하는 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROSs)에 의해 산화 LDL을 형성한다. 이들에 의해 유도된 대식세포는 산화된 LDL를 탐식하여 foam cell을 형성하고 다량의 ROSs를 생산, 배출함으로써 내피세포를 손상시키고 결국 지방반 (fatty streak)과 죽상판 (atheromatous plaques)이 형성된다고 보고되었다.^{8,9)} 이같이 사람의 혈액 내 중성지방과 콜레스테롤, 특히 유해한 것으로서 알려진 LDL-콜레스테롤 수준의 증가는 심혈관계 질환 및 뇌혈관계 질환의 발병인

접수일: 2011년 11월 14일 / 수정일: 2011년 12월 6일

채택일: 2011년 12월 14일

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mlee@sungshin.ac.kr

인으로 보고되었다.

포화지방산 (saturated fatty acid)의 섭취는 혈액 지질함량을 높이는 반면, 고도 불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid)의 섭취는 혈액 지질함량을 낮추는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ ω -3와 ω -6 계열의 지방산은 생체대사 경로 및 기능이 다르고 서로 경쟁적 제어작용을 갖는 동일한 효소체계와 연관되어 있다. 필수지방산으로써의 기능 이외에 새롭게 혈액 콜레스테롤 감소 및 아이코사노이드 (eicosanoids) 대사와 관련한 생리활성 효과들이 입증되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 일반적으로 LA (linoleic acid, C_{18:2})와 같은 고도 불포화지방산은 혈장 콜레스테롤 농도를 저하시키고, 특히 어유에 많이 함유된 EPA (eicosapentaenoic acid, C_{20:5})와 DHA (docosahexaenoic acid, C_{22:6})는 혈장 콜레스테롤 농도 뿐 아니라 LDL-콜레스테롤의 농도도 감소시킨다고 한다. 고도 불포화지방산은 간 LDL 수용체를 상향조절 함으로써 혈장 LDL의 제거율이 상승되어 혈장 내 LDL-콜레스테롤의 농도는 감소하게 되고 이로 인하여 동맥경화를 예방한다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 그러나 고도 불포화지방산의 과잉 섭취는 산화 스트레스로 작용하여 오히려 동맥경화의 위험인자로 지적되어 왔다. ω -3 지방산은 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중결합을 지니고 있으므로 산화되어 과산화물을 생성할 가능성이 높으며 생성된 과산화물은 세포막 파괴, 체조직의 노화, 암 및 여러 종류의 퇴행성 질환을 일으켜 생체에 치명적인 영향을 줄 수 있다고 보고되고 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 특히 어유의 섭취로 혈청과 간의 과산화물 생성이 증가되었으며 이는 어유 지방산 자체나 그 지방산 식이를 먹은 동물의 체 조직은 지질 과산화에 대해 더 민감하다고 보고되었다.¹³⁾

최근 생리활성을 가지는 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있는 가운데 기호음료로써 오랜 역사를 가진 녹차가 혈중 콜레스테롤 저하에 효과적임이 알려졌고 녹차의 콜레스테롤 저하 기전은 콜레스테롤 흡수 억제 및 담즙산 형태의 배설을 촉진함으로써 혈중 지질 상태를 개선하는 것으로 보고되고 있다.¹⁶⁾ 동양과 유럽의 역학조사 결과에서 녹차의 섭취 또는 음용이 암과 심혈관계 질환 및 퇴행성 질환의 위험도 감소와 관련이 있음이 보고되었다.¹⁷⁾ 녹차의 플라보노이드인 카테킨은 LDL의 산화를 in vitro 및 in vivo에서 억제하므로 카테킨의 항산화 활성은 동맥경화 억제 효과를 지닌다고 보고되어 있다.^{18,19)} 녹차의 약리학적 기능으로는 녹차 카테킨이 체내에서 유해한 유리기를 제거하고 항산화효소의 활성을 증가시켜 항산화 효과를 나타내며 항 염증성, 항암 효과 및 항 혈전성 등을 가진다고 알려져 있다.^{20,21)} 그러나 녹차의 생리활성에 대한 in vivo 연구는 주로 차 추출물 형태로 진행되어 왔으며 녹차를 음식에 응용하는 사례가 많아지고 있는 현 실정에서 녹차 건분을 이용한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 동맥경화 동물 모델인 apo E KO 마우스 [E (-/-)]를 이용하여 지질함량이 5%로 구성된 음성 대조군 E (+/+), 양성대조군 E (-/-), LA와 DHA를 20%로 구성된 실험군 (LA, DHA)과 녹차 분말 5%에 LA, DHA를 20%로 구성된 녹차 실험군 (LA/GT, DHA/GT)의 총 6군으로 나누어 8주간 실험 식이를 섭취시킨 후 혈청, 심장, 간 등의 조직에서 지질 함량 분석, 대동맥의 지질 축적 정도 확인, 지질 과산화물에 따른 대동맥의 손상 관찰, 지질 과산화물에 의한 자가 사멸을 유발하는 기전을 알기 위해 ω -3와 ω -6 계열의 식이성 불포화지방산인 LA와 DHA가 동맥경화의 발생에 미치는 영향과 녹차의 항 동맥경화 효과를 관찰하고자 한다.

