

李 名 珣 教授指導

碩士學位 請求論文

식이 불포화지방산의 종류에 따른
지질 과산화물 생성이
혈관내피세포의 apoptosis에
미치는 영향

2005

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

金 榮 妍

식이 불포화지방산의 종류에 따른
지질 과산화물 생성이
혈관내피세포의 apoptosis에
미치는 영향

李名琚 教授指導

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2005年 12月

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

金榮妍

認 准 書

金 榮 妍의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

誠信女子大學校 大學院

논문개요

최근 발병하는 심장 및 뇌혈관계 질환의 원인으로 가족력, 비만, 음주, 흡연, 남성, 폐경, 나이, 혈중 지질농도, 혈중 호모시스테인 농도의 증가, 유전자 다형성과 같은 많은 요인들 중 특히 식이 지방산의 섭취로 인한 발병률이 증가하고 있다. 식이 지방산은 종류와 양에 따라 세포막 구성에 미치는 영향이 다르고 과산화물 생성에도 차이를 보인다. 이 중 DHA(Docosahexaenoic acid)와 EPA(Eicosapentaenoic acid) 등과 같은 ω -3계의 고도 불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA)들은 산화적 스트레스로 인해 다량의 과산화물을 생성하고 결국은 혈관 내피 세포의 손상을 초래한다.

신체를 구성하고 있는 기본단위인 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포의 분열과 사멸을 조절한다. 세포의 능동적인 죽음을 자가 사멸(apoptosis) 또는 프로그램 세포사멸이라고 한다. 이 자가 사멸 과정에 관여하는 caspase는 세포 사멸시 활성화되는 중요한 단백질 분해효소이고, cystein protease의 일부인 caspase-3는 세포질에 존재하는 DNase를 활성화시켜 핵 내로 이동시킴으로써 DNA의 분절을 초래하여 자가 사멸을 유도하는 중심적인 역할을 담당한다.

그러므로, 본 연구는 인체에서 유래한 혈관 내피 세포(ECV304)에 식이성 불포화지방산인 linoleic acid(LA), docosahexaenoic acid(DHA), arachidonic acid(AA)를 각각 100uM로 처치한 후 ① 세포의 독성 ② 세포의 형태학적 변화 ③ 세포막의 지방산 유입률 ④

지질 과산화물의 생성 ⑤ caspase-3의 활성화 등을 분석하여 지방산의 종류에 따른 ECV304 세포의 자가 사멸을 측정하였다. 또한 ECV304 세포에서 식이성 불포화 지방산의 유입에 의해 생성되는 지질 과산화물인 4-HNE+MDA (4-hydroxynonenal+malondialdehyde), 4-HNE 및 MDA를 각각 50uM로 처치한 것과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 세포독성은 지방산을 처치 후 12, 24, 48시간 배양한 결과 DHA 처치군이 LA와 AA 처치군 보다 세포 사망률이 높게 나타났다.
- 2) 세포의 형태학적 변화는 LA 및 AA 처치군에 비해 DHA 처치군의 변화가 가장 크게 나타났다. 지질 과산화물 중에서 4-HNE 처치군의 세포 형태는 MDA 처치군에 비해 변화가 크게 나타났고, DHA 처치군과 유사한 양상을 나타냈다.
- 3) 세포내 지방산의 조성 변화는 다음과 같다. 각각의 처치한 지방산은 세포내 유입이 잘 이루어졌고 유입률은 배양시간에 따라 차이를 나타내었다. 12시간 배양한 DHA 처치군과 24시간 배양한 LA 처치군의 지방산 유입률이 가장 높았다. 또한 처치한 지방산의 종류에 따라 P/S 비율과 ω -3/ ω -6 비율이 변하였다. 즉, LA 처치군은 DHA 처치군에 비해서 P/S 비율이 높았고 ω -3/ ω -6 비율은 낮았다.
- 4) 지질 과산화물(4-HNE+MDA)은 생성은 LA 및 AA 처치군에서 대조군에 비해 차이가 없었으나 DHA 처치군은 대조군에 비해

10배 증가되었다. 결과적으로 ω -3 지방산이 ω -6 지방산 보다 또는 불포화도가 높은 지방산이 낮은 지방산 보다 과산화물의 생성이 증가되는 것을 보여주었다.

5) 지질 과산화물에 의한 세포 사망률을 조사한 결과는 다음과 같다. 4-HNE와 MDA를 1:1로 혼합한 50uM, 100uM, 200uM의 4-HNE+MDA를 ECV304 세포에 처치한 결과 대조군에 비해 세포 사망률이 유의적으로 증가하였다. 같은 결과로 50uM, 100uM, 200uM의 4-HNE를 ECV304 세포에 처치한 결과도 대조군에 비해 세포사망률이 유의적으로 증가하였다. 반면 50uM, 100uM, 200uM의 MDA 처치군의 세포 사망률은 대조군에 비해 농도나 시간에 의존적이지 않았다. 그러므로 지질 과산화물의 대부분을 MDA가 차지하고 있다고 하더라도 직접적인 세포 사멸은 4-HNE에 의해 유도된다고 볼 수 있다.

6) 세포내 처치한 지방산의 유입으로 생성된 지질 과산화물이 세포 사멸에 미치는 영향을 연구하기 위해 caspase-3 활성도를 측정하였다. LA, DHA, AA 처치군은 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하였다. 특히 DHA 처치군은 다른 군에 비해 caspase-3 활성도가 1.5~3배 정도 높았다. 한편 4-HNE 처치군은 모든 시간대에서 MDA 처치군보다 caspase-3 활성도가 높았고, MDA 처치군은 LA, DHA, AA 처치군에 비해 활성도가 낮았다. 그러므로 지방산의 caspase-3 활성도의 증가는 지질 최종 과산화물 중 MDA 보다는 4-HNE에 의한 것으로 나타나며, DHA 처치군의 높은 세포 사멸률은 증가한 4-HNE에 의해 야기된 것으로

로 예상된다.

이와 같이 인체 혈관 내피세포에서 DHA는 LA 및 AA에 비해 과산화 물의 생성을 증가시켰다. 특히 생성된 과산화물 중 4-HNE는 MDA에 비해 caspase-3 활성도를 증가시켜서 ECV 304 세포의 자가 사멸을 유발하였다. 따라서 고농도의 DHA는 LA 와 AA보다 혈관 내피세포의 자가 사멸을 유도하여 결과적으로는 동맥경화의 원인이 될 것으로 예상된다.

향후 지방산 연구로서 자가 사멸을 일으키는 기전을 자세히 밝혀 볼 필요가 있으며, 최근에 발표되고 있는 DHA의 과산화물의 생성이 불포화도 및 불포화 위치에 기인하는지 혹은 탄소 수에 의한 것인지 확인하기 위해 DHA와 탄소수가 같은 DPA(Docosapentaenoic acid, C22:5 ω -6)와 비교하여 연구할 필요가 있다.

목 차

논문개요

I 서론	1
II 재료 및 방법	7
1. 실험재료	8
2. 인체 혈관 내피 세포(Human vascular endothelial cell, ECV304)의 배양	8
(1) 세포배양	8
(2) 실험처리	9
3. 세포 형태학적 관찰	9
4. 생화학적 검사	10
(1) Cell Extract	10
(2) 세포 독성을	10
(3) ECV304 세포의 지방산 조성	11
① 지질 추출	11
② Methyl ester화	12
③ Gas Chromatography(GC)에 의한 지방산 분석	12
(4) 지질 과산화물(Lipid peroxidation, 4-HNE+MDA)	15
(5) caspase-3 활성도	15
(6) 단백질 함량	16
4. 통계처리	16

III. 연구 결과 및 고찰	17
1. 세포 형태학적 변화	17
2. 세포 독성을	19
3. 지방산 조성	26
4. 지질 과산화물(Lipid peroxidation, 4-HNE+MDA)의 양	34
5. 4-HNE 및 MDA 처리에 따라 혈관 내피 세포의 사멸	38
6. caspase-3 활성화도	43
IV. 요약 및 결론	39

참고문헌

ABSTRACT

Lists of Table

Table 1. Instrument and operating conditions of GC	14
Table 2. Effects of incubation time of various concentrations and different types of fatty acids on ECV304 cells	22
Table 3. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the various concentrations of fatty acid with different types.	24
Table 4. fatty acid composition on total ECV304 cell by treatment of fatty acid types at 12hr incubation	31
Table 5. Individual fatty acid composition on ECV304 cell by treatment of fatty acid types at 24hr incubation	32
Table 6. Individual fatty acid composition on ECV304 cell by treatment of fatty acid types at 48hr incubation	33
Table 7. Total LPO(4-HNE+MDA) concentration on ECV304 cells by different type of fatty acids and various final lipid product of lipid various times	36
Table 8. Effects of incubation time of various concentrations final product of 4-HNE+MDA on ECV304 cells	40
Table 9. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations of 4-HNE on ECV304 cells	41

Table 10. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations of MDA on ECV304 cells	42
Table 11. caspase-3 activity on ECV304 human endothelial cell treated different types, various products of fatty acids and incubation times	46

List of Figure

Figure 1. Experimental design	7
Figure 2. Effects of 100uM LA, DHA, AA and 50uM 4-HNE and MDA on the cell morphology of ECV304 cells at different incubation times	18
Figure 3. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times various concentrations of fatty acids with different types	23
Figure 4. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the various concentrations of fatty acids with different type	25
Figure 5. Total LPO(4-HNE+MDA) concentration in ECV304 cells by different types of fatty acid according to incubation times (uM/1mg protein)	37
Figure 6 Total LPO(4-HNE+MDA) concentration in ECV304 cells by different types of final metabolites of lipids according to incubation times (uM/1mg protein)	37
Figure 7. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations 4-HNE+MDA on ECV304 cells	40
Figure 8. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations 4-HNE on ECV304 cells	41

Figure 9. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations MDA on ECV304 cells	42
Figure 10. Cascade cell signaling of apoptosis by oxidative stress	43
Figure 11. caspase-3 activity of ECV304 cells treated different types of fatty acid and incubation times	47
Figure 12. caspase-3 activity on ECV304 cells treated 4-HNE and MDA and incubation times	47
Figure 13. caspase-3 activity of ECV304 cells treated different types of fatty acids (12h)	48
Figure 14. caspase-3 activity of ECV304 cells treated different types of fatty acids (24h)	48
Figure 15. caspase-3 activity of ECV304 cells different types of fatty acids (48h)	48

I. 서론

보건복지부의 국민 영양 조사결과에 의하면 한국인의 평균 지방 섭취량은 해마다 증가하여 1992년에는 총 열량에 대한 지방 섭취율이 16.6%에 불과하였으나, 1995년에는 18~22%로 급격히 증가하였다.¹⁾ 더욱이 통계청의 ‘한국인의 사망원인 통계연감’에 의하면 1983년부터 1993년까지 추정된 결과 뇌혈관 질환과 심혈관 질환으로 인한 사망이 10만 명당 83.8명으로 남녀모두에서 1위를 기록하였고²⁾, 2003년 통계청의 [사망원인 통계결과]에 의하면 뇌혈관 질환이 10만 명당 75.5명, 심장질환이 10만 명당 35.6명으로 10년 전보다 뇌혈관질환은 7.0명, 심장질환은 6.7명 감소하긴 했지만, 여전히 남녀모두에서 ‘암’ 다음으로 한국인 사망률의 직접적인 원인이 되고 있다.³⁾ 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 최근의 역학연구에서 직접적인 원인으로 식이 지방산(콜레스테롤이나 불포화 지방산)이 동맥경화 발생률에 관여하고 있음을 발표하였다.⁴⁻⁶⁾

식이 지방산은 혈중 지질 수준과 세포막의 지방산 조성을 변화시켜 많은 에이코사노이드 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 식이 지방산의 섭취량과 종류는 질병과 관련되어 많은 연구가 선행되어 왔다.⁷⁾ 식이 지방산의 산화적 스트레스로 생성되는 자유기(free radical)는 low density lipoprotein(LDL)을 산화시키고, 동맥벽에 콜레스테롤을 부착시켜 동맥혈관을 손상시킴으로서 최종적

으로는 동맥경화를 유발시킨다고 알려져 있다.⁸⁻⁹⁾ 일반적으로 포화 지방산은 혈중 콜레스테롤을 증가시키지만 고도 불포화 지방산 (PUFA : polyunsaturated fatty acid)은 혈청 내 콜레스테롤 량과 LDL 콜레스테롤 량을 감소시킨다고 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 포화지방산의 혈청 콜레스테롤 증가효과는 lauric acid(C12:0), myristic acid(C14:0) , palmitic acid(C16:0)에 의한 것이며 stearic acid(C18:0)나 탄소수가 12개 미만인 포화지방산은 혈청 콜레스테롤에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다.¹⁰⁾ 고도 불포화 지방산은 소장에서의 콜레스테롤 흡수를 저해하고¹²⁾, 담즙으로의 콜레스테롤 분비를 증가시키며¹³⁾, 간에서의 콜레스테롤 합성을 감소시키고¹³⁻¹⁴⁾, 간 LDL 수용체를 상향 조절함으로써¹⁵⁻¹⁶⁾ 혈장 LDL의 제거율을 상승시켜 혈장 내 LDL-콜레스테롤의 농도를 감소시킴으로서 동맥경화를 예방한다고 알려져 있다¹⁶⁾. 이러한 혈장 콜레스테롤 저하 효과는 고도 불포화 지방산 중에서도 ω -3 지방산과 ω -6 지방산에 따라 그 효과가 다르다는 보고들이 많다. 많은 연구에서¹⁷⁻²⁰⁾ ω -6 지방산 식이의 섭취보다 ω -3 지방산 식이를 섭취할 때 혈청 콜레스테롤 함량이 더 낮았다고 한다. 반면에 ω -6 지방산 식이와 ω -3 지방산 식이 섭취 간에 차이가 없었다는 보고도 있어²¹⁾ ω -3 지방산의 혈청 콜레스테롤 저하효과는 여전히 논란이 많다.

