

어유와 항산화제가 고지방식에 의한 가토의 동맥경화증 발생에 미치는 영향에 대한 연구*

충남대학교 의과대학 병리학교실 및 생화학교실**

이 충 식 · 최 정 목 · 민 성 기
송 규 상 · 강 대 영 · 임 규**

Effect of Eicosapentaenoic acid and Butyrate hydroxyanisole on Hypercholesterolemic Diet Induced Atherogenesis in Rabbit

Choong-Sik Lee, M.D., Jeung-Mok Choi, M.D., Sung-Ki Min, M.D., Kyu-Sang Song, M.D.,
Dae-Young Kang M.D. and Kyu Lym**, M.D.

*Department of Pathology & Biochemistry**, Chungnam National University College of Medicine*

It has been suggested that the fish oil can reduce atherogenesis in humans and animals, and that peroxidation of lipoproteins may be a major factor causing atherosclerotic lesions. We tested these possibilities in rabbits fed an atherogenic diet by comparing the effect of a eicosapentaenoic acid(EPA: a major component of fish oil)supplement and a butyrate hydroxyanisole(BHA: antioxidant)diet supplement.

Twenty-eight young male New Zealand White rabbits were used in this study. The animals were divided by control, cholesterol fed only, cholesterol+EPA, and cholesterol+BHA groups.

The experimental course lasted 12 weeks and animals were sacrificed periodically(2, 5, 8, 12weeks)for quantitative studies of aortic atherosclerosis using light and electron microscopy. Plasma cholesterol levels were determined and lipoproteins were separated periodically.

The cholesterol fed only group showed an increased serum cholesterol level and atherosclerotic lesions from 5 weeks of experiments.

The EPA supplement resulted in similar serum cholesterol levels with cholesterol fed only group, but greater lesion than cholesterol fed only group.

The BHA supplement resulted in higher serum cholesterol levels except VLDL-cholesterol than EPA supplement group. However, the atherosclerotic lesion was not increased.

Our studies support the theory that oxidative modification of lipoproteins is important for the atherogenesis and antioxidant may have a protective effect. However, it failed to show anti-atherogenesis effect of fish oil. (**Korean J Pathol 1994; 28: 235~245**)

Key Words: Rabbit, Hypercholesterol diet, Eicosapentaenoic acid, Butyrate hydroxyanisole, Atherogenesis

접 수:1993년 10월 20일, 게재승인:1994년 3월 17일

주 소:대전시 중구 문화동 6번지, 우편번호 301-130

충남대학교 의과대학 병리학교실, 이충식 외 5인

*이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

서 론

동맥경화증은 적어도 15년 이상의 기간을 경과하면서 전신의 동맥을 따라서 일어나는 퇴행성, 증식성, 그리고 염증성 질환으로서 자연적 퇴행을 하는 수도 있으나^{1,2)} 대부분은 심근경색이나 뇌졸중등의 치명적인 합병증을 가져오기 때문에 임상적으로 아주 중요하며 아직도 서구 유럽 및 북미 대륙의 선진국들에서 제일 많은 사망원인이 되고 있는 질병이다. 이병의 원인은 현재까지는 고콜레스테롤혈증, 특히 저밀도지방단백(LDL)이 가장 중요한 위험인자^{3,4)}로 생각되고 있으며 그밖에 고혈압, 흡연, 당뇨병등이 중요하다고 알려져 있다. 그러나 이병의 정확한 원인은 아직도 명확히 밝혀지지 않고 있는데 그 이유는 이병이 한두가지의 원인에 의해서 발생한다기 보다는 다양한 원인에 의해서 발생하는 다인성 질병으로서 장시간에 걸쳐 진행하고 또한 같은 사람에서도 아주 다양한 병변을 보일 수 있는등 이에 대한 인체에서의 연구가 큰 제약을 받고 있기때문이다. 그럼에도 불구하고 서양에서는 이병의 발생이 원체 많고 중요한 사망원인을 차지하고 있기때문에 과거부터 많은 연구가 행해져 왔는데 비하여 우리나라에서는 이 병의 발생이 과거에는 아주 적었기 때문에 그동안 관심을 끌어오지 못했으나 최근에 들면서 급격한 경제적 수준의 향상에 동반된 식생활 패턴 및 사회생활 전반의 서구화에 따라 동맥경화증도 현저하게 증가하고 있어 의학적 분야에서 뿐만아니라 사회적으로도 그 관심이 높아지고 있다. 그러나 이러한 질병과 관심의 증가에 비하여 이에 대한 국내 연구는 별로 보고되고 있지 않다. 저자들은 우리나라에서도 이제는 이 질병에 대한 연구가 시도될때가 되었다고 생각하고 여러가지 실험동물중 비교적 취급이 용이하며 고지방식에 의해 동맥경화증의 병변이 잘 생기는 가토를 그 대상으로 하여 동맥경화증을 유발시켜 최근에 들어와서 동맥경화증에 예방효과가 있다고 얘기되고 있는 어유(漁油)의 영향을 살펴보고자 어유의 대표적인 성분인 eicosapentaenoic acid(EPA)을 투여하여 병변에 미치는 영향을 관찰하였으며 또 동맥경화증 뿐만 아니라 노화의 중요한 원인으로 의심되고 있는 지방단백의 산화의 영향을 알아보기 위하여 현재 육류식품의 항산화제로 쓰이고 있는 butyated hydroxyanisole(BHA)을 투여하여 이약물이 실험동물의 동맥경화증 발생에 미치는 영향을 알아보고자 본 실험을 고안하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