연구방법

실험동물 및 사육

8주령 (20 g)의 apo E 유전자를 가지고 있는 Wild군 C57BL/6J계 [E (+/+)]와 apo E 유전자를 가지고 있지 않은 B6.KOR-Apoe계 [E (-/-)] 수컷 마우스를 Japan SLC, Inc.에서 공급받아 처음 1 주일간 AIN-76으로 예비 사육하였다. 적응기간 후 무작위로 10 마리씩 6군[음성 대조군 E (+/+), 양성 대조군 E (-/-), LA, DHA, LA/GT, DHA/GT]으로 나누어 8 주간 사육하였다. 동물사육실의 조건은 21.4 ± 4°C를 유지하였으며 12 시간 dark-light cycle (8 : 00~20 : 00)로 명암을 조절하였다 (Fig. 1). 실험식이 배합은 AIN-76 조성을 대조군으로 하였으며 제조한 식이는 밀봉하여 -20°C에서 냉동 저장하였다가 사용하였다. 식이의 단백질은 카제인으로 총열량의 20%를 동일하게 유지시켰으며 대조군의 지방수준은 총 사료량의 5%

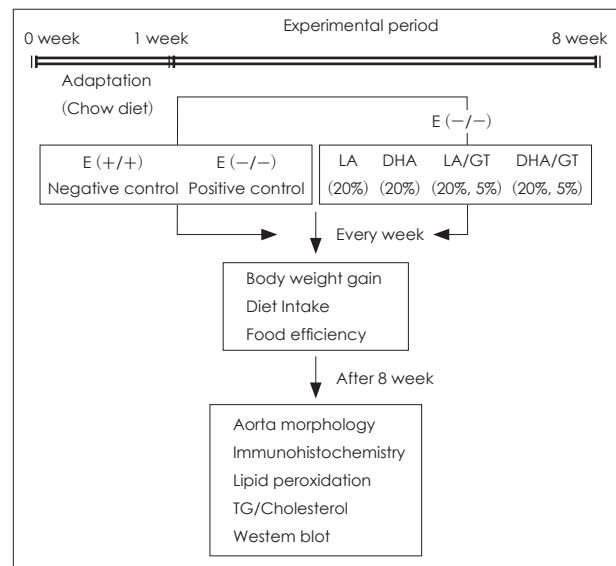


Fig. 1. Research design for this study.

로 하여 옥수수유로 공급하였고 실험군은 20%의 옥수수유와 어유로 공급하였다. 옥수수유 (농심)는 시판 유를 사용하였으며 어유는 삼립 웰가에서 구입하여 사용하였다. 녹차 실험군에서 사용한 녹차는 동결건조하여 대조군의 셀룰로오스 대신 5% 녹차분말을 사용하였다. 물은 증류수로 공급하였으며 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다 (Table 1).

시료의 수집 및 처리

8 주간의 실험식이 급여 후 12 시간 이상 절식시키고 ethyl ether로 마취하여 복부를 절개하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 2,000 × rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 혈청을 취하여 -80℃에서 다음 분석 시까지 보관 하였다. 심장 조직 일부는 액체 질소 가스로 급속 냉동시킨 후 -80℃에 보관 하였고, 나머지는 심장에 포르말린을 주입한 후 4℃에서 하루 보관 한 다음, 주변 근육을 제거하고 포르말린에 보관하였다. 간 조직은 액체 질소 가스로 급속 냉동시켜 -80℃에 보관하였다.

체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이효율

체중과 식이 섭취량은 일주일에 한번 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 사육기간 동안의 체중 증가량을 식이 섭취

$$\text{식이효율 (Food efficiency)} = \frac{\text{체중증가량 (g, Body weight)}}{\text{식이섭취량 (g, Food intake)}}$$

Table 1. Diet composition of experimental diet

	E (+/+)	E (-/-)	LA	LA/GT	DHA	DHA/GT
Casein	20	20	20	20	20	20
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Cornstarch	20	20	12.5	12.5	12.5	12.5
Sucrose	45	45	37.5	37.5	37.5	37.5
Cellulose	5	5	5	0	5	0
Green tea ¹⁾	0	0	0	5	0	5
Corn oil	5	5	20	20	0	0
DHA	0	0	0	0	20	20
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix ³⁾	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

(g/100 g)

1) Green tea: Green tea powder 2) AIN 76 Minerak Mixture (g/kg of mix): Calcium phosphate, dibasic 500; Sodium chloride 74; Potassium citrate, monohydrate 220; Potassium sulfate 52; Magnesium oxide 24; Manganous carbonate 3.5; Ferric citrate 6.0; Ferric citrate 6.0; Zinc carbonate 1.6; Cupric carbonate 0.3; Potassium iodate 0.01; Sodium selenite 0.01; Chromium potassium sulfate 0.55; finally added Sucrose to sum 1.0 kg 3) AIN 76 Vitamin mixture; g/kg of mix: Thiamin-HCl 0.6; Riboflavin 0.6; Pyridoxine-HCl 0.7; Nicotinic acid 3.0; D-Calcium pantothenate 1.6; Folic acid 0.2; D-Biotin 0.02; Cyanocobalamin 0.001; Retinol acetate 400,000 I.U.; dl-αTocopheryl acetate 5,000 I.U.; Cholecalciferol 0.0025; Menaquinone 0.005; finally added Sucrose to sum 1.0 kg

취량으로 나눈 값으로 계산하였다.

조직의 지질함량 측정

혈청과 심장, 간 조직에서의 총 콜레스테롤 함량은 cholesterol esterase, cholesterol oxidase, peroxidase 등을 이용한 효소법에 의한 정량용 kit 시약 (Eiken Co)으로 분석하였다.²²⁾ 심장, 간 조직은 Tris-HCl (154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)로 균질화 한 다음 4℃의 12,000 × g에서 20분간 원심분리 (Bekman LE80)하였다. 원심 분리 후 세포조각들 (cell debris)을 제거한 후 상층액만을 취하여 분석 전까지 -80℃에 보관하여 두었다. 실험은 시료에 발색시약을 첨가하여 혼합한 후 37℃ 항온수조에서 5분간 반응시켜 발색시킨 뒤 흡광도계 (Pharmacia) 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방 역시 혈청과 심장, 간 조직에서 lipoprotein lipase, glycerol kinase, glycerol-ρ-oxidase, peroxidase를 이용한 효소법에 의한 정량용 kit 시약 (Eiken Co)으로 분석하였다.²³⁾ 시료에 발색시약을 첨가하여 혼합기로 잘 혼합한 후 37℃ 항온수조에서 5분간 발색시킨 후 흡광도계 (Pharmacia) 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜레스테롤 및 중성지방의 표준용액을 농도별로 준비한 것을 위의 방법과 동일하게 발색시켜 표준곡선을 만든 후, 시료의 흡광도와 비교하여 함량을 구하였다.