ω -6계열의 LA를 많이 섭취하면 인지질 중에 AA의 함량이 증가되고, 혈소판에서 TXA₂의 생산이 증가되며, 이것이 혈관 내의 혈소판응집 및 혈관수축작용을 일으켜서 동맥경화증과 관련된 혈전증과 심근경색증 등의 혈전성 질환을 일으키기 쉬운 반면에 ω -3계열의 LNA나 EPA, 그리고 DHA를 섭취하면 이것들의 대사산물인 PGI₃와 TXA₃가 AA의 대사산물인 PGI₂와 TXA₂의 생성을 억제한

다고 알려져 있다.²⁵⁾ 또한 EPA에서 생산되는 TXA₃는 AA에서 생산되는 TXA₂보다 혈소판응집 및 혈관수축작용은 미약하지만 PGI₃는 AA에서 생산되는 PGI₂와 동등한 혈소판 응집 억제작용과 혈관 확장작용을 가지고 있기 때문에 결과적으로 ω -3 계열의 고도 불포화지방산을 섭취하면 혈소판의 응집을 억제하고, 혈전성 질환 및 동맥경화증을 예방할 수 있다고 알려져 있다.²⁴⁻²⁶⁾ 특히 어유인 DHA는 고도 불포화지방산으로 항 동맥경화 및 항암효과가 있으며 과산화물질이 많이 생성되는 것으로 알려져 있다. 특히, 뇌 조직에는 지방조직을 제외한 다른 어느 조직보다 지방산의 함량이 많고 그 중에서도 ω -3계의 DHA가 시냅스 막과 망막의 광수용체 바깥 체질에 많이 함유되어 있다고 알려져 있다.²⁶⁻²⁷⁾ 또한, ω -3지방산이 결핍된 쥐를 대상으로 한 실험에서 행동발달 정도가 정상 군에 비해 현저히 떨어졌고 DHA와 행동발달 능력사이에 양의 상관관계가 있었다고 한다.³⁰⁻³³⁾

그러나, 고도 불포화지방산의 과잉 권장량은 산화 스트레스로 작용하여 오히려 동맥경화의 위험인자로 지적되어왔다.³⁴⁻³⁶⁾ 고도 불포화 지방산 특히 식이 내 ω -3 지방산은 다른 지방산에 비해 지방산 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중결합을 지니고 있으므로 체내 외에서 산화되어 자유기와 과산화물을 생성할 가능성이 높으며³⁴⁾ 생성된 과산화물은 세포막 파괴, 지단백질의 산화, 체조직의 노화, 암 및 여러 종류의 퇴행성 질환을 일으켜 생체에 치명적인 영향을 줄 수 있다고 보고되었다.³⁵⁻³⁶⁾ 특히 어유의 섭취로 혈청과 간의 과산화물 생성이 증가되었다.³³⁾ 이는 어유 지방산 자체나 그 지방산식이를 먹은 동물의 체 조직은 지질 과산화물에 대해 더 약하다는 것을 말해주는 것이다.³⁴⁾ 이렇게 어유식이가 체내에서 더

쉽게 산화되는 이유는 비타민 E 함량이 1IU/g oil 정도³⁵⁾ 로 불포화도가 높은 다른 기름(종실유)에 비해 천연 항산화제가 적으며³⁶⁾ 어유에는 특히 C 20 이상의 고도로 불포화되고 불안정한 ω -3 지방산을 많이 가지고 있으며, 이러한 지방산들은 산화작용에 더 민감하기 때문이라고 한다.³³⁻³⁴⁾

식이성 불포화지방산의 주된 과산화 생성물 형태인 MDA는 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.³⁵⁾

식이성 불포화 지방산의 또 다른 과산화 생성물 형태인 4-HNE는 1980년, Esterbauer 연구팀에 의하여 처음으로 생체 내 독성을 가지는 conjugated acetaldehyde 물질로 발견되었으며 같은 팀에 의하여 4-hydroxy-2E-nonenal 로 확인 되었고 crotonaldehydes, acrolein, 4-oxononenal 등이 4-HNE외의 다양한 지질 과산화물로 알려졌다.³⁶⁻³⁷⁾ 그러나, 4-HNE가 생체내 생성될 뿐만 아니라 식이성 요인의 지질 과산화물 표지자로서 혹은 DNA adduct 물질로써 작용하는 것이 밝혀진 것은 아주 최근이다.³⁸⁾ 4-HNE와 관련된 기관에 관한 연구는 뇌조직과 간 Kupffer 세포 등이 가장 많고 동맥경화와 관련된 연구는 다양하지 못하다.³⁹⁾

신체를 구성하고 있는 기본단위인 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 조절하는데 이 중에서 능동적인 죽음을 자가 사멸 또는 프로그램 세포 사멸이라고 한다.⁴⁰⁾ 이 과정에서 원하지 않거나 손상을 입은 세포는 제거된다. 이러한 자가 사멸은 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.⁴¹⁻⁴²⁾ 현재까지 잘 알려져 있는 자가 사멸 경로로는 *TNF* 수용체를 통한 것과 *Fas* 수용체를 통한 것을 들 수 있다.⁴³⁾ 이 수용체에 *TNF α* 또는 *Fas ligand*가 결합될 경우 caspase 경로를 통해 자가 사멸이 유도된다고 알려져 있다.. 이 때 caspase-3 는 이와 같은 경로에서 중심적인 역할을 담당한다고 한다. 즉 caspase-3은 세포질에 존재하는 DNase를 활성화시켜 핵 내로 이동시킴으로써 염색체 DNA의 분절화를 초래케 하므로 caspase-3의 활성도를 측정하여 자가 사멸 정도를 파악할 수 있다고 한다.⁴⁴⁾

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 식이성 불포화지방산의 주된 과산화 생성물 형태인 4-HNE와 MDA를 이용하여 살펴보고자 한다. 이에 따른 이 연구의 세부 목적은 1) 세포 지방산 조성의 변화, 2) 세포 증식에 있어서 과산화물 생성이 미치는 영향, 3) 생성된 과산화물의 종류에 따른 세포 증식률 변화, 4) 자가 사멸을 유발하는 기본적인 기전을 알기위해 시행하는 caspase-3 활성도의 변화를 관찰하고 이를 종합하여 LA, DHA,

AA 의 종류에 따라 생성되는 지질과산화물이 혈관내피세포의 증식과 혈관 내피세포에 미치는 자가 사멸 영향 등을 살펴보고자 하는 것이다. 이를 통하여 ω -3계열의 식이성 불포화지방산 DHA가 동맥경화의 발생 및 억제에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

II. 재료 및 방법

본 연구는 인체 혈관 내피세포(ECV304)에 식이 불포화지방산인 LA(C18:2, Linoleic acid), DHA(C22:6, Docosahexaenoic acid), AA(C20:4, arachidonic acid)를 처리한 후 세포형태학적 변화, 세포독성, 지질 과산화물의 종류와 함량, 세포막의 지방산조성, caspase-3 활성도를 측정하여 ECV304 세포의 자가 사멸을 측정하였다. 식이성 불포화 지방산의 세포내 유입에 의해 생성되는 지질과산화물인 4-HNE+MDA, 4-HNE, MDA를 각각 처리한 것과 비교하였다.

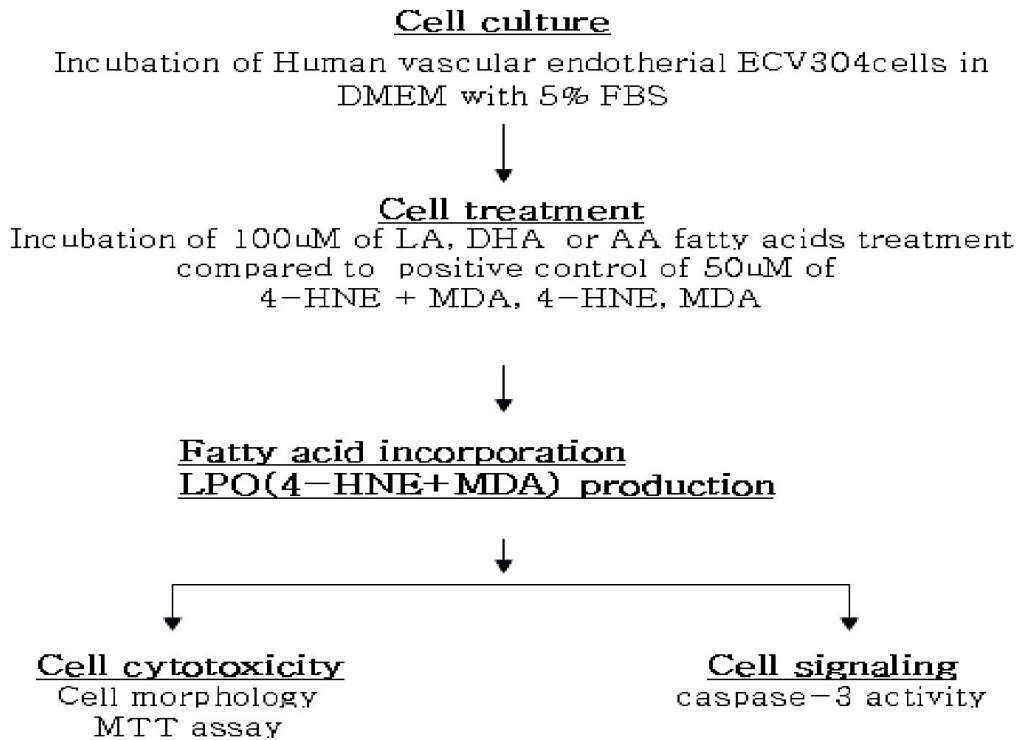


Fig 1. Experimental design

1. 실험재료

본 연구에서 사용되는 DMEM(Dubelcco's Modified Eagle Medium), antibiotics(penicillin-streptomycin), FBS(fetal bovine serum), trypsin-EDTA는 GIBCO BRL(Ithersburg, MD U.S.A)에서 구입하였다.

배지에 첨가되는 sodium bicarbonate 및 지방산 처치를 위한 LA, DHA, AA와 dimethyl sulfoxide(DMSO), PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4), trypan blue(0.4%)는 sigma사로부터 구입하였고, 세포증식률 측정을 위한 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dienyl trazolium bromide)도 sigma사로부터 구입하였다. 지질 과산화물 처치를 위한 4-HNE와 MDA는 Calbiochem으로부터 구입하였다. 단백질 정량을 위한 시약으로 coomassie blue와 소 혈청 단백질(bovine serum albumin : BSA)은 Bio-Rad 제품을 이용하였다.

2. Human endothelial cell (ECV304 cell) 의 배양

(1) 세포 배양

Human vascular endothelial cell(ECV304 cell)은 JCRB에서 분양받아 사용하였다. ECV304 세포는 5% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)을 함유하는 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

배지의 pH는 sodium bicarbonate(3.7g/l)를 사용하여 7.2~7.4로 조정하였으며 항생제로는 penicillin-streptomycin, 10 ml/l 를 사용

하였고, 세포 배양 접시에 80% 정도의 세포가 자라면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였으며, 실험 시에는 일정 수의 세포를 배양하여 사용하였다. 계대배양은 5회 이상하지 않았다.

(2) 지방산 처리

각 군별로 세포 배양 접시에 세포를 1×10^6 cell씩 일정하게 분주하였고 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 지방산은 단백질 복합체로 만들어 종류별로 배지에 첨가하고, LPO와 4-HNE, MDA도 배지에 첨가하였다. 대조군은 아무것도 첨가하지 않았다. 첨가한 지방산은 LA, DHA, AA의 처리 농도는 100uM이었고, 첨가한 지질과산화물은 4-HNE와 MDA의 처리 농도는 50 uM이었다.

3. 세포 형태학적 관찰

지방산과 과산화물이 처리된 세포의 형태는 AXIOVERT 25 현미경으로 관찰하였다.($\times 200$, ZEISS)

각 군별로 배양 접시에 세포를 1×10^6 cell씩 일정하게 분주하여 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 지방산은 단백질 복합체로 만들어 종류별로 배지에 첨가하고, 4-HNE와 MDA도 배지에 첨가한 후 배양 12, 24, 48 후 Dish의 배지를 제거하기 바로 직전에 현미경으로 세포형태를 관찰하였고, 현미경에 부착된 카메라($\times 200$, ZEISS, CONTAX olympus)로 촬영하였다.

4. 생화학적 검사

(1) Cell Extract

배양 12, 24, 48시간 후 배지를 제거하고 PBS(pH 7.2~7.4)로 2회 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 모은 뒤 원심 분리하여(2000 rpm, 3 min) cell pellet을 얻었다. 여기에 PBS 1ml을 가하고 얼음 상에서 한 sample당 5초씩 3번 세포를 파쇄 시켜 세포 분쇄액을 얻었다. 지질과산화물의 종류와 함량, 단백질 정량 등은 -80°C에서 냉동 보관하며 실험에 이용하였다.

(2) 세포의 증식률

고농도의 식이불포화 지방산과 지질 과산화물 처치에 의한 세포증식률 변화는 MTT 법을 이용하였다.

Paull등이 고안한 non-radioactive 방법인 MTT의 측정 원리는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dienyl trazolium bromide)가 미토콘드리아내의 dehydrogenase 활성에 의하여 분해됨으로써 보라색 염(formazan salt)을 생성하는 성질을 이용한 것이다. 보라색 염의 생성량은 대사적으로 활성(metabolically activity)을 갖는 생세포의 수와 비례하므로 보라색으로 발색되는 흡광도를 측정하여 세포 사망율을 측정하는 방법이다.

96well plate에 ECV304 세포를 혈청이 포함된 배지로 균질하게 한 후 5×10^4 cells를 각각의 well에 피펫을 이용하여 분주하였다. 24시간 배양 하였을 때 세포의 균집이 70% 정도 되었으며, 이때 배지를

제거하고 100 uM의 LA, DHA AA와 50 uM의 4-HNE 와 MDA를
혈청이 없는 배지에 용해시켜 well 에 분주하였다. 12, 24, 48 시간에
걸쳐 세포를 배양한 후 MTT 시약 10 μ l(5 mg/ml in PBS)를 첨가하
고, 37°C에서 배양기에서 3시간동안 배양한 뒤 배지를 모두 제거한
후 acid-isopro
panol(0.04M in isopropanol) 100 μ l를 넣고 증류수 100 μ l를 넣어 혼
합한 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) ECV304 Cell의 지방산 조성

① Total lipid 추출

지방산으로 처리하고 수집된 세포 분쇄액 1 ml을 Folch⁴¹⁾법에 따라
지질을 추출하였다. 세포 분쇄액을 screw cap tube에 10 ml의
chloroform/methanol (2:1, v/v) 첨가하여 1분간 vortex mixer로 혼
합하였으며 냉암소에서 15시간 이상 방치한 다음 여과지(Whatman
paper #2)로 여과하였고, 5ml의 chloroform/methanol (2:1, v/v) 용
액을 더 첨가하여 여과하였다. 0.9% NaCl solution 3 ml를 넣고
vortex하였다. 2,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층 액을 버리
고 하층 액에 chloroform, methanol, 0.9% NaCl solution을 3:47:48
로 제조한 용액 1 ml을 첨가하여 세척한 후 상층액을 제거하였다.
뚜껑을 연 상태로 70°C이상의 항온수조에서 chloroform을 날려 지
질을 추출하였다.