지질과산화물 (LPO, 4-HNE + MDA) 함량 측정

혈청과 심장, 간 조직의 지질과산화 정도는 lipid peroxidation assay kit (Calbiochem, #437634)를 이용하여 측정하였다.²⁴⁾ 이는 불포화지방산으로부터 생성되는 최종과산화물 형태인 MDA (malondialdehyde)와 4-HNE (4-hydroxy-alkenal)를 동시에 측정하는 방법이다. N-methyl-2-phenylindole 이 45℃에서 MDA와 4-HNE들과 반응하여 발색하는 원리로 흡광도계 (Pharmacia) 586 nm에서 흡광도를 측정하였다. 심장과 간 조직에서 지질과산화물 측정은 조직을 0.001% BHT (Butylated hydroxy toluene)가 들어 있는 10% 조직 균질액으로 만든 후 3,000 × g에서 10 분간 원심분리 한 후 상층액만을 취하여 측정한 후 1 mg 단백질에 해당하는 값으로 환산하였다.

심장의 형태학적 관찰 및 대동맥의

Immunohistochemistry

대동맥 부분을 떼어낸 후 그 주변의 근육들을 깨끗이 제거한 다음 현미경을 이용하여 관찰하였다. 대동맥은 파라핀 블록으로 준비하여 5 μm의 절편으로 만든 후 대동맥 슬라이드를 만들었다. H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색법을 이용하여 손상정도를 확인하였다.

Western blotting

간 조직에 100 μ L lysis buffer (1 M Tris, 5 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 7.4)를 첨가하여 단백질을 분리한 후 12% 겔에 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동으로 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell Grr, #401396)으로 120 V에서 한 시간 동안 transfer한 후 5% 탈지분유로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. TBST 용액 (20 mM Tris-HCl, 0.8% NaCl, 0.05% Tween-20)으로 membrane을 10분씩 3 차례 씻어준 후 일차항체 (cas-pase-3, cytochrome c, bcl-2, p-ikB, Santa Cruze Biotechnology)를 이용하여 4°C에서 membrane과 밤새 반응시켰다. Membrane를 3 차례 씻어준 다음 일차항체에 대한 특이적인 이차항체를 실온에서 한 시간 동안 membrane과 반응시켰다. 3 차례 membrane을 씻어준 후 ECL용액 (Amersham Biosciences)으로 발색 후 X-선 필름 (FUJI medical X-ray film)에 노출시켜 확인하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 모든 결과는 SPSS SW을 이용하여 분석하였다. 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 구하였고, ANOVA test 후 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의차를 나타내었다.

결 과

체중 변화량

8주간 사육한 체중 증가량은 Table 2에 나타내었다. 각 군별 8주간의 체중변화를 살펴보면 E (+/+)군은 4.7 g, E (-/-)군은 2.9 g, LA군은 7.6 g, LA/GT군은 4.2 g이 증가하였다. 반면 DHA군은 1.4 g, DHA/GT군은 0.2 g이 감소하였다. E (-/-)군은 5주에서 6주 사이에 체중이 감소하였지만 8주까지 비슷한 체중을 유지하였다. LA군은 1주에서 8주까지 지속적인 체중 증가를 보였고 LA/GT군은 5주에 체중 감소를 보였

Table 2. The mean of body weight gains, food intake and food efficiency in apo E KO mice fed PUFA with GT for 8 weeks

	E (+/+)	E (-/-)	E (-/-) + 20% fat				p-value
			LA	LA/GT	DHA	DHA/GT	
BWG ²⁾	0.6 \pm 0.2 ^{1b)}	0.4 \pm 0.3 ^{o)}	1.0 \pm 0.7 ^{c)}	0.5 \pm 0.5 ^{b)}	-0.1 \pm 0.2 ^{o)}	-0.02 \pm 0.3 ^{o)}	< 0.01
FI	3.3 \pm 0.88	3.9 \pm 0.45	3.4 \pm 0.56	3.7 \pm 1.21	3.1 \pm 0.34	3.3 \pm 0.39	NS
FE	0.23 \pm 0.09 ^{c)}	0.08 \pm 0.08 ^{b)}	0.28 \pm 0.23 ^{c)}	0.10 \pm 0.15 ^{b)}	-0.03 \pm 0.07 ^{o)}	-0.01 \pm 0.11 ^{o)}	< 0.01

1) Values are expressed mean \pm S.D 2) BWG: Body weight gain (g/week)

a, b, c: differences in continuous variables between the groups were tested by ANOVA

FI: Food Intake (g/week), FE: Food Efficiency (g/week) = Body weight (g/week)/Food intake (g/week)

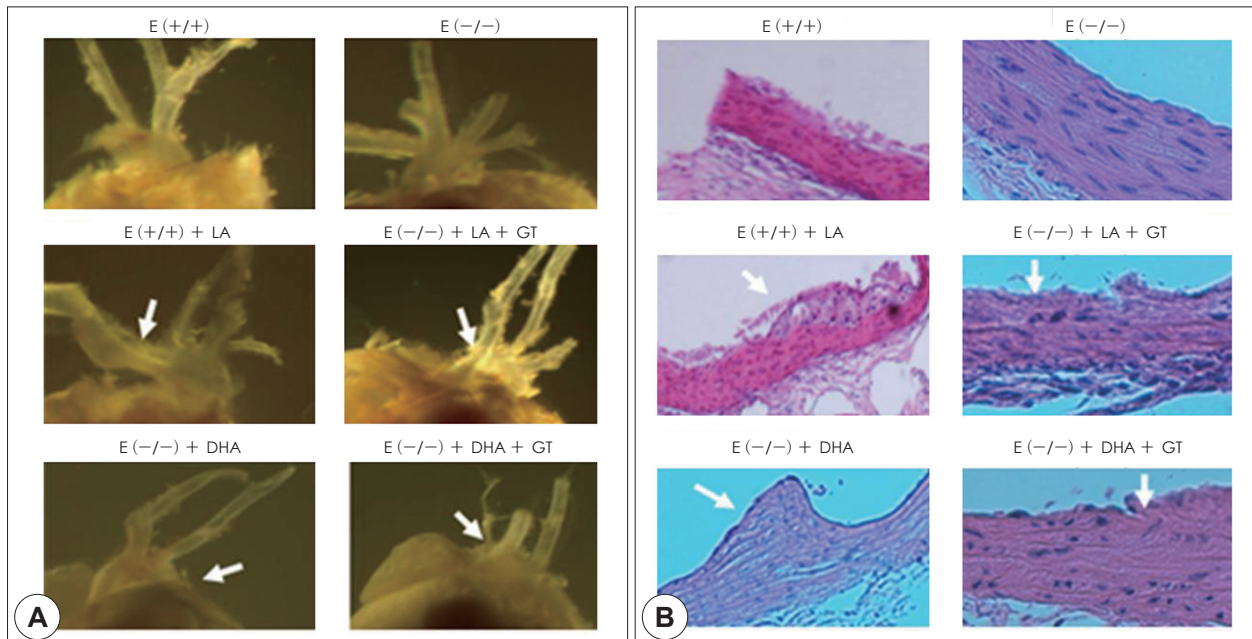


Fig. 2. A: Gross morphology of proximal aortae in 20%LA, 20%LA + 5%GT, 20%DHA and 20%DHA + 5%GT treated apo E KO mice. The presence of atherosclerotic lesion (white arrow) were clearly observed at inner-curvature and branch points of aorta in apo E KO mice. B: Representative image of an aortic root atherosclerotic lesion (white arrow) in LA, LA-GT, DHA and DHA-GT treated C57BL/6J apoE KO mice.

으나 8주까지 증가하였다. DHA군과 DHA/GT군은 불규칙적인 체중 변화를 보였다 (Fig. 2). DHA군에서 식이 섭취량과 식이 효율이 가장 낮았다. LA군에 녹차 분말을 같이 급여한 LA/GT군에서 식이 섭취량이 가장 높았지만 녹차의 식이 섬유 영향으로 체중 증가가 LA군에 비하여 낮게 관찰되었다.

혈청과 심장, 간 조직의 지질 성상 및 녹차의 억제 효과

혈청과 심장, 간 조직의 TC과 TG 함량의 측정 결과는 Table 3에 나타내었다. 혈청의 TC함량을 살펴보면 정상식을 급여한 E (-/-)군은 E (+/+)군에 비하여 4배 증가하였다. LA군에 비하여 DHA군이 혈중 TC가 1.5배 이상 유의적으로 증가하였고 LA/GT군은 LA군에 비하여 감소하지 못하였으나 DHA/GT군에서는 DHA군과 비교하여 유의적으로 감소시켰다. 심장조직의 TC함량은 E (-/-)군이 E (+/+)군과 비교하여 4배 이상 증가하였으며 DHA군은 LA군에 비하여 약 2배 증가하였다. LA와 LA/GT군의 차이는 없는 반면 DHA/

GT군은 DHA군에 비하여 유의적으로 감소하였다. 간조직의 TC함량을 측정한 결과 녹차 분말을 함께 급여한 DHA/GT군은 DHA군에 비하여 12%가 감소하였다. DHA군은 LA군에 비하여 2배 증가하였다. 혈청 TG함량 결과는 E (-/-)군은 E (+/+)군보다 64% 증가하였다. DHA군이 DHA/GT군에 비하여 30% 증가하였다. 심장조직에서는 혈청에서와 같이 E (+/+)군과 비교하여 E (-/-)군이 증가하였다. LA/GT군은 LA군과 비교하여 7%, DHA/GT군은 DHA군과 비교하여 중성 지방 함량이 31% 유의적으로 감소하였다. 간 조직에서 중성 지방 함량은 군간 유의성이 없었다.

혈청과 심장, 간 조직에서의 LPO (4-HNE/MDA) 생성

지방산의 종류와 녹차 분말 급여에 의한 지질 과산화물의 생성은 Table 4에 나타내었다. 혈청, 심장, 간에서의 LPO 생성은 E (-/-)군이 E (+/+)군과 비교하여 전반적으로 증가하였으나 각 지방산 처치군에 대한 GT처치군의 혈청의 LPO생

Table 3. Effects of dietary green tea on TC and TG levels of serum, heart and liver in different 20% PUFA fed apo E KO mice

	E (+/+)	E (-/-)	E (-/-) + 20% fat				p-value
			LA	LA/GT	DHA	DHA/GT	
TC							
Serum	107.5 ± 35.5 ^{1a}	412.8 ± 202.8 ^c	364.9 ± 129.9 ^b	435.0 ± 102.4 ^c	581.7 ± 194.5 ^d	420.8 ± 55.2 ^c	< 0.05
Heart	17.9 ± 3.2 ^a	76.8 ± 13.4 ^b	73.9 ± 9.6 ^b	75.7 ± 6.6 ^b	141.6 ± 18.8 ^c	123.5 ± 18.4 ^c	< 0.05
Liver	26.5 ± 7.0 ^a	42.1 ± 16.1 ^b	27.8 ± 7.1 ^a	30.6 ± 8.8 ^a	54.9 ± 6.9 ^c	48.3 ± 12.7 ^b	< 0.05
TG							
Serum	50.8 ± 8.4 ^{1a}	83.2 ± 25.2 ^b	82.1 ± 28.0 ^b	147.7 ± 60.4 ^c	153.3 ± 30.0 ^c	201.2 ± 30.4 ^d	< 0.05
Heart	20.5 ± 6.7 ^a	116.5 ± 24.0 ^b	94.9 ± 18.7 ^b	88.3 ± 14.9 ^b	133.2 ± 5.2 ^c	91.2 ± 95.3 ^b	< 0.05
Liver	64.2 ± 7.1	124.3 ± 86.3	72.9 ± 50.8	41.6 ± 13.9	87.2 ± 2.2	51.3 ± 2.6	N.S

1) values are expressed Mean ± S.D

a, b, c: differences in continuous variables between the groups were tested by ANOVA