② Methyl ester화

추출한 지질에 BF_3 -methanol(Boron trifluoride-methanol, Sigma Co. #B-1252) : methanol : Benzen = 10 : 22 : 8 으로 제조한 methylation reagent을 7 ml 첨가하였다. 이때 Heptadecanoic acid(Sigma Co. #H-3500) 1mg을 2, 2, 4-trimethyl-pentane-(Sigma Co. #T-5053) 10ml에 녹여서 internal standard로 gas chromatography의 정량 분석을 위해 $200\mu\text{l}$ 첨가하였다. 질소 가스를 실험관에 충전 한 후 100°C 로 미리 예열한 heating block에 90분 동안 반응시켜 methylation 시켰다. 90분간의 반응시간 후 상온에서 방치시켜 benzen과 2차 증류수를 넣어 2,000rpm 10분간 원심 분리하였으며. 원심분리 후 상층액을 취해 갈색 vial에 담아 질소가스로 건조시켰다.

③ Gas Chromatography(GC)에 의한 지방산 분석

ECV304 세포의 지방산 조성은 Gas chromatography(Hewlett Packard 6890 series)를 사용하여 분석하였고 분석 조건은 Table 1에 나타내었다. 질소가스로 건조시킨 건조물에 hexane $5\mu\text{l}$ 를 넣어 녹인 후 GC Injector에 주입시켜 지방산을 분석하였다. 각 지방산은 standard인 lipid standard(Sigma Co. #189-19)와 octadecadienoic acid conjugated methyl ester를 각각 Hexan으로 희석한 후 1:1로 혼합한 것을 Table 3에 나타낸 조건에서 얻은 retention time과 비교하여 확인하였다. 각각의 지방산의 면적은 총 지방산에 대한 면적 백분율(area % of total fatty acid)로 계산하고, 이때 internal

standard로서 사용된 Heptadecaenoic acid(C17:0)를 기준으로 각 지방산의 함량을 구하였다.

Amount of fatty acid

= Peak area of fatty acid/Peak area of Heptadecaenoic acid

×Amount of Heptadecaenoic acid added during transmethylation

Table 1. Instrument and operating conditions of GC

Instrument	Hewlett Packard 6890 series
Integrator	Hewlett Packard 3390A integrator
Column	Supelcowax-10 capillary column (30m×0.32mm×0.25 μ m)
Detector	Flame Ionization Detector(FID)
Carrier gas	N ₂
Injection port temperature	220 $^{\circ}$ C
Detector port temperature	275 $^{\circ}$ C
Column flow rate	1ml/min
Split ratio	splitless
Oven temperature	initial 150 $^{\circ}$ C/min, 2min hold increase at the rate of 1.5 $^{\circ}$ C/min to 230 $^{\circ}$ C increase at the rate of 8 $^{\circ}$ C/min to 250 $^{\circ}$ C

(4) 지질과산화물(LPO : 4-HNE + MDA)함량 측정

지질 과산화 정도는 lipid peroxidation assay kit(Calbiochem, #437634)를 이용하여 측정하였다. 이는 불포화지방산으로부터 생성되는 최종과산화물 malondialdehyde(MDA)와 2-hydroxy-2(E)-nonenal(4-HNE)같은 4-hydroxy-alkenal을 동시에 측정하는 방법이다. 전통적인 thiobarbituric acid(TBA) 방법에 의한 MDA의 측정법은 많은 상호물질에 의해 영향을 받고 재현성이 떨어지므로 MDA와 4-HNE를 동시에 측정하였다.

N-methyl-2-phenylindole이 45°C에서 MDA와 4-hydroxy-alkenal들과 반응하여 발색하는 원리를 이용하여 spectrophotometer (Pharmacia) 586nm에서 흡광도를 측정하여 1 mg protein에 해당하는 값으로 환산하였다.

(5) Caspase-3 활성도 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 1:1 이 되도록 처치한 후 37°C에서 4시간 이상 incubation한 다음 spectrophotometer(Pharmacia) 405nm에서 흡광도를 측정하여 1 ug protein에 해당하는 값으로 표기하였다.

(6) 단백질 정량

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

4. 통계처리

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

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

1. 세포형태학적(Cell morphology) 변화

처리된 지방산과 지질 과산화물 및 배양시간에 따른 인체 혈관 내피 세포의 변화를 관찰한 결과는 Fig 2와 같다. 대조군은 배양 시간이 지남에 따라 세포의 증식이 나타났고, LA 와 AA 처리군은 유사한 경향으로 배양시간이 증가함에 따라 자가 사멸적 세포 사멸이 나타났다. 특히 48시간 배양 후 이와 같은 현상이 뚜렷했다.

DHA 처리군은 12시간 배양 후부터 세포막이 붕괴되어 자가 사멸적 세포사멸이 뚜렷하게 나타났고, 48시간 배양 후에는 살아있는 세포가 거의 없는 것이 관찰됐다. 4-HNE 처리 군은 DHA 처리군과 유사한 경향으로 나타났으며, DHA 처리군보다 좀 더 세포 사멸이 심하게 나타났다. MDA 처리군은 대조군과 유사한 경향으로 배양 시간이 지남에 따라 세포의 증식이 나타났다. 즉, 대조군에 비하여 LA 및 AA 처리군은 자가 사멸적 세포 변화가 나타났고, 가장 심각한 세포 형태학적 변화는 DHA 처리군 에서 나타났다. 이것은 지질 과산화물 중 4-HNE를 50uM로 처리한 군과 비슷한 형태를 나타냈다. 반면 지질 과산화물 중 MDA를 50uM로 처리한 군에서는 심각한 세포 형태학적 변화가 나타나지 않았다.

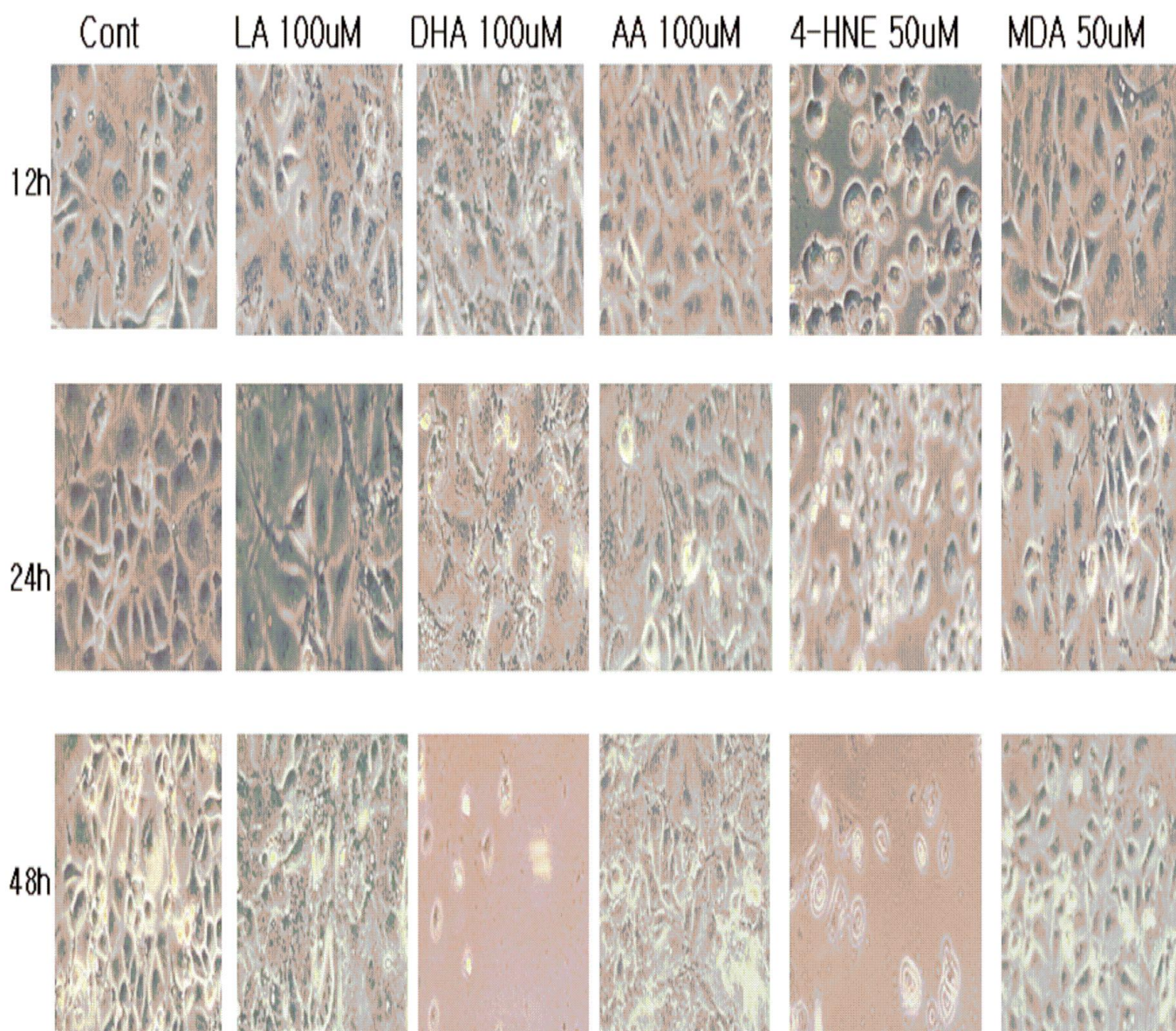


Fig 2. Effect of 100uM LA, DHA, AA and 50uM 4-HNE and MDA on the cell morphology of ECV304 cells at different incubation times.

2. 세포 사망(Cell Death)률

처리된 지방산과 지질 과산화물 및 배양시간에 따른 ECV304 세포의 독성을 MTT 법을 이용하여 측정하였는데, 지방산 처리 12, 24, 48시간 후에 각각 MTT시약을 넣고 3시간 배양한 후에 ELISA reader로 측정하였다. 지방산의 종류와 배양시간에 따른 결과는 Table 2와 Figure 3에 나타내었으며, 농도에 따른 세포 사망률은 Table 3 과 Figure 4에 대조군에 대한 % of control로 나타내었다.

(1) 지방산별 배양시간에 따른 영향

배양시간에 따른 세포 사망률의 변화에 있어서 50uM LA 처리군 에서는 배양시간이 증가함에 따라 대조군에 비해 세포 사망률이 증가했으나 24시간에 비해 48시간 배양시 세포 사망률이 감소했다. 100uM LA 처리군과 200uM LA 처리군은 배양시간이 증가함에 따라 대조군에 비해 세포 사망률이 증가했다. 50uM DHA 처리군 에서는 배양시간이 증가함에 따라 대조군에 비해 세포 사망률이 증가했으나 24시간에 비해 48시간 배양시 세포 사망률이 유의적으로 감소했다($p=0.017$). 100uM DHA 처리군은 배양시간이 증가함에 따라 대조군에 비해 세포 사망률이 증가했다. 200uM DHA 처리군은 12시간에 비해 24시간 배양시 세포 사망률이 증가했고, 24시간에 비해 48시간 배양시 세포 사망률이 감소했다. 50uM, 100uM, 200uM AA 처리군은 모두 12시간에 비해 24시간 배양시 대조군에 비해 세포 사망률이 증가했고, 24시간에 비해 48시간 배양시 세포 사망률이 감소했으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

(2) 배양시간별 지방산 농도의 영향

지방산의 종류에 따른 세포 사망률은 Table 3 와 Figure 4에 나타내었다. 12시간 배양 시 LA 처치군과 AA 처치군은 농도가 증가함에 따라 세포 사망률이 유의적으로 감소하였고($p=0.004$), DHA 처치군은 50uM보다는 100uM의 세포 사망률이 증가했으나, 200uM DHA 처치군은 100uM DHA 처치군에 비해 세포 사망률에 차이가 없었다. 24시간 배양 시 LA 처치군은 농도가 증가함에 따라 세포 사망률이 감소하였으나 DHA 처치군은 세포 사망률이 급격히 증가하였다. 50uM AA 처치군에 비해 100uM AA 처치군은 세포 사망률이 증가하였으나 100uM에 비해 200uM의 세포 사망률은 감소하였다. 48시간 배양 시 LA와 AA 처치군의 세포 사망률은 농도가 증가할수록 감소하였으나, DHA 처치군의 세포 사망률은 농도가 증가할수록 증가하였다. 즉 12시간 배양 후 200uM의 DHA 처치군은 LA와 AA 처치군에 비해 세포사망률이 유의적으로 높았고($p=0.027$), 24시간 배양 후에도 100uM에서 DHA 처치 군이 LA와 AA 처치 군에 비해 세포 사망률이 유의적으로 높았다($p=0.021$). 48시간 배양 후에는 50uM DHA 처치군이 대조군에 비해 세포사망률이 14% 증가함으로써 LA와 AA 처치 군에 비해 세포사망률이 유의적으로 높았다($p=0.037$). 결과적으로 DHA를 세포에 처치한 군은 모든 농도에서 LA와 AA를 처치한 군보다 세포 사망률이 증가하는 경향을 나타냈다.

Terano 등 ⁴⁵⁾의 연구에서 ω -6 지방산과 ω -3 지방산은 둘다 평활근 세포의 증식을 저해하고, 특히 EPA 와 DHA는 세포주기에서 휴지기로부터 간기로 진행되는 과정을 저해한다고 했다. 이러한 효과는 세

포 안에 있는 지질과산화물의 양과 관련이 있다고 Cornwell DG 등⁴⁶⁾은 보고했다.