N.S : non significant

Table 4. The differences in the total lipid peroxides (LPO) including MDA and 4-HNE of serum, heart and liver in 20% PUFA with GT treated apo E KO mice

	E (+/+)	E (-/-)	E (-/-) + 20% fat				p-value
			LA	LA/GT	DHA	DHA/GT	
LPO							
Serum	44.4 ± 12.5 ^{1a}	50.6 ± 21.8 ^a	42.2 ± 2.3 ^a	43.1 ± 10.9 ^a	74.8 ± 20.2 ^b	71.0 ± 18.7 ^b	< 0.05
Heart	7.8 ± 5.9 ^a	8.1 ± 3.2 ^a	11.5 ± 2.5 ^a	11.4 ± 2.1 ^a	19.7 ± 5.3 ^b	13.7 ± 1.8 ^a	< 0.05
Liver	6.5 ± 0.3 ^a	8.3 ± 1.0 ^a	8.4 ± 1.5 ^a	7.5 ± 1.4 ^a	24.4 ± 11.2 ^c	15 ± 3.6 ^a	< 0.05
MDA							
Serum	22.44 ± 3.1	27.8 ± 13.3	26.9 ± 2.2	25.5 ± 13.7	36.3 ± 8.5	32.0 ± 8.9	N.S
Heart	5.4 ± 3.9	6.7 ± 3.4	7.2 ± 2.0	6.7 ± 1.0	11.5 ± 3.0	6.9 ± 9.9	N.S
Liver	4.1 ± 0.4 ^{1a}	5.3 ± 0.7 ^a	5.7 ± 1.3 ^a	5.9 ± 1.1 ^a	17.4 ± 7.9 ^c	9.9 ± 0.1 ^b	< 0.01
4-HNE							
Serum	21.9 ± 10.4 ^{1a}	22.8 ± 10.2 ^a	15.3 ± 2.4 ^a	17.6 ± 4.4 ^a	38.5 ± 21.3 ^b	39.0 ± 9.8 ^b	< 0.05
Heart	2.4 ± 2.2 ^a	1.4 ± 0.6 ^a	4.2 ± 0.7 ^a	4.6 ± 1.4 ^a	8.2 ± 2.3 ^b	6.7 ± 0.2 ^b	< 0.05
Liver	2.4 ± 0.3 ^a	2.9 ± 1.0 ^a	2.7 ± 1.8 ^a	1.6 ± 1.0 ^a	7.0 ± 5.0 ^b	5.0 ± 0.2 ^b	< 0.05

1) values are expressed Mean ± S.D

a, b, c: differences in continuous variables between the groups were tested by ANOVA

N.S: non significance

성 차이는 없다. 그러나 간 조직에서 DHA/GT군은 DHA 군과 비교하여 38% 감소하였다. 지질 과산화물 형태 중 하나인 MDA 생성량결과는 혈청 및 심장조직에서의 차이는 없으며 간 조직에서 DHA/GT군은 DHA군에 비하여 약 50% 감소하였다. 반면 4-HNE 생성량은 DHA군이 E (-/-)군 등을 포함한 모든 군보다 증가하였고 간과 심장조직에서 DHA/GT군은 DHA군과 비교하여 감소하였으나 통계적으로 유의적이지 않았다.

대동맥의 Atherogenetic morphology와 H&E stain

심장의 심방 바로 위 대동맥을 심장과 함께 절제하여 포르말린에 고정한 다음 주변의 근육을 제거하고 현미경사진으로 확인한 결과는 Fig. 2A에 나타내었다. apo E KO 마우스의 대동맥궁(aortic arch) 안쪽과 대동맥 가지 (aorta branches)에서 지질 축적을 관찰 할 수 있었다. E(+/-)군에서는 지질 축적을 관찰 할 수 없었지만 LA군과 DHA군에서 흰색의 plaque 형태로 지질 축적이 관찰되었다. 반면 녹차를 같이 섭취한 LA/GT, DHA/GT군에서는 감소하였다. 대동맥의 lesion 형성은 Fig. 2B와 같이 H&E stain을 통해 확인 할 수 있었다. LA군과 DHA군은 lesion 형성으로 인하여 두꺼워진 대동맥 벽을 관찰 할 수 있었다.

고지방산 섭취에 따른 4-HNE 및 MDA생성과 녹차의 억제 효과

간 조직의 microsomal에서 caspase-3를 western blot 분석 방법을 사용하여 살펴보았다 (Fig. 3). 고지방을 섭취한 LA군에서 caspase-3 활성이 증가하였고 DHA군에서는 더 많은 증가가 관찰되었다. 반면 녹차를 급여한 군에서는 그 활성이 감소하였다. 자가 사멸과 관련 되어 있는 cytochrome c의 발현을 억제해 주는 bcl-2의 활성 정도로 보아 DHA군에서 자가 사멸과 관련된 인자의 발현이 높은 것을 알 수 있었다. 인산화된 p-IkB (phosphorylated IkB)는 LA군과 DHA군에서 활성화되었고, 녹차를 처치한 군은 활성이 감소되었다.

고 찰

고지방식이 특히 지방산의 종류의 변화에 따른 체중증가에 관한 결과는 매우 다양한데 본 연구의 결과와 같이 고도 불포화지방산의 함량이 많은 어유를 과량 섭취하면 체중 증가량이 감소된다는 보고가 관찰되었다.²⁵⁾ 그러나 생선을 먹는 해안 지방의 주민과 생선을 먹지 않는 내륙지방의 주민 간에 체중 증가량은 차이가 없다는 보고와는 일치하지 않았다.²⁶⁾ LA/GT군의 체중변화는 3.5% 녹차 카테킨을 랫트에 섭취시킨 보고와 Jin 등의 녹차분말 섭취 시에 녹차 분말에 함유된 식이

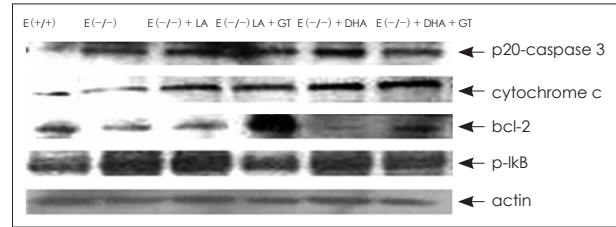


Fig. 3. Cell signaling of mitochondrial damage from the hepatocytes of apoE KO mice and 20% LA, 20% LA + 5% GT, 20% DHA and 20% DHA + 5% GT treated apo E KO mice.

섭유의 영향으로 체중 감소가 나타난다는 연구 결과와 일치하였다.^{27,28)} 그러나 DHA/GT군은 DHA군에 비해 적은 체중 감소가 관찰되었다. 이것은 DHA의 생선 비린 냄새를 GT가 감소시킨 것으로 생각되어 진다. 또한 본 연구에서는 녹차잎 분말이 증가된 혈중지질을 감소시키는 효과가 없었는데 김 등의 연구에서도 녹차 잎을 분말형태로 5% 급여한 쥐에서 중성지질 함량이 대조군 보다 오히려 증가하였다는 결과와 일치하였다.²⁹⁾ 식이 지방의 불포화도가 증가 될수록 혈청 총 콜레스테롤의 함량이 유의하게 감소된다는 Nestel의 보고와 같았다.³⁰⁾ 카테킨이 풍부한 녹차의 급여가 혈청 내 중성지방 농도 감소와 quercetin과 카테킨이 콜레스테롤 및 어유를 섭취한 쥐의 혈청과 간의 콜레스테롤과 중성지방 수준을 저하시킨다는 연구 보고와 일치하였다.³¹⁾ 그러나, 고지방 식이를 섭취한 쥐를 대상으로 EGCG의 경구투여가 혈청과 간의 콜레스테롤을 유의적으로 감소시켰음을 보고한 Matusda 등과는 상반된 결과였다.^{31,32)} 녹차 추출물의 동맥경화 완화효과에 대한 정확한 작용기전은 충분히 규명되지 않았으나 녹차에 다량 함유되어 있는 카테킨의 콜레스테롤 저하효과에 기인하는 것으로 생각되며 녹차 전분의 수용성 식이섬유는 12.15%로 이는 소화관 내 미셀 형성을 방해하고 지방분해효소의 작용을 저해로 지방흡수를 방해함으로써 혈중 지방 수준이 감소된 것으로 생각되어 진다.³³⁾

고도 불포화지방산, 특히 ω -3 지방산이 혈청 지질 저하 및 항혈전 효과가 있다고 알려져 있지만 체내 외에서 쉽게 산화되어 생체에 오히려 위험한 결과를 초래할 수도 있다고 보고되고 있다.^{13,15)} 어유식에서 지질 과산화물 생성이 증가되었다는 Cho 등의 보고와 일치하였다.³⁴⁾ DHA군에서 지질 과산화물 생성량의 증가는 ω -6 지방산에 비해 ω -3 지방산이 cis 형의 불안정한 이중 결합과 지방산 자체의 불포화도로 인해 지질 과산화물이 더욱 많이 생성되었기 때문으로 생각되어 진다. 따라서 동맥경화 모델에서 고지방식을 급여한 결과 지질 과산화물이 더 많이 생성됨을 알 수 있었다. 이 결과로 고지방식은 동맥경화를 유발시키는 원인인 반면 녹차는 항 동맥경화 효과가 있음을 제시하여 준다. 또한 apo E KO mice에 정상 식이를 급여하였을 때 LA로부터 생성되는 thromboxane A2가 혈

전형성을 증대시켜 동맥 경화를 유도한다는 보고와 같았고 DHA군에서도 같은 결과였다.³⁵⁾ 반면, 콜레스테롤증을 유발시킨 토끼에 녹차물을 급여한 연구와 apo E가 결핍된 쥐에 섭취시켰던 연구보고에서와 같이 감소하는 현상을 관찰 할 수 있었다.^{36,37)} 이러한 결과들은 녹차가 항산화제 역할을 함으로써 고지방식이 섭취 시 지방의 흡수를 억제하여 동맥경화에 효과적인 임을 제시하여 준다.

Caspase family는 염증반응이나 세포괴사 (apoptosis) 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 단백질로서, 세포질에서 불활성화 효소형태로 존재하다가 세포괴사를 유도하는 자극에 의하여 활성화 되며 알려진 모든 caspase들은 효소원 (zymogen)으로 존재하며 다른 caspase 또는 protease에 의해 잘려진 후 활성화된 형태로 전환된다. 자극과 세포의 종류에 따라서 특정한 caspase들이 각각의 경로를 통해 활성화되며 또한 몇몇 caspase들의 활성화 경로는 caspase-3를 활성화시키며, 결과적으로 caspase-3의 주요한 기질인 PARP (poly ADP-ribose polymerase)의 분해를 일으켜 염색체의 파괴를 야기 시키고 결국 자가 사멸 (apoptosis)로 이어지게 된다.³⁸⁾ 고농도의 DHA를 혈관내피 세포에 처리하였을 때 caspase-3 활성을 증가시켜 자가 사멸을 유발시킨다는 연구 결과와 결장암에서 DHA가 자가 사멸을 억제한다는 연구 결과와 일치 하였다.^{39,40)} 식이 혹은 다른 동맥경화성 인자이든 4-HNE와 MDA 생성이 보다 많이 증가된 LA군과 DHA군에서 NF κ B가 활성화 된 것은 mitochondria의 cytochrome C 생성에 영향을 받은 caspase 신호체계가 연계되어 있다. NF κ B는 산화 환원 반응과 관계되어 동맥경화를 진전시키는 주요 인자로 mitogen 활성 단백질인 MAP kinase와 AP-1 전사인자를 활성화시킨다. 따라서 4-HNE 유도성 PDGF 생성은 NF κ B에 의하여 조절됨을 알 수 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, ω -3 계열의 지방산 특히 고도 불포화 지방산으로 항 동맥경화 및 항암효과가 있는 것으로 알려진 DHA는 ω -6 계열의 지방산인 LA에 비해 지방산 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중 결합을 지니고 있어서 과산화물이 많이 생성되었다. 생성된 과산화물은 미토콘드리아를 손상시켜 caspase의 활성을 높임으로서 대동맥의 자가 사멸을 유발시켰으며 이것을 항 동맥경화 효과를 갖고 있는 녹차가 억제 하였다. 뿐만 아니라 ω -6 계열인 LA는 혈청 콜레스테롤 저하에 효과적인 기능을 나타내지만, 이로부터 생성되는 thromboxane A2가 혈전형성을 증대시켜 동맥 경화를 유도하였기 때문에 대동맥에서 지질 축적과 lesion 형성이 증가되었다. 따라서 DHA는 LA 보다 대동맥의 자가 사멸을 유도하여 결과적으로 동맥경화의 원인이 될 것으로 예상되며 녹차는 이 자가 사멸을 억제하는 것으로 예상된다. 앞으로 DHA