본 연구에서도 DHA(ω -3)의 경우 세포의 증식이 저해되었으나 LA(ω -6)의 경우는 세포의 증식이 저해되지 않았고 AA(ω -6)의 경우 DHA보다 저해효과가 낮기는 하지만 세포의 증식이 저해되었다.

Table 2 . Effects of incubation time of various concentrations and different types of fatty acids on ECV304 cells

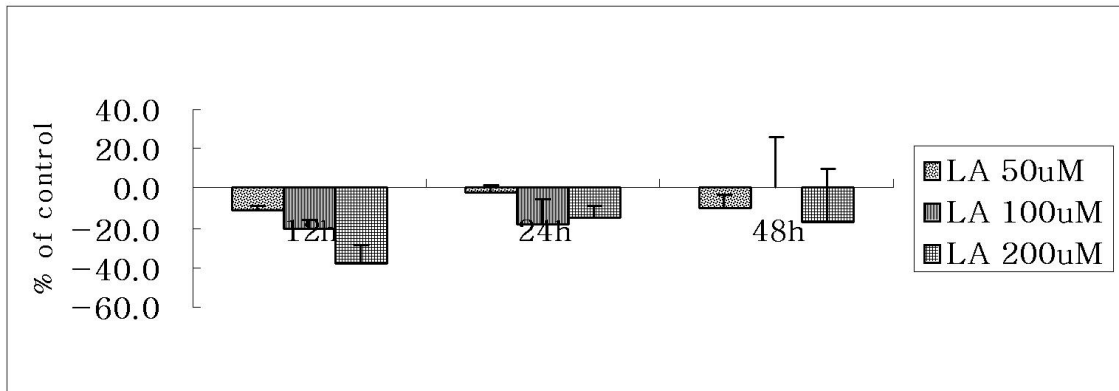
		(% of control)			
		12h	24h	48h	p-value ²⁾
LA	50uM	-11.2 ± 2.7 ¹⁾	-1.6 ± 3.2	-10.3 ± 6.9	0.082
	100uM	-20.3 ± 4.4	-18.3 ± 12.9	0.2 ± 25.8	0.328
	200uM	-38.1 ± 9.0	-14.3 ± 5.8	-16.8 ± 26.2	0.226
p-value		0.004	0.110	0.645	
DHA	50uM	-4.4 ± 5.3	27.0 ± 4.7	14.0 ± 14.5	0.017
	100uM	-12.6 ± 18.8	9.7 ± 9.4	13.3 ± 19.6	0.199
	200uM	-11.3 ± 8.7	48.5 ± 65.7	26.4 ± 9.5	0.239
p-value		0.696	0.505	0.645	
AA	50uM	6.8 ± 18.4	3.5 ± 27.5	16.8 ± 8.7	0.705
	100uM	-15.2 ± 9.0	9.0 ± 6.1	5.2 ± 13.4	0.050
	200uM	-28.3 ± 8.9	-2.5 ± 6.7	-8.6 ± 20.6	0.126
p-value ³⁾		0.041	0.714	0.200	

¹⁾ value are expressed mean ± S. D

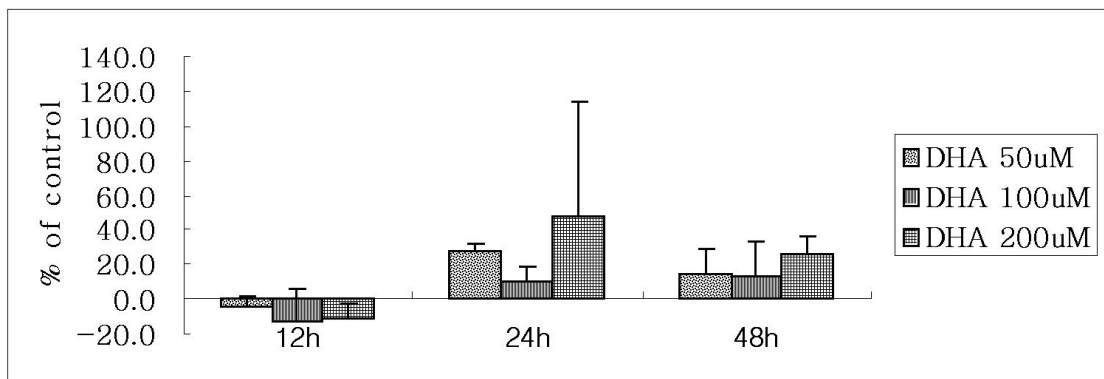
²⁾ p-values for the significance among the incubation time according to the various concentration of fatty acid

³⁾ p-values for the significance among the various concentration of fatty acid according to the incubation times

<A> LA



 DHA



<C> AA

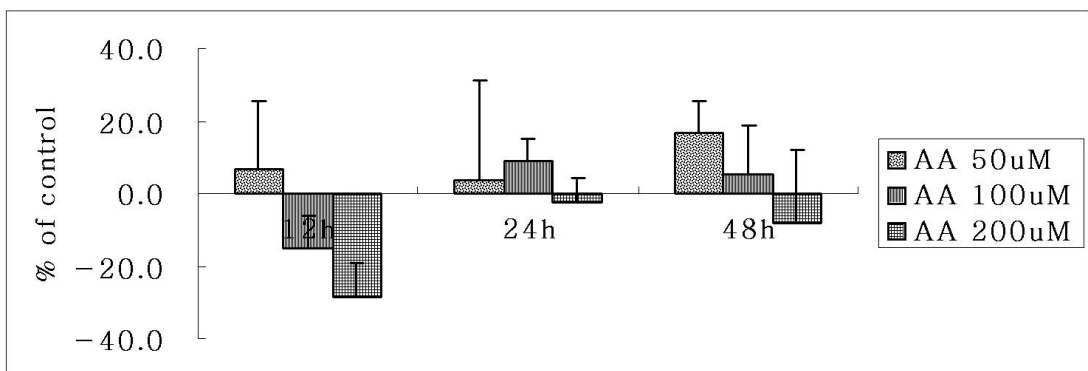


Fig 3. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations of fatty acids with different types

Table 3. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the various concentrations of fatty acids with different types.

		(% of control)			
		50uM	100uM	200uM	p-value ³⁾
12h	LA	-11.2 ± 2.7 ¹⁾	-20.3 ± 3.2	-38.1 ± 6.9 ^a	0.004
	DHA	-4.4 ± 5.3	-12.6 ± 4.7	-11.3 ± 14.5 ^b	0.696
	AA	6.8 ± 18.4	-15.2 ± 27.5	-28.3 ± 8.7 ^a	0.041
p-value ²⁾		0.216	0.746	0.027	
24h	LA	-1.6 ± 3.2	-18.3 ± 12.9 ^a	-14.3 ± 5.8	0.110
	DHA	27.0 ± 4.7	9.7 ± 9.4 ^b	48.5 ± 65.7	0.505
	AA	3.5 ± 27.5	9.0 ± 6.1 ^b	-2.5 ± 6.7	0.714
p-value		0.148	0.021	0.183	
48h	LA	-10.3 ± 6.9 ^a	0.2 ± 25.8	-16.8 ± 26.2	0.645
	DHA	14.0 ± 14.5 ^b	13.3 ± 19.6	26.4 ± 9.5	0.526
	AA	16.8 ± 8.7 ^b	5.2 ± 13.4	-8.6 ± 20.6	0.200
p-value		0.037	0.739	0.081	

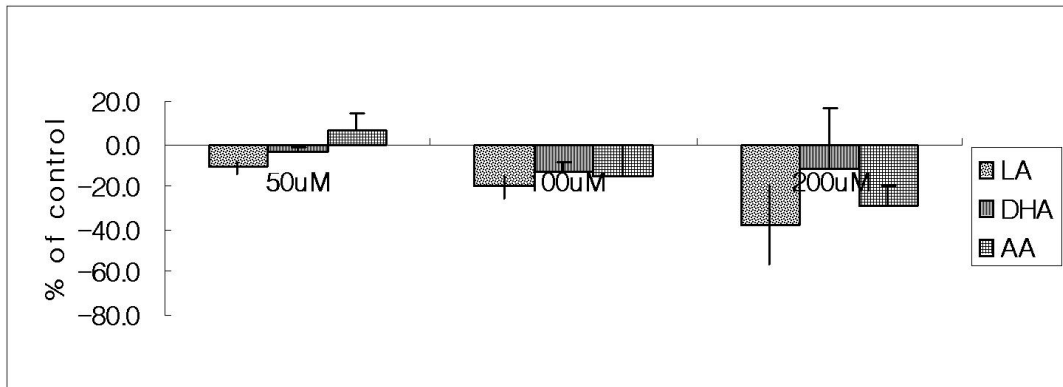
¹⁾ value are expressed mean ± S. D

²⁾ p-values for the significance among the incubation time according to the various concentrations of fatty acid

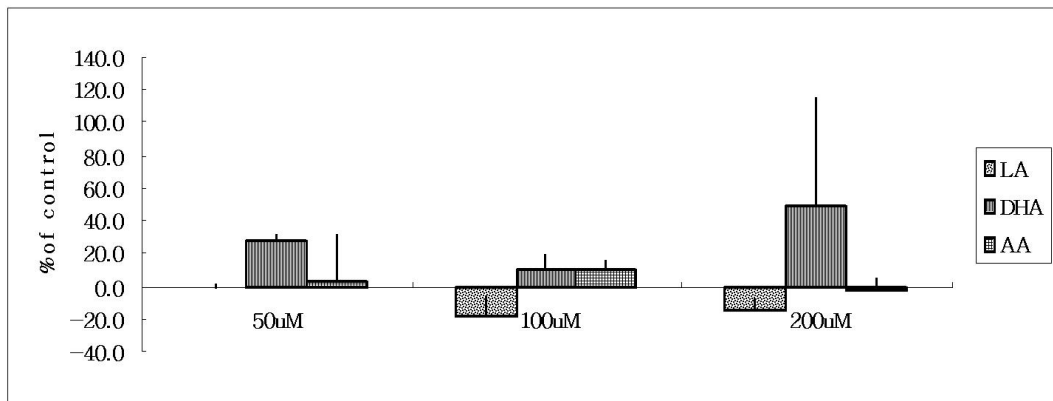
³⁾ p-values for the significance among the various concentration of fatty acid according to the incubation times

* a, b, c values with in incubation time of fatty acids groups with different concentrations are significant at p<0.05

<12h>



<24h>



<48h>

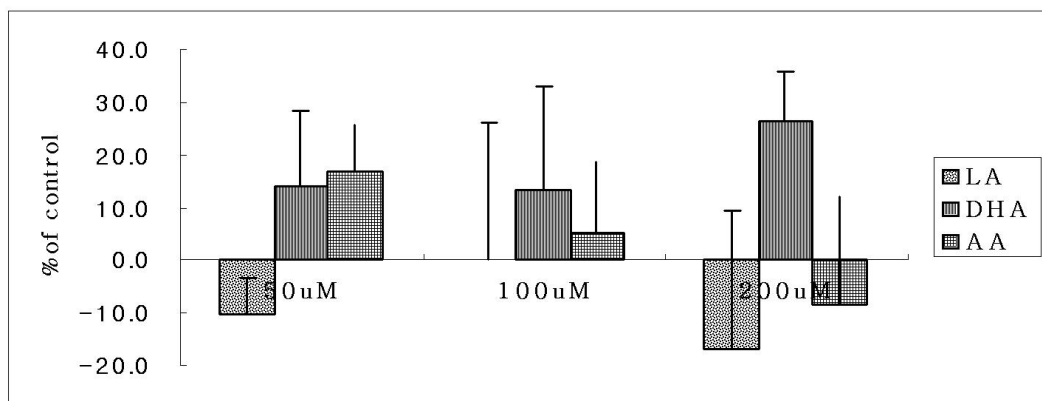


Fig 4. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the various concentrations of fatty acids with different types.

3. 지방산 조성

ECV304 세포에 지방산의 종류를 달리하여 처치한 후 12, 24, 48 시간씩 각각 배양하고 각 군별 지방산 조성의 변화를 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

ECV304 세포는 모든 시간대에서 팔미트산(C16:0)과 스테아린산(C18:0)이 총 지방산의 80%를 차지했다. 12시간 배양했을 때(Table 4) LA의 유입율을 살펴보면 LA 처치군은 대조군과 유입율이 비슷했고, DHA 처치군에서는 측정되지 않았으며 AA 처치군은 대조군보다 4.7배 유입율이 높았다. γ -LNA(γ -linolenic acid, C18:3, ω -6)의 유입율은 LA 처치군은 대조군과 유입율이 비슷했고, DHA 처치군에서는 측정되지 않았으며 AA 처치군은 대조군보다 4.7배 유입율이 높았다. α -LNA(α -linolenic acid, C18:3, ω -3)의 유입율은 LA 처치군은 대조군보다 1.5배 유입율이 높았고, DHA 처치군에서는 측정되지 않았으며 AA 처치군은 대조군의 0.6배로 유입율이 대조군보다 낮았다. Methyl methyl homogamma linolenate(C20:3, ω -6)의 유입율을 살펴보면 LA, AA 처치군은 대조군보다 유입율이 낮았고, DHA 처치군에서는 측정되지 않았다.Methyl 11,14,17-eicosatrienoate(C20:3, ω -3)의 유입율을 보면 LA 처치군에서는 측정되지 않았고, DHA 처치군은 대조군보다 2.7배가량 유입율이 높았고, AA 처치군은 대조군과 비슷한 유입율을 보였다. AA의 유입율을 살펴보면 LA와 AA 처치군에서는 측정되지 않았고, DHA와 AA 처치군이 비슷한 유입율을 보였다. DHA의 유입율은 LA 처치군에서는 측정되지 않았으며, DHA 처치군은 대조군에 비

해 30배가량 유입율이 증가하였고, AA 처치군에서는 대조군보다 유입율이 낮게 측정되었다.