에 의한 자가 사멸을 일으키는 기전을 더욱 자세히 밝히는 연구와 혈청 및 심장과 간 조직에서의 항 동맥경화 기전 연구와 심장 조직에서의 동맥경화 억제 기전을 구체화하는 것이 요구 되어진다.

요약 및 결론

본 연구에서는 식이 지방산인 LA (linoleic acid)와 DHA (DHA (docosahexaenoic acid)가 동맥경화에 미치는 영향과 녹차의 항 동맥경화 효과에 대하여 알아보고자 한다. 8주령의 B6.KOR-Apoe계 [E (+/+)]와 C57BL/6 [E (-/-)]수컷 쥐를 이용하여 1주간 적응시킨 후 군당 10마리씩 나누어 20%의 지방을 옥수수유와 어유로 급여하고 그 식이 지방산에 5% 녹차분말을 함께 급여하여 8주간 사육하였다. 사육 기간 동안 식이 섭취량, 체중 증가량을 측정하였고 이를 통해서 식이 효율을 계산하였다. 혈청과 심장, 간 조직에서는 총 콜레스테롤 함량과 중성 지방 함량을 분석하였고, 지질 과산화물 함량도 분석하였다. 대동맥의 지질 축적 정도를 관찰하였고 간 조직에서 단백질을 분리하여 식이 불포화 지방산에 의한 자가 사멸 정도를 분석하였다.

1) 체중 증가량은 대조군인 E (+/+), E (-/-)군과 LA, LA/GT군에서 증가하는 경향을 보였으나 DHA, DHA/GT군에서는 유의적으로 감소하였다. 식이효율의 경우 DHA, DHA/GT군이 다른 군보다 낮았으며 유의적으로 관찰되었다.

2) 혈청 TC는 E (-/-)군이 E (+/+군)에 비하여 74%가 증가하였다. DHA/GT군은 DHA군과 비교하여 10% 감소하였다. 심장조직에서도 마찬가지로 E (-/-)군이 E (+/+군)과 비교하여 증가하였으며 DHA/GT군이 DHA군에 비하여 유의적으로 12%가 감소하였다. 심장조직의 TG함량은 LA/GT군이 LA군에 비하여 7%가 감소하였고 DHA/GT군은 DHA군과 비교하여 31%가 감소하였다. 간 조직의 TG함량은 심장 조직에서와 같이 감소하였지만 유의적이지는 않았다.

3) 혈청의 지질 과산화물 함량 측정 결과 E (-/-)군이 E (+/+군)과 비교하여 유의적으로 14%가 증가하였지만 DHA/GT군은 DHA군에 비하여 5%가 유의적으로 감소되었다. 심장 조직에서는 LA/GT군이 LA군에 비하여 0.8%, DHA/GT군은 DHA군과 비교하여 유의적으로 30%가 감소하였다. 간 조직의 지질 과산화물 함량은 LA/GT군이 LA군과 비교하여 11%, DHA/GT군은 DHA군과 비교하여 유의적으로 38%가 감소되었다.

4) 대동맥의 지질 축적 정도를 관찰 한 결과 LA군에 비하여 DHA군에서 많은 지질 축적이 관찰 된 반면 LA/GT군과 DHA/GT군에서는 감소하였다. 대동맥의 lesion 형성에서도

같은 결과를 확인 할 수 있었다.

5) Caspase의 활성이 고지방식이를 섭취한 LA군에서 증가하였으며 DHA군 에서 더 많은 증가를 보였다. 인산화된 p-IκB (phosphorylated IκB)는 LA군과 DHA군에서 활성화되었고, 녹차를 처치한 군은 활성이 감소되었다. 뿐만 아니라 cytochrome c 활성화도 caspase와 같은 결과를 보였으며 cytochrome c를 억제하는 bcl-2의 활성은 그와 상반되게 관찰되었다.

요약하면, 고도 불포화 지방산으로 항 동맥경화가 있는 것으로 알려졌으나 불안정한 이중 결합에 의한 과산화물이 많이 생성되었으며 생성된 과산화물은 미토콘드리아를 손상시켜 Cyt C-caspase 연계적인 활성을 높임으로서 대동맥의 자가사멸을 유발시켰다. 그러나 PUFA와 함께 섭취한 녹차기 이를 억제함으로써 항 동맥경화 효과를 갖고 있음을 시사하여 고지방식이 시 녹차의 효과를 기대할 수 있겠다.

■ 감사의 글

심장의 형태학적관찰 (Gross morphology)을 도와주신 고려의대 구로병원 심혈관센터 서홍석 교수님께 감사를 드립니다.

Literature cited

- National Statistics Office. 2008 Annual Report on the cause of Death Statistics. Republics of Korea; 2009
- Romos KS, Melchert RB, Chacon E & Acosta D Jr. Toxic responses of the heart and vascular systems. In: casarett & Doull's Toxicology (6th ed.). New York: McGraw-Hill; 2011. p.597-651
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423): 801-809
- Oh H, Mun H, Lee M. Effect of CLA (Conjugated Linoletic Acid) on the Anti-Atherosclerotic Factors in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Korean J Nutr* 2004; 37(3): 182-192
- Natio HK, Atherogenesis: Current topics on etiology and risk factors. *Clin Chem* 1995; 41(1): 132-133
- Kim WS, Kim YS. Paraxonase Polymorphism as a new genetic marker of atherosclerosis. *Korean J Lipidology Atherosclerosis* 1996; 6(2): 81-86
- Jang YS, Kim OY, Kwon SJ, Lee JH, Chung NS, Kwon SJ, Huh KB. Influence of alcohol consumption and smoking habits on cardiovascular risk factors and antioxidant status in healthy men. *Korean J Med* 1999; 56(4): 437-449
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88(6): 1785-1792
- Kris-Etherton PM, Krummel D, Russell ME, Dreon D, Mackey S, Borchers J, Wood PD. The effect of diet on plasma lipids, lipoproteins, and coronary heart disease. *J Am Diet Assoc* 1988; 88(11): 1373-1400
- Park BS, Response surface analysis of dietary n-3/n-6 and P/S ratio on reduction of plasma lipids in rats. *J Korean Oil Chem* 2004; 21(2): 148-155
- Levy RI. Cholesterol, lipoproteins, apoproteins and hearts disease: present status and future prospects. *Clin Chem* 1981; 27(5): 653-662
- Dyerberg J, Bang HO, Stofferson E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet* 1978; 2(8081): 117-119
- Hu ML, Frankel EN, Leibovitz BE, Tappel AL. Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid oxidation in rat liver and kidney homogenates. *J Nutr* 1989; 119(11): 1574-1582
- Buckingham KW. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J Nutr* 1985; 115(11): 1425-1435
- Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Feingold KR. The effect of oxidized lipids in the diet on serum lipoprotein peroxides in control and diabetic rats. *J Clin Invest* 1993; 92(2): 638-643
- Fujiki H. Two stages of cancer prevention with green tea. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(11): 589-597
- Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(2): 227-232
- Yang TT, Koo MW. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis* 2000; 148(1): 67-73
- Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 2001; 131 (1): 27-32
- Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 85(13): 1038-1049
- Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Sueoka E, Matsuyama S, Imai K, Nakachi K, Fujiki H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat Res* 1999; 428(1-2): 339-344
- Kim SO, Lee MY. Effects of Ethylacetate Fraction of Onion on Lipid Metabolism in High Cholesterol- Fed Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2001; 30(4): 673-678
- Miyazaki, Miwa S, Kodama H, Yamada H, Nagata K, Toriumi W, Kitamura K, Kume E. Hepatic and intestinal changes in rats treated with T-0126, a microsomal triglyceride transfer protein (mtp) inhibitor. *J Toxicol Sci* 2007; 32(2): 161-177
- Chang CY, Chen YL, Yang SC, Huang GC, Tsi D, Huang CC, Chen JR, Li JS. Effect of schisandrin B and sesamin mixture on CCl(4)-induced hepatic oxidative stress in rats. *Phytother Res* 2009; 23(2): 251-256
- Kim JS, Kim SH, Han YN. Effects of Unsaturated Fatty Acid Diets and Feeding Periods on the Antithrombosis, the Hematological Changes in the Blood and Fatty Acid Compositions of Platelets in Rats. *Korean J Nutr* 1992; 25(5): 339-350
- Bulliyya G, Reddy KK, Reddy GP, Reddy PC, Reddanna P, Kumari KS. Lipid profiles among fish-consuming coastal and non-fish-consuming inland populations. *Eur J Clin Nutr* 1990; 44(6): 481-485
- Tonooka F, Matsumoto N, Ishigaki A, Hara Y. The effects of crude catechins of tea on the food in take and body fat in rat. Proceeding of International Symposium Tea Science; 1991. p.336
- Jin HH, Yang JL, Chung JH, Kim Y. Hypocholesterolemic effects of green tea in cholesterol-fed rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33(1): 47-51
- Kim ES, Kim MK. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 1999; 32(4): 337-352
- Nestel PJ, Havenstein N, Whyte HM, Scott TJ, Cook LJ. Lowering of plasma cholesterol and enhanced sterol excretion with the consumption of polyunsaturated ruminant fats. *N Engl J Med* 1973; 288(8): 379-382

- 31) Kwon MN, Yang JL, Chung JH, Kim YH. Effect of flavonoid (+)-catechin as stabilizer in rat fed fresh and peroxidized fish oil. *J Korean Food Nutr* 1993; 22(4): 381-391
- 32) Matsuda H, Chisaka T, Kubomura Y, Yamahara J, Sawada T, Fujimura H, Kimura H. Effects of crude drugs on experimental hypercholesterolemia. I. Tea and its active principles. *J Ethnopharmacol* 1986; 17(3): 213-224
- 33) Vahouny GV, Khalafi R, Satchithanandam S, Watkins DW, Story JA, Cassidy MM, Kritchevsky D. Dietary fiber supplementation and fecal bile acids, neutral steroids and divalent cations in rats. *J Nutr* 1987; 117(12): 2009-2015
- 34) Cho SH, Choi YS. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 1994; 29(1): 47-52
- 35) Choi YS, Cho SH, Im JK. Lipid peroxidation and vitamins e and a levels in tissues of rats fed fish oil or soybean oil supplemented with vitamin E. *Korean J Nutr* 1995; 28(10): 967-975
- 36) Jorgensen KA, Dyerberg K. Prostacyclin, thromboxane and atherosclerosis. In: Draper HH, editor. *Advances in Nutritional Research*; 1983. p.64-66
- 37) Tijburg LB, Wiseman SA, Meijer GW, Weststrate JA. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis* 1997; 135(1): 37-47
- 38) Faraco, PR, Ledgerwood EC, Vandenabeele P, Prins JB, Bradley JR. Tumor necrosis factor induces distinct patterns of caspase activation in WEHI-164 Cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261(2): 385-392
- 39) Chen ZY, Istfan NW. Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63(5): 301-308
- 40) Diep QN, Intengan HD, Schiffrin EL. Endothelin-1 attenuates omega3 fatty acid -induced apoptosis by inhibition of caspase 3. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2): 287-291