24시간 배양 후 지방산 조성을 분석해 보면(Table 5) LA의 유입율을 살펴보면 LA 처치군은 대조군보다 8배가량 유입률이 증가했고, DHA 처치군과 AA 처치군은 대조군과 비슷한 유입율을 보였다. γ -LNA의 유입율은 LA 처치군은 대조군보다 2배가량 유입율이 높았고, DHA 처치군에서는 측정되지 않았으며, AA 처치군은 대조군과 비슷한 유입율을 보였다. α -LNA의 유입율은 LA 처치군과 AA 처치군에서는 측정되지 않았고, DHA 처치군은 대조군보다 1.6배가량 유입율이 높았다. Methyl methyl homogamma linolenate의 유입율을 살펴보면 LA 처치군은 대조군보다 2배가량 유입율이 높았고, DHA 처치군에서는 측정되지 않았으며, AA 처치군은 대조군과 비슷한 유입율을 보였다. Methyl 11,14,17-eicosatrienoate의 유입율을 보면 LA 처치군은 대조군의 2.8배, DHA 처치군은 대조군의 1.7배가량 유입율이 높았고, AA 처치군에서는 측정되지 않았다. AA의 유입율을 살펴보면 대조군과 DHA 처치군에서는 측정되지 않았고, AA 처치군에 비해 LA 처치군에서 유입율이 3.7배가량 높게 측정되었다. 이는 LA가 AA로 합성되는 비율이 다른 지방산 처치군보다 높으므로 DHA 처치군과의 차이는 에이코사노이드 대사의 변화에 따른 효과로도 해석할 수 있겠다. DHA의 유입율을 살펴보면 DHA 처치군에서만 총 지방산량의 1.88% 가량 측정되었고, 다른 군에서는 측정되지 않았다.

48시간 배양 후 지방산 조성의 변화는 다음과 같다.(Table 6)

LA의 유입율을 살펴보면 LA 처치군은 대조군보다 2.7배가량 유입률이 증가했고, DHA 처치군은 대조군과 비슷한 유입율을 보였지

만, AA 처치군은 대조군보다 유입율이 낮았다. γ -LNA는 대조군에서는 측정되지 않았고, DHA 처치군과 AA 처치군은 비슷한 유입율을 보였으며, LA 처치군은 다른 처치군보다 2배가량 유입율이 높았다. α -LNA는 대조군에서는 측정되지 않았으며, LA 처치군이 가장 높은 유입율 0.53%를 보였으며, DHA 처치군은 LA 처치군의 0.6배, AA 처치군은 LA 처치군의 0.16배로 유입율이 낮았다. Methyl methyl homogamma linolenate(C20:3, ω -6)의 유입율을 살펴보면 대조군에서는 측정되지 않았으며, LA 처치군이 0.53% 정도의 가장 높은 유입율을 보였고, DHA 처치군과 AA 처치군은 LA 처치군의 0.16배로 측정되어 LA 처치군보다 유입율이 낮았다. Methyl 11,14,17-eicosatrienoate(C20:3, ω -3)의 유입율은 대조군이 가장 높았고, 다른 처치군들은 대조군의 1/2 정도의 유입율을 보였으며, AA 처치군에서는 측정되지 않았다. AA의 유입율은 모든 처치군이 대조군보다 낮은 유입율을 보였다. DHA의 유입율을 살펴보면 DHA 처치군에서만 총 지방산량의 0.16% 가량 측정되었고, 다른 군에서는 측정되지 않았다.

포화지방산과 다가 불포화 지방산의 비율과 ω -3 지방산과 ω -6 지방산 조성비율도 Table4- 6에 나타내었다. 12시간 배양 후 불포화 : 포화 지방산(P/S)의 비율이 대조군 0.12에 비해 LA 처치군은 0.07로 다소 감소하였고, DHA 처치군과 AA 처치군은 0.12 와 0.1로 대조군과 비슷했다. 24시간 배양 시에는 불포화 지방산 : 포화 지방산(P/S)의 비율이 대조군 0.14 비해 LA 처치군은 0.28로 2배가량 증가하였는데 이것은 ω -6 지방산, 특히 LA의 유입율이 증가했기 때문이다. DHA 처치군은 0.14였고, AA 처치군은 0.09로 대조군과의 차이가 없었다. 48시간 배양시에는 불포화 지방산 : 포화 지

방산(P/S)의 비율이 대조군 0.37에 비해 LA 처치군은 0.21 DHA 처치군은 0.09 AA 처치군은 0.08로 대조군보다 모두 낮았다. 이것은 ECV 304 세포에 많은 CLA(C20:1 cis 10,cis 12)가 증가했기 때문으로 보여진다. ω -3/ ω -6 는 12시간에서 대조군이 0.53, LA 처치군 0.14, DHA 처치군 6.48, AA 처치군 0.37로 DHA 처치군은 대조군에 비해 12배 높았다. 이것은 12시간 배양 후 ω -3 지방산, 특히 DHA 의 유입율이 증가했기 때문이며, LA 처치군과 AA 처치군은 ω -6 지방산이 많이 유입되었기 때문이 비율이 낮게 나타났다. 24시간에는 ω -3/ ω -6 의 비율이 대조군 1.00, LA 처치군 0.22, DHA 처치군은 9.90, AA 처치군은 0.012였다. DHA 처치군은 대조군에 비해 9.9배 비율이 높았고, LA 처치군은 12시간에 비해 비율이 낮아졌다. 이것은 LA 처치군의 LA 유입률이 증가했기 때문 때문이다. 48시간에서는 모든 처치군에서 대조군보다 ω -3/ ω -6 의 비율이 낮았다.

이들 결과에서 1) ECV304 세포의 80% 이상을 차지하는 것은 팔미트 산과 스테아린 산이다. 2) 세포내 지방산 조성 중에서 LA, DHA, AA 처치군은 각각 처치한 지방산의 세포내 유입이 잘 이루어졌다. 3) 특히 LA는 24시간 배양후에 유입율이 대조군의 8배로 가장 높았고, DHA는 12시간 배양 후에 유입율이 대조군의 30배로 가장 높았다. 3) 모든 시간대에서 세포내 지방산의 조성 중 LA 처치군은 LA의 비율이 가장 높았고, DHA 처치군은 DHA의 비율이 가장 높았고, AA 처치군은 AA의 비율이 가장 높았다. 이에 따라 P/S 비율과 ω -3/ ω -6의 비율도 다르게 나타났다. 즉 LA 처치군이 DHA 처치군에 비해서 P/S 비율이 12시간을 제외하고는 모두 높

았으며, 모든 시간대에서 LA 처치군이 DHA 처치군에 비해서 ω -3/ ω -6 비율이 낮은 것을 알 수 있었다.

Table 4. Fatty acid composition on total ECV304 cell by different of fatty acid on 12hr incubation

Fatty acids	cont	LA 100uM	DHA 100uM	AA 100uM
	mg/ml(%)	mg/ml(%)	mg/ml(%)	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(ω-6)	0.26(0.29)	0.21(0.34)	0.0(0.00)	0.82(1.47)
C18:3(ω-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(ω-6)	1.21(1.33)	0.38(0.62)	0.0(0.00)	0.11(0.20)
C20:3(ω-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
ω-3/ω-6	0.53	0.14	6.48	0.37

Table 5. Fatty acid composition on total ECV304 cell by different of fatty acid on 24hr incubation

Fatty acids	cont	LA 100uM	DHA 100uM	AA 100uM
	mg/ml(%)	mg/ml(%)	mg/ml(%)	mg/ml(%)
C14:0	6.3(9.06)	2.6(2.60)	2.8(6.59)	4.9(5.30)
C16:0	33.9(48.78)	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(ω-6)	0.1(0.14)	0.4(0.40)	0.0(0.00)	(0.1)0.11
C18:3(ω-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(ω-6)	0.1(0.14)	0.3(0.30)	0.0(0.00)	0.1(0.11)
C20:3(ω-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
ω-3/ω-6	1.00	0.22	9.90	0.012

Table 6. Fatty acid composition on total ECV304 cell by different of fatty acid on 48hr incubation

Fatty acids	cont	LA 100uM	DHA 100uM	AA 100uM
	mg/ml(%)	mg/ml(%)	mg/ml(%)	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(ω -6)	0.0(0.00)	0.2(0.27)	0.1(0.16)	0.2(0.19)
C18:3(ω -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(ω -6)	0.0(0.00)	0.4(0.53)	0.1(0.16)	0.2(0.19)
C20:3(ω -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
ω -3/ ω -6	1.00	0.33	0.80	0.14

3. 지질 과산화물 함량

지질 과산화물은 암화과정에서 유리기를 생성하여 DNA의 single-strand breaks를 일으키고 DNA와 단백질과의 상호결합도 촉진한다.⁴⁷⁾ 암 촉진단계에서 이런 유전적 손상 부위가 늘어나고 유전적으로 불안정한 상태가 지속되면 악성암으로의 전환 확률은 높아진다고 보고되고 있다. 처리된 지방산의 종류에 따른 LPO(4-HNE + MDA) 생성결과를 살펴보면 12시간 배양시 DHA 처리군에서 과산화물 생성이 대조군보다 10배 증가하여 가장 높았으며(Table 7, Fig 5) LA 처리군과 AA 처리군은 대조군과 비슷한 량의 과산화물을 생성했다. 24시간 배양시 DHA 처리군에서 과산화물 생성이 대조군보다 2.7배 증가하여 가장 높았으며, LA군 처리군과 AA 처리군은 대조군과 비슷한 량의 과산화물을 생성했고, 48시간 배양했을 때는 12시간 배양했을 때와 비슷한 경향으로 DHA 처리군에서 과산화물 생성이 대조군보다 10배 증가하였다. 이것은 ω -6 지방산에 비해 ω -3 지방산을 섭취할 경우 cis 형의 불안정한 이중 결합과 지방산 자체의 불포화도로 인해 자유 라디칼과 과산화물 등의 지질과산화물이 더욱 많이 생성되어 세포에 손상을 초래했기 때문으로 본다.

지질 최종과산화물인 4-HNE와 MDA를 50 μ M로 직접 혈관내피세포에 처리한 후 LPO 생성결과를 살펴보면 12시간 배양 시 4-HNE 처리군에서 과산화물 생성이 대조군보다 30배 증가했고, 24시간 배양 시 10배, 48시간 배양 시 25배 증가했다. 반면 MDA 처리군에서는 12시간과 24시간 배양했을 때 과산화물 생성(4-HNE + MDA)은 대조군과 비슷했고, 48시간 배양했을 때 대조군의 1.3배가

량 증가했다. 조 등³²⁾의 연구에서도 ω -3 지방산 중에서도 EPA 와 DHA 가 풍부한 어유식이에서 과산화물이 더 많이 생성되었다고 보고되고 있으며, 이렇게 어유의 섭취로 간에서 과산화물이 높아졌던 것은 어유 섭취로 혈청 내 지방량이 감소한데 반해 간의 지방량에는 큰 변화가 없었기 때문이라고 보고되었다. 장 등³¹⁾의 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.

본 실험에서도 고농도의 LA나 AA처치군에 비해 DHA 처치군에서 가장 많은 지질 과산화물이 생성된 것으로 나타나 그와 유사하였다.

Table 7. Total LPO concentrations in ECV304 cells by different type of fatty acids and final metabolites of lipids according to incubation times

(uM/1mg protein)

	12h	24h	48h	p-value ²⁾
cont	^x 3.9 ± 0.4 ^{al)}	^y 4.2 ± 0.6 ^a	^z 5.0 ± 0.3 ^a	0.045
LA 100uM	^x 4.0 ± 0.3 ^a	^x 3.9 ± 1.1 ^a	^y 2.3 ± 0.6 ^a	0.050
DHA 100uM	^x 35.9 ± 12.9 ^b	^y 11.5 ± 8.0 ^b	^z 49.5 ± 15.9 ^b	0.028
AA 100uM	^x 3.0 ± 0.3 ^a	^x 3.0 ± 0.6 ^a	^y 11.2 ± 1.2 ^a	0.000
4-HNE 50uM	^x 97.6 ± 38.8 ^c	^y 46.2 ± 12.3 ^c	^z 129.9 ± 29.5 ^c	0.045
MDA 50uM	^x 3.9 ± 0.5 ^a	^x 4.0 ± 0.6 ^a	^y 8.8 ± 0.4 ^a	0.000
p-value ³⁾	0.000	0.000	0.000	

1) values are expressed mean ± S.D

2) P-values for the significance among the incubation times

3) P-values for the significance among the types of fatty acid

* x, y, z values within the treated types of fatty acids groups with different superscripts are significant at p<0.05

* a, b, c values with in incubation time of fatty acids groups with different superscripts are significant at p<0.05

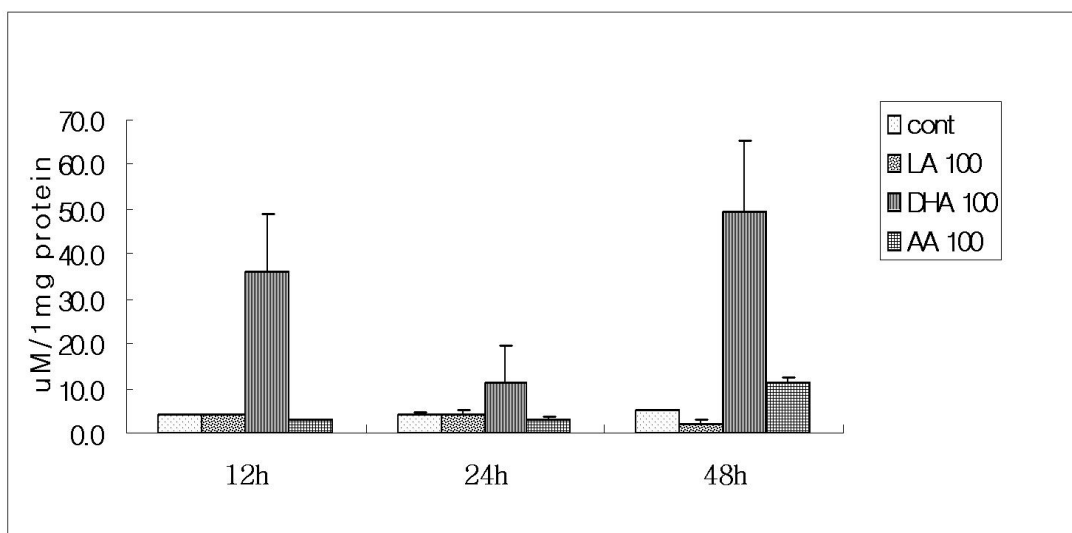


Fig 5. Total LPO(4-HNE+MDA) concentrations in ECV304 cells by different types of fatty acid according to incubation times(uM/1mg protein)

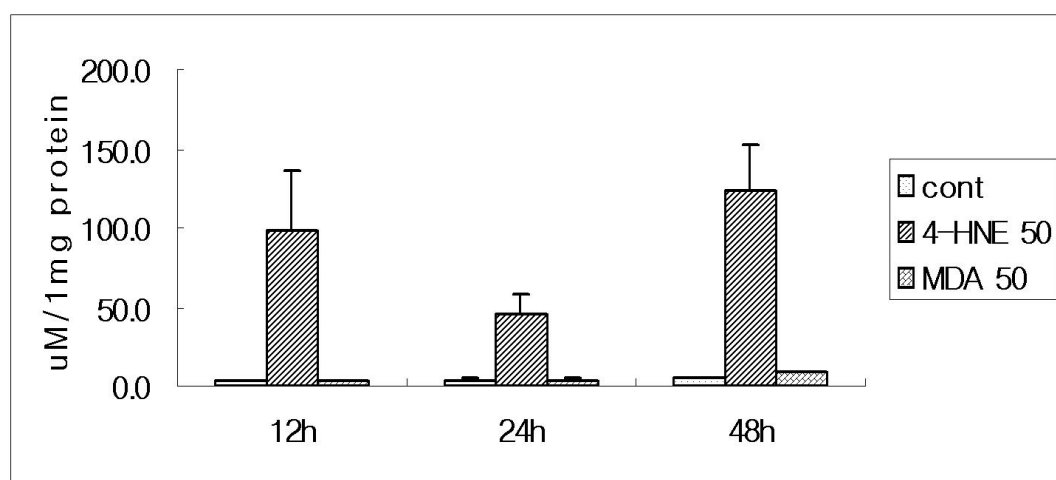


Fig 6. Total LPO(4-HNE+MDA) concentrations in ECV304 cells by different types of final metabolites of lipids according to incubation times(uM/1mg protein)

4. 4-HNE 및 MDA 처치에 따른 혈관 내피세포의 사멸

4-HNE 와 MDA는 식이성 ω -6계열 지방산과 ω -3계 지방산으로부터 생체 내에서 비효소적 반응으로 생성되며 식이성 요인의 지질 과산화물 표지자로서 산화 스트레스에 의해 동맥벽의 내피세포에 대한 자가 사멸 및 동맥경화 발생에 관여한다고 한다. 것이다. 따라서 이들을 1:1로 혼합한 4-HNE+MDA를 50uM, 100uM, 200uM 로 ECV304 cell 에 처치한 결과, 대조군에 비하여 4-HNE+MDA 50uM 12hr, 24hr, 48hr 배양하는 동안 -2.1, 6, 20% 로 4-HNE+MDA 100uM 은 8, 19, 45%로 4-HNE+MDA 200uM 은 10, 41, 69% 로 세포 사망률이 유의적으로 증가하였다.

4-HNE를 50uM, 100uM, 200uM 로 ECV304 cell 에 처치한 결과, 대조군에 비하여 4-HNE 50uM은 12hr, 24hr, 48hr 배양하는 동안 15, 16, 42%로 4-HNE 100uM은 28, 44, 68%로 4-HNE 200uM 은 41, 60, 83 % 로 세포사망률이 유의적으로 증가하였다.

조 등⁴⁸⁾ 의 연구에서 PC 12 세포 배양시 4-HNE를 첨가하여 대조군과 비교하였을때 4-HNE의 농도가 증가할수록 세포 사망률이 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과는 4-HNE가 단백질과 지질, 핵산을 포함하는 세포의 거대분자와 상호작용하는 세포와 조직에 직접적으로 해를 끼칠 수 있기 때문인데, 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

그 외에 Stephen W. Luckey and Dennis R. Petersen⁴⁹⁾의 연구에서 간세포인 Kupffer Cells 에서도 4-HNE를 0~250uM로 처치하여 2시간동안 배양하였을때 세포 독성이 나타났으며, 세포에 250uM의 4-HNE를 처치하였을 때에는 대략 세포의 15% 정도가 손실되었다.

MDA를 50uM, 100uM, 200uM 로 ECV304 cell 에 처치한 결과 대조군에 비하여 MDA 50uM은 12hr, 24hr, 48hr 배양하는 동안 세포사망이 -0.7, -2.7, -0.8% 였고, MDA 100uM 은 3.3, 0.1, 2.0%. MDA 200uM 은 7.0,-2.4 1.6%로 MDA의 세포사망률은 농도나 시간에 의존적이지 않았다. 그러므로 LPO의 대부분을 MDA가 차지하고 있다고 하더라도 직접적인 세포사망은 4-HNE에 의해 유도되는 것으로 보인다.

Table 8. Effects of incubation times and various concentrations of LPO(4-HNE+MDA) on ECV304 cells

	(%)			
	12h	24h	48h	p-value ²⁾
LPO 50 μ M	-2.129 \pm 8.7 ¹⁾	6.086 \pm 4.2	20.583 \pm 7.4	0.004
LPO 100 μ M	8.193 \pm 14.1	19.762 \pm 4.1	45.637 \pm 5.3	0.001
LPO 200 μ M	10.415 \pm 13.8	40.826 \pm 3.4	68.702 \pm 4.1	<0.0001
p-value ³⁾	NS	<0.0001	<0.0001	

¹⁾value are expressed mean \pm S. D

²⁾p-values for the significance among the incubation time according to the various concentrations of fatty acid

³⁾ p-values for the significance among the various concentration of fatty acid according to the incubation time

⁴⁾ NS : values are not significantly different between groups

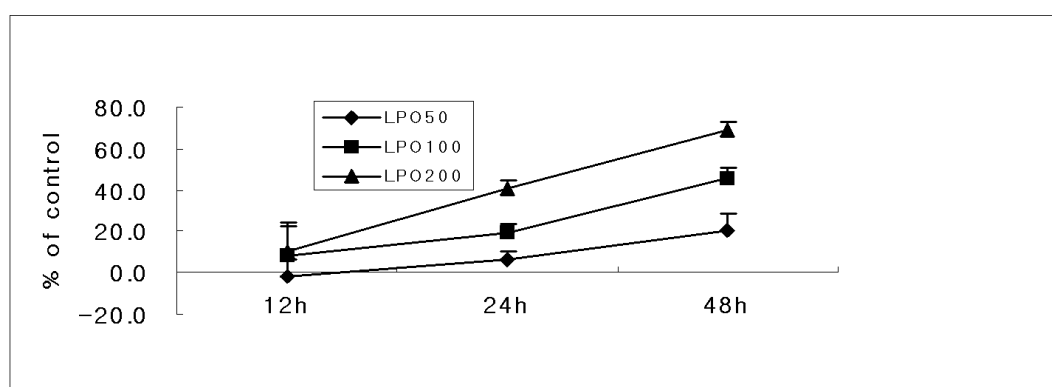


Fig 7. Rate of cell death(%ofcontrol) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations of LPO(4-HNE+MDA) on ECV 304 cells

Table 9. Rate of cell death(%ofcontrol) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations of 4-HNE on ECV304 cells

	(% of control)			
	12h	24h	48h	p-value ²⁾
4-HNE 50μM	14.883±6.0 ¹⁾	16.193±7.2	42.124±3.4	0.004
4-HNE 100μM	27.583±2.1	43.591±7.2	68.417±3.3	0.001
4-HNE 200μM	41.348±1.5	56.959±1.5	83.018±1.8	< 0.0001
p-value ³⁾	NS	< 0.0001	< 0.0001	

1) value are expressed mean ± S. D

2) p-values for the significance among the incubation time according to the various concentrations of fatty acid

3) p-values for the significance among the various concentration of fatty acid according to the incubation time

4) NS : values are not significantly different between groups

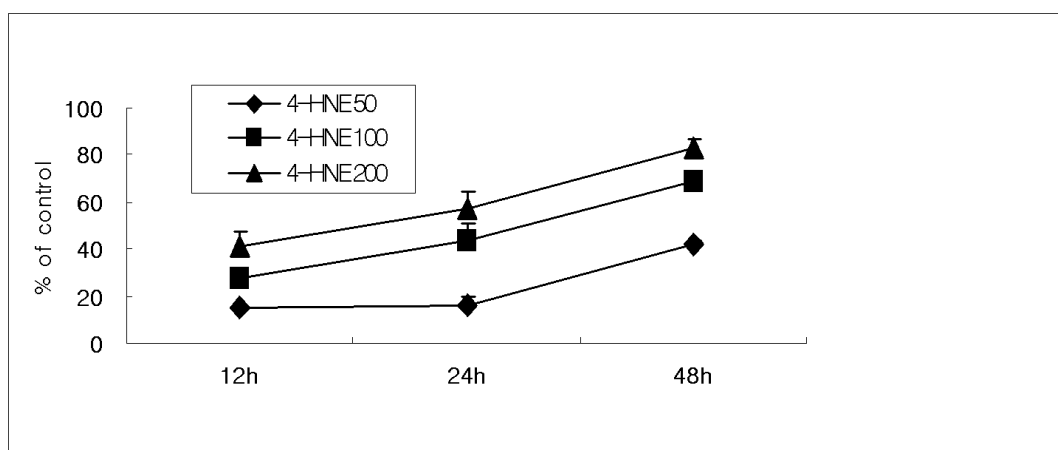


Fig 8. Rate of cell death(%ofcontrol) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations of 4-HNE on ECV304 cells

Table 10. Rate of cell death(% of control) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations of MDA on ECV304 cells

	12h	24h	48h	p-value ²⁾
MDA 50μM	-0.720 ± 8.2 ¹⁾	-2.738 ± 5.8	-0.841 ± 6.0	NS
MDA 100μM	3.251 ± 5.8	0.137 ± 4.0	2.006 ± 10.8	NS
MDA 200μM	6.971 ± 8.0	-2.362 ± 9.2	1.628 ± 7.3	NS
p-value ³⁾	NS	NS	NS	

1) value are expressed mean ± S. D

2) p-values for the significance among the incubation time according to the various concentrations of fatty acid

3) p-values for the significance among the various concentration of fatty acid according to the incubation time

4) NS : values are not significantly different between groups

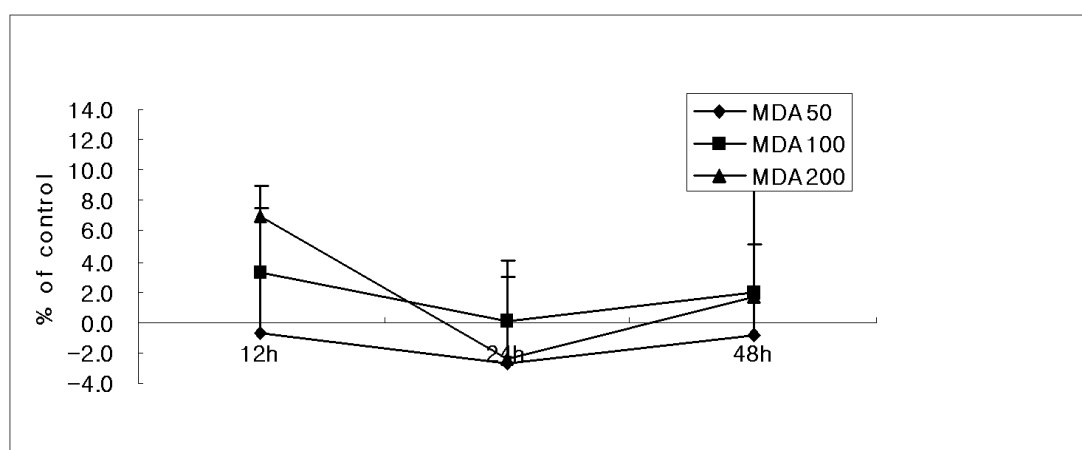


Fig 9. Rate of cell death(%ofcontrol) of ECV304 cells according to the incubation times and various concentrations MDA on ECV304 cells

5. caspase-3 활성화 측정

지질 과산화물이 자가 사멸을 유발하는 기본적인 기전을 알기 위해 caspase-3 활성도를 측정하였다. 100uM 의 LA와 DHA, AA를 처치하여 배양한 ECV304 세포의 총 caspase-3 활성도를 측정하였으며 그 결과는 Table 11과 Figure 12에 나타내었고, 50uM의 4-HNE와 MDA를 처치하여 배양하여 측정한 ECV304 세포의 총 caspase-3 활성도와 비교하였다

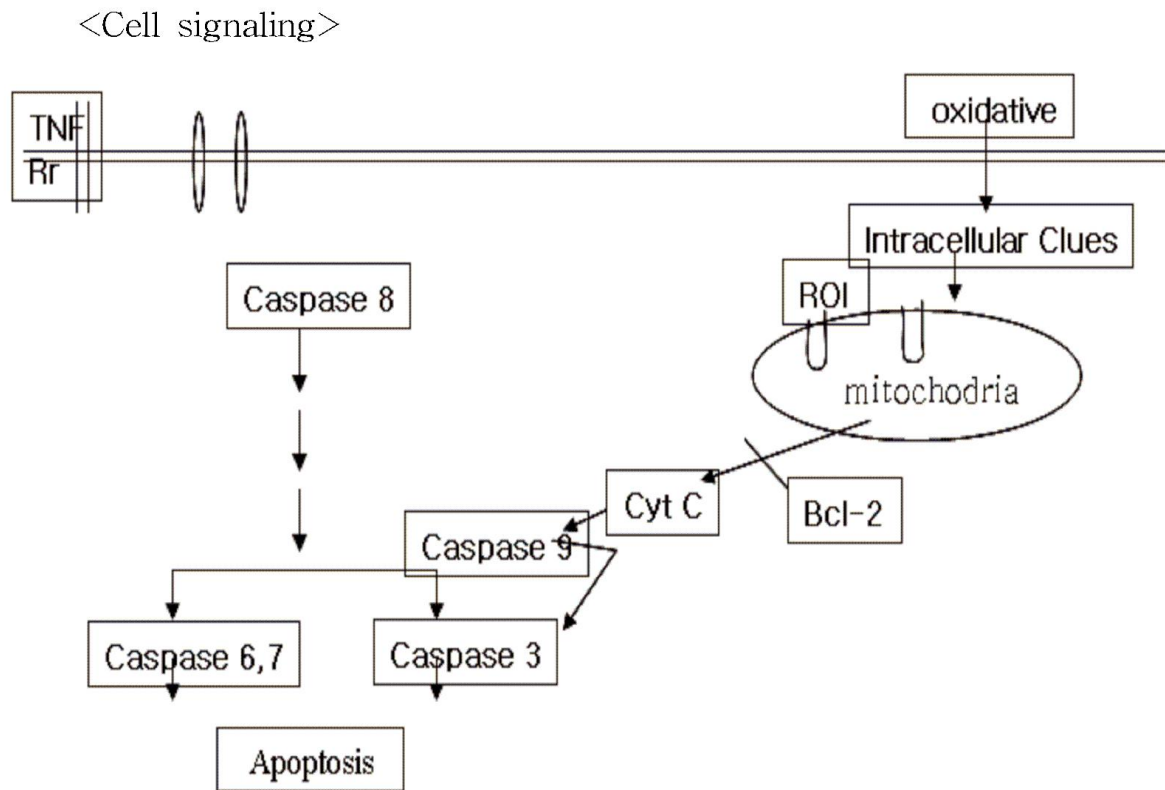


Fig 10. Cascade cell signaling of apoptosis by oxidative stress

배양시간에 따른 결과를 살펴보면 LA 처치군은 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 감소하였고, DHA 처치군은 24시간 배양 시 12시간에 비해 caspase-3 활성도가 다소 감소하긴 하였지만, 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하는 경향을 보였다. AA 처치군도 DHA 처치군과 마찬가지로 24시간 배양 시 12시간에 비해 caspase-3 활성도가 다소 감소하긴 하였지만, 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하는 경향을 보였으나 DHA 처치군보다는 활성도가 떨어졌다. 4-HNE 처치군은 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하는 경향을 보였지만 유의적이지는 않았다. MDA 처치군도 배양시간이 증가함에 따라 caspase-3 활성도가 증가하는 경향을 보였지만 모든 처치군들 중에서 가장 낮은 활성도를 보였다. 이것은 미토콘드리아의 손상으로 인한 일련의 자가 사멸 기전으로 생각된다.

지방산 처치 후 12시간이 지났을 때 DHA 처치군은 caspase-3 활성이 LA군과 AA처치군에 비해 1.3배 높았으나 유의적이지는 않았고, 24시간 배양 시 1.4배 활성도가 높았고, 48시간 배양 시 LA 처치군에 비해서는 3배, AA 처치군에 비해서는 1.6배 가량 caspase-3 활성도가 높았으며 유의적인 값을 나타냈다.

4-HNE 처치군은 모든 시간대에서 MDA 처치군에 비해 3.5배가량 caspase-3 활성이 높았으며, MDA 처치군의 caspase-3 활성도는 LA, DHA, AA 처치군에 비해서도 낮았다.

Arita 등⁵⁰⁾은 인체 백혈병세포(HL-60 cell:human promyelocytic leukemia cells)에 AA, EPA, DPA를 60uM로 처치 했을때 caspase-3 활성도가 EPA>DPA>AA 순으로 높았다. 즉 ω -3 지방산이 ω -6 지방산보다 caspase-3 활성도 및 미토콘드리아에서 세포질로 분비되는

Cytochrom C의 양이 많으므로 자가 사멸로 잘 유도된다고 하였다.

Turner⁵¹⁾ 등은 쥐 결장세포(YAMC :immortalized young adult mouse colon cell)에서 50uM의 LA와 DHA를 처치했을 때 LA와는 달리 DHA 처치군에 caspase-3 활성도가 증가했다고 하였다. QN 등⁵²⁾은 평활근 세포에서 고농도의(40~80uM/L)의 DHA가 caspase-3 활성을 유도하고, 자가 사멸의 구조적 특징인 핵융합을 시작한다고 하였고, DHA와 EPA가 p38의 활성화전에 의해 자가 사멸을 유도한다고도 하였다.⁵³⁾ Igrashi 등⁵⁴⁾은 DHA와 EPA가 종양세포에서 지질과산화물에 의해 apoptosis를 시작한다고도 하였다. Sylvia 등⁵⁶⁾은 뇌의 해마 세포(hippocampal cell)에서 4-HNE로 인한 세포사멸 과정에서 caspase-3가 활성화된다고 하였다.

본 연구에서는 LA, DHA, AA 처치군 모두 배양시간이 증가할수록 caspase-3 활성도가 증가하였고, 위의 선행연구와 같이 본 연구에서도 DHA 처치군은 다른 군에 비해 caspase-3 활성도가 1.5~3배정도 높았다. Sylvia 등⁵⁵⁾의 연구와 같이 4-HNE 처치군은 모든 시간대에서 MDA 처치군보다 caspase-3 활성도가 높았고, MDA 처치군은 LA, DHA, AA 처치군에 비해서도 활성도가 낮았다.

Table 11. caspase-3 activity of ECV 304 human endothelial cell treated different types , various final products of fatty acids and incubation times

(pmol/pNA/hour/ug protein)

	12h	24h	48h	p-value
LA 100uM	^x 24.8 ± 0.2 ^a	^y 20.1 ± 0.3 ^a	^z 16.9 ± 1.7 ^a	0.038
DHA 100uM	^x 32.9 ± 0.6 ^a	^y 28.9 ± 1.5 ^b	^z 53.0 ± 0.3 ^b	0.000
AA 100uM	^x 21.2 ± 0.7 ^a	^y 19.2 ± 0.5 ^a	^z 32.7 ± 0.6 ^c	0.000
4-HNE 50uM	^x 56.4 ± 24.9 ^b	^x 53.3 ± 0.0 ^c	^x 66.3 ± 14.9 ^d	NS
MDA 50uM	^x 15.3 ± 21.6 ^a	^y 15.5 ± 2.1 ^a	^z 18.4 ± 1.5 ^a	0.004
p-value	NS	0.000	0.003	

1) values are expressed mean ± S.D

2) p-values for the significance among the incubation time

3) p-values for the significance among the types of fatty acids

* x, y, z values within the treated types of fatty acids groups with different superscripts are significant at p<0.05

*a, b, c values with in incubation time of fatty acids groups with different superscripts are significant at p<0.05

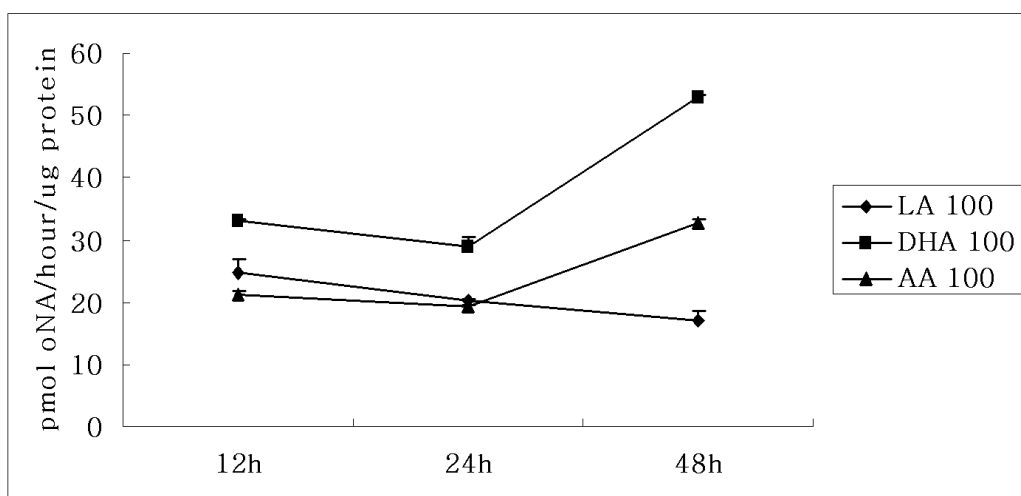


Fig 11. caspase-3 activity of ECV 304 human endothelial cell treated different types of fatty acids and incubation times.

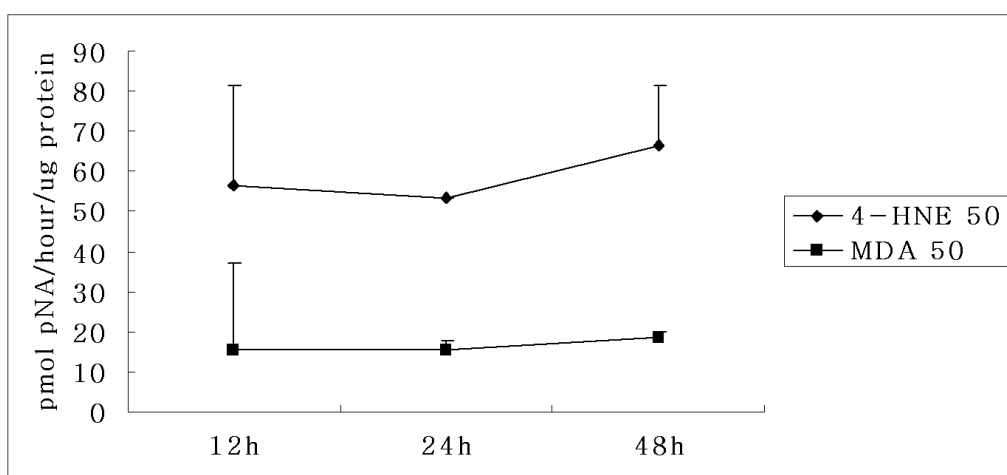


Fig 12. Caspase-3 activity of ECV 304 human endothelial cell treated final products of lipid (4-HNE, MDA) and incubation times.

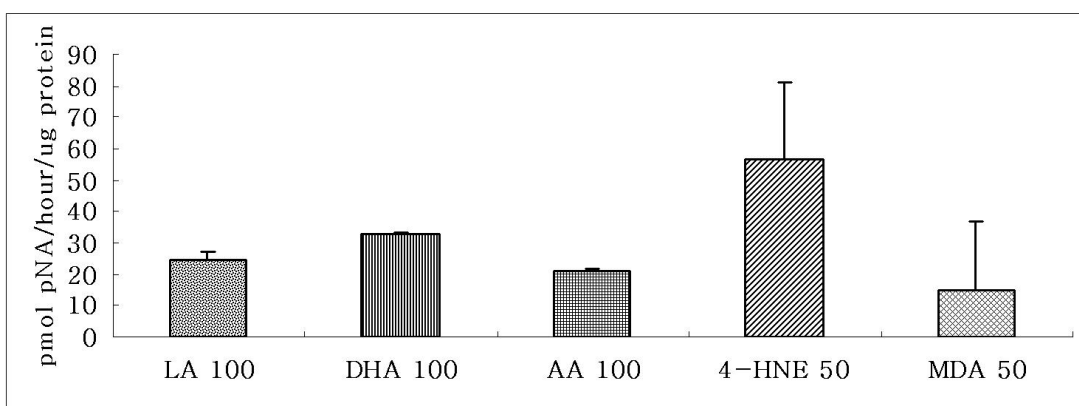


Fig 13. Caspase-3 activity of ECV 304 human endothelial cell treated different types of fatty acids (12h)

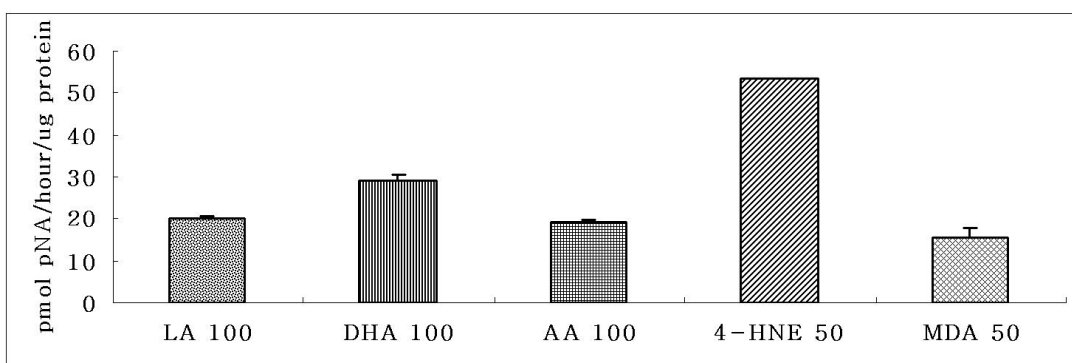


Fig 14. Caspase-3 activity of ECV 304 human endothelial cell treated different types of fatty acids (24h)

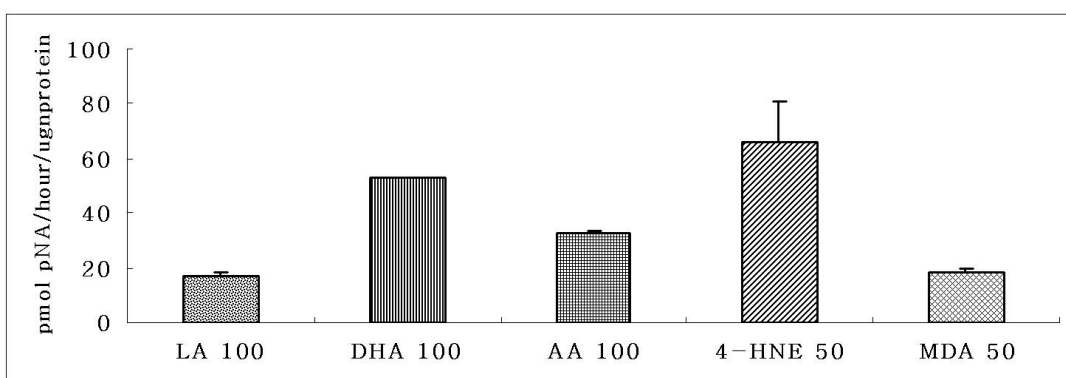


Fig 15. Caspase-3 activity of ECV 304 human endothelial cell treated different types of fatty acids (48h)

IV. 요약 및 결론

본 연구는 인체 혈관내피세포(ECV304 cell)에 지방산의 종류(LA, DHA, AA)를 달리 처치한 후 세포독성과 심혈관벽의 내피세포에 미치는 apoptosis 영향을 식이성 불포화지방산의 주된 과산화 생성물 형태인 4-HNE 및 MDA 처치군과 비교하여 살펴보고자 인체 내피세포에 식이 불포화지방산인 LA, DHA, AA를 100uM로 처치하여 세포독성 및 세포 형태학적 변화, 지질과산화물의 종류와 함량, 세포막의 지방산조성, caspase-3 활성도 등을 측정하였고, 식이성 불포화지방산의 주된 과산화 생성물 형태인 LPO(4-HNE + MDA), 4-HNE, MDA를 각각 50uM 로 처치한 것과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 12시간 배양 시 200uM에서 DHA 처치군이 LA와 AA 처치군에 비해 세포 사망률이 유의적으로 높았고(p=0.027), 24시간 배양 후에는 100uM에서 DHA 처치군이 LA와 AA 처치군에 비해 세포사망률이 유의적으로 높았다.(p=0.021) 48시간 배양 후에는 50uM에서 DHA 처치군의 세포사망률이 대조군에 비해 14% 증가함으로써 LA와 AA 처치군에 비해 세포사망률이 유의적으로 높았다.(p=0.037)

즉, DHA 처치군이 모든 농도에서 LA와 AA 처치군보다 세포 사망률이 높았다.

- 2) 세포의 형태학적 변화를 살펴보면 대조군에 비해 LA 및 AA 처치군은 자가 사멸적 세포 변화가 나타났고, 가장 심각한 세포

형태학적 변화는 DHA 처치군 에서 나타났다. 이것은 지질 과산화물 중 4-HNE를 50uM로 처치한 군과 비슷한 형태를 나타냈다. 반면 지질 과산화물 중 MDA를 50uM로 처치한 군에서는 심각한 세포 형태학적 변화가 나타나지 않았다.

3) 세포내 지방산 조성 분석결과 LA, DHA, AA 처치군은 각각 처치한 지방산 의 세포내 유입이 잘 이루어졌고, 특히 LA 는 24시간 배양 후에 유입율이 대조군보다 8배가량 높았고, DHA 는 12시간 배양 후에 유입율이 대조군보다 30배가량 높았다. AA 처치군의 유입 율은 크게 증가하지는 않았다. 처치군에 따라 세포내 지방산의 분포가 변화하여 P/S 비율이 변화하였으며 이에 따른 $\omega 3$ 와 $\omega 6$ 의 비율도 변화하였다. 즉 24시간과 48시간 배양 시 LA 처치군이 DHA 처치군에 비해서 P/S비율이 높았으며, LA 처치군이 DHA 처치군에 비해서 $\omega 3/\omega 6$ 비율이 낮았다. 특히 DHA 처치군은 12시간 배양 시 $\omega 3/\omega 6$ 비율이 대조군에 비해 12배가량 높았고, 24시간 배양 시 9.9배가량 높았다. LA 처치군은 24시간 배양 후에 가장 낮은 비율을 나타냈다. 이것은 처치 지방산의 유입 율에 의한 것으로 보인다.

4) 처치된 지방산의 종류에 따른 LPO(4-HNE + MDA) 생성결과를 살펴보면 DHA 처치군에서 과산화물 생성이 대조군보다 10 배 증가하여 가장 높았으며 LA군 처치군과 AA 처치군은 대조군과 비슷한 량의 과산화물을 생성했다.

즉 고농도의 LA나 AA처치군에 비해 DHA 처치군에서 가장 많은 지질 과산화물이 생성되어 ω -3 지방산이 ω -6 지방산보다

은 불포화도가 높은순으로 과산화물 생성이 증가함을 보여주었다.

- 5) 4-HNE를 50uM, 100uM, 200uM 로 ECV304 cell 에 처치한 결과, 대조군에 비하여 세포사망률이 유의적으로 증가하였고, MDA를 50uM, 100uM, 200uM 로 ECV304 cell 에 처치한 결과, 대조군에 비하여 MDA의 세포사망률은 농도나 시간에 의존적이지 않았다. 그러므로 지질 과산화물의 대부분을 MDA가 차지하고 있다고 하더라도 직접적인 세포사망은 4-HNE에 의해 유도된다고 생각된다.
- 6) 100uM 의 LA와 DHA, AA를 처치하여 배양한 ECV 304 세포의 총 caspase-3 활성도를 측정하였으며 그 결과는 LA, DHA, AA 처치군은 배양시간이 증가할 수록 caspase-3 활성도가 증가하였고, 특히 DHA 처치군은 다른 군에 비해 caspase-3 활성도가 1.5~3배정도 높았으며 4-HNE 처치군은 모든 시간대에서 MDA 처치군보다 caspase-3 활성도가 높았고, MDA 처치군은 LA, DHA, AA 처치군에 비해서도 활성도가 낮았다. 그러므로 지방산의 caspase-3 활성도의 증가는 지질 최종 과산화물중 MDA 보다는 4-HNE에 의한 것으로 보여지며, DHA 처치군에서 4-HNE가 많이 생성되었을 것으로 예상된다.

결론적으로 ω -3계열 지방산 특히 고도불포화지방산으로 항 동맥경화 및 항암효과가 있는 것으로 알려진 DHA 는 다른 지방산에 비

해 지방산 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중결합을 지니고 있어서 과산화물이 많이 생성되었다. 생성된 과산화물질 중 4-HNE는 MDA에 비해 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.

앞으로 고농도의 DHA가 자가 사멸을 일으키는 기전을 더욱 자세히 밝혀 볼 필요가 있으며, DHA가 불포화도와 불포화 위치에 의해 과산화물 생성이 많이 되는지 혹은 많은 탄소 수에 의해 과산화물 생성이 많이 되는지 확인하기 위해 DHA와 탄소수가 같은 DPA(Docosapentaenoic acid : C22:5 ω -6)와 비교하여 연구될 필요가 있다.

이와 같은 결과는 식사성 스트레스 인자에 의한 동맥경화 예방의 기초 자료로 제공될 수 있다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부. 1996~1998
2. 통계청. 1998
3. 통계청. 2003
4. 오현희, 문희정, 이명숙 : 간암세포(HepG2 Cell)에서의 식이성 CLA(Conjugated linoleic acid)가 항동맥경화성 인자에 미치는 영향. 한국영양학회지 37(3) : 182-192, 2004
5. 김우식, 김영설 : 동맥경화증의 새로운 유전자 지표로서의 Paraoxonase 유전자 다형성. 한국지질학회지 6:81-86, 1996
6. 장양수, 김오연, 권석주, 이종호, 정남식, 이현철, 허갑범 : 남성에서 음주와 흡연이 동맥경화증 위험요소와 항산화체계에 미치는 영향. 대한내과학회지 56:437-449, 1999
7. Tripodi A, Loria P, Dolengite MA and Caruli N. Effect fish oil and coconut oil diet on the LDL receptor activity if rat liver plasma membrane. Biochimica et Biophysica Acta 1083 : 298-304, 1991
8. Kalpan M, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein : atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. Clin Chem Lab Med 37(8) : 778-787, 1999
9. SteinbergD. Parthasarathy S. Carew TE, Khoo JC and Witztum JL, Beyond cholesterol : modification if low-density lipoprotein

- that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 14 : 915-924, 1989
10. Lee JH, Fukumoto M, Nishima H, Ikeda I, Sugano M. The interrelated effects of n-3/n-6 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. *J Nutr* 119:1893-1899, 1989
 11. Berr F, Goetz A, Schreiber E, Paumgartner G. Effect of dietary n-3 versus n-6 polyunsaturated fatty acids on hepatic excretion of cholesterol in the hamster. *J Lipid Res* 34:1275-1284, 1993
 12. Fumeron F, Brigant L, Parra HJ, Bard JM, Fruchart JC, Apfelbaum M. Lowering of HDL₂-cholesterol and lipoprotein A-1 particle levels by increasing the ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 53 : 655-659, 1991
 13. Murthy S, Albright E, Methur SN, Field FJ. Modification of CaCo-2 cell membrane fatty acid composition by eicosaenoic acid and palmitic acid : Effect on cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 29 : 773-780, 1988
 14. Spady Dk, Dietsch JM. Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *J Clin Invest* 81:300-309, 1988
 15. 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

16. 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
17. 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 Biophysic Acta*. 1083: 293-334, 1991
18. 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 BiophysActa* 1210 : 113-122, 1993
19. Spady DK. Regulatory effects of individual n-3 poly unsaturated fatty acids on LDL transport in the rat. *J Lipid Res* 34 : 1337-1346,1993
20. Needleman, P. : Triene prostaglandins : prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76,944, 1979
21. Simopoulos, A. P : ω -3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54(3). 438, 1991
22. Lees. R. S. M. Karel : Omega-3 fatty acid in health and disease, 1st p. 159, Marceldekker, New York, 1990
23. Gerrard JM : Prostaglandins and leukotrienes, 1st p. 101. Maracel dekker, New York, 1985
24. Sanders. T. A. B. and M, C, Hochland : A comparison of the influence on plasma lipids and platelet function of supplements

- of ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acid. Britosh J. nUTR. 50: 521,1983
25. Brongeeest-Schoute HC. C. M. Van Gent. J. V. Lutin and A.Ruiter : the effect of various intakes of ω -3 fatty acids on the blood lipid composition in healthy human subjects Am. J. Clin. Nutr. 43, 566,1986
 26. Herold. P. m. and J. e. Kinsella : Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease a comparison of findings from animal and human feeding trials. Am. J. Clin. Nutr. 43. 566, 1986
 27. Crawford MA. The role of dietary fatty acids in biology : Their place in the evolution of the human brain. Nutr Rev 50 : 4-11, 1992
 28. Kissebah AH. 'Stress' hormones and lipid metabolism. Proc Poy Soc Med 67 : 665-667, 1974
 29. Avelzano MI, Sprecher H. Very long chain(C24-36) dipolyunsaturated fatty acid phosphatidylcholines from bovine retina. J Biol Chem 262 : 1180-1186, 1987
 30. Hu M-L, Frankel EN, Leibovitz BE, Tappel AL: Effect of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kideney homogenates. J Nutr 119: 1574-1582,1989
 31. 장순덕, 노숙령 : 들깨유가 흰쥐의 체내 지질대사에 미치는 영향에 관한 연구, 한국영양학회지 24 : 408-419, 1991

32. 조성희, 임정교, 정경희, 이희숙, 최영선, 김덕진 : 비타민 E 수준이 다른 어유식이 쥐 간조직에서 지질 과산화물 생성과 항산화제에 미치는 영향, 한국노화학회지 3 : 57-64,1993
33. 이효상, 최임순 : 정어리유 섭취시 지질과산화 억제를 위한 몇 가지 산화방지제의 효과, 한국영양학회지 22 : 466-475, 1989
34. Ackman RG. Concerns for utilization of marine lipids and oils, Food Technol(May) : 151-155,1988
35. Piche LA, Draper HH, Cole PD, malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate n-3 fatty acid, Lipids 23 : 370-371,1988
36. Easterbauer H.et al, Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products, Free Radic. bio. Med. 7:197-203,1989
37. Easterbauer H.et al, Chemistry and biochemistry of 4-HNE, MDA and related aldehyde, Free Radic. bio.Med. 11:81-128,1991
38. Lee M. Apo E 유전자 다형성과 질병, 한국지질학회지, 5(1), 11-23, 1995
39. Schneider et al, Two distinct pathways of formation of 4-HNE, JBC, 276(24):20831-20838,2001
40. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide, Science 267 : 1445-1449, 1995
41. 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

42. Jaruga E, Sokal A, Chrul S, Bartosz Z. Apoptosis-independent alteration in membrane dynamics induced by curcumin, *Exp Cell Res* 245: 303-312, 1998
43. Jiang S, Cai J, Wallace C, Jones P. Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA, *J. Biol Chem* 274(4): 29905-29911, 1999
44. 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
45. 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
46. 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
47. Hartley JA, Gibson NW, Qwelling LA and 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
48. YUNJO SOH, KYU-SHIK JEONG, INSONG JAMES LEE, MYUNG-AE BAE, YONG-CHUL KIM, and BYOUNG J. SONG : Selective Activation of c-Jun N-Terminal Protein

- Kinase Pathway during 4-Hydroxynonenal-Induced Apoptosis of PC12 Cells. *Molecular Pharmacology*, 58 : 535-541, 2000
49. Stephen W. Luckey and Dennis R. Petersen: Metabolism of 4-Hydroxynonenal by Rat Kupffer Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389(1) : 77-83,2001
50. 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
51. 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
52. Diep QN, Intengan HD, Schiffrin EL : Endothelin-1 attenuates ω 3 fatty acid-induced apoptosis by inhibition of caspase-3. *Hypertention*, 35 : 287-291,2000
53. 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
54. 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

55. Sylvia A. Rabacchi, Wilma J. Friedman, Michael L, Shelanski, Carol M. Troy : Divergence of the apoptotic pathways induced by 4-hydroxynonenal and amyloid β -protein. Neurobiology of Aging. 25 : 1057-1066, 2004

ABSTRACT

The apoptotic effects of the final products of lipid peroxidation, 4-HNE and MDA, on human vascular endothelial ECV304 cells.

Kim young youn

Department of Food & Nutrition

The Graduated School

Sungshin Women's University

Docosahexaenoic acid (DHA) was ω -3 fatty acid its ability to modulate cell growth or death with changes of apoptotic signaling. Since the mechanism of DHA induced cell death remains poorly understand, we investigated the effects of DHA of apoptosis on human vascular endothelial ECV304 cells. We used final bio-metabolites of lipid peroxidation such as 4-HNE and MDA that were originated by dietary polyunsaturated fatty acids(PUFA). Since DHA or LA or AA can be well incorporated into ECV304

cells compared to control, DHA caused apoptosis of ECV304 cells compared to LA, AA and control as evidenced by changes in cell morphology and MTT assay. LPO(4-HNE+MDA) was not elevated by LA and AA, otherwise LPO(4-HNE+MDA) was elevated 10 fold by DHA compared to control. 4-HNE caused apoptosis of ECV304 cells compared to MDA as evidenced by changes in MTT assay. Since 4-HNE induced apoptosis of ECV 304 cells with evidences of caspase activity. We expected DHA also showed same effects because of high production of 4-HNE. Caspase-3 activity until 48h increased by LA, DHA, AA 4-HNE and MDA Caspase-3 activity increased 2 folds DHA and 4-HNE compare of other groups significantly.

Our results strongly indicated that DHA products 4-HNE on ECV304 cell has an important roles on apoptotic signaling pathway. This metabolite, 4-HNE by oxidation of DHA, might be one of risk factor in the initial progression of atherosclerosis.