생후 45일된 웅성 New Zealand종 가토 30마리를

대상으로 하였으며 사료는 Purina 토끼용 pellet 사료를 사용하였고 cholesterol과 butylated hydroxyanisole(BHA)은 Sigma제품을 사용하였다. Eicosapentaenoic acid(EPA)는 (주)풀무원에서 제공받았다.

2. 실험방법

실험동물들은 독립된 사육장 한칸에 한마리씩 배정하였으며 7일간 기본 사료로서 적응시킨후 대조군과 콜레스테롤 투여군, 콜레스테롤+EPA 투여군, 콜레스테롤+BHA 투여군의 네군으로 나누어 12주 동안 실험하였다. 콜레스테롤 투여군은 사료당 콜레스테롤을 0.5%의 비율로 투여하였으며 EPA는 마리당 1일 500 mg씩 투여하였고 BHA는 사료당 1%씩 투여하였다. 매실험 2주, 5주, 8주, 12주 마다 각군 2마리씩(정상 대조군은 1마리씩)을 1 g/kg의 농도의 urethan복강주사 마취하에 심장으로부터 혈액을 약 10 ml씩 채취하여 혈청을 분리한 다음 cholesterol, low density lipoprotein(LDL), very low density lipoprotein(VLDL), high density lipoprotein(HDL)을 각각 측정하였다. 혈청내 cholesterol과 high density lipoprotein(HDL)의 측정은 일본 極東製藥株式會社の TC-V와 HDL-C test kit를 각각 사용하였으며 low density lipoprotein(LDL), very low density lipoprotein(VLDL)은 일본 SRL株式會社에 의뢰하여 측정하였다.

혈액채취후 좌심실에 18G의 주사바늘을 통하여 110 mmHg의 압력으로 4% Robertson 고정액(paraformaldehyde-1% glutaldehyde 고정액)으로 관류고정후에 도살하여 그 동맥을 육안 관찰하고 흉부동맥과 복부동맥에서 각각 2 부위씩을 절제하여 광학현미경, 주사전자현미경, 투과전자현미경으로 관찰하였다. 광학현미경 관찰은 4 μ 두께로 박절하여 Hematoxylin-eosin 염색을 시행하였으며 혈관의 단면적인 혈관 절단면을 현미경 사진을 촬영하여 Summagraphics를 이용한 computer analysis system을 이용하여 혈관 단면적당 동맥경화병변의 면적비를 산출하였다. 투과전자현미경 관찰은 적출된 혈관들을 신속하게 1 mm의 크기로 잘라 Molloing's phosphate buffer(pH 7.2)로 제작한 4 $^{\circ}$ C 2.5% glutaldehyde 용액에 2.5시간 전공정후 동일한 완충액으로 제작한 1% OsO₄용액에 2.5시간 후고정하여 술식에 따라 탈수시켜 Luft처방에 의한 epon혼합액에 포매하여 60 $^{\circ}$ C에서 72시간 동안 열중합시켰다. 제작된 block은 Sorvall MT-5000형 초박절편기를 이용하여 1 μ 의 두께로 박절하여 Toluidine blue 염색을 한후 광학현미경에서 관찰하고자 하는 부위를 선택한 다음 다시 60~80 μ m의 초박절 절편에 제작한 후 Watson⁵⁾ 및 Reynolds⁶⁾ 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate의 이중염색을 시행하여 Hitachi H600 투과

전자현미경으로 가속전압 75KV에서 관찰하였다.

주사전자현미경관찰은 적출한 조직을 투과전자현미경으로 처리한 조직과 같은 방법으로 고정 및 탈수를 시행한후 isoamyl acetate로 치환하여 Ladd 2800 critical point dryer로 건조시킨후 Eiko IB-3형 ion coater를 이용하여 금으로 coating한 다음 Hitachi S-2500 주사전자현미경으로 가속전압 25 KV에서 관찰하였다. 각 실험군간의 수치의 통계학적 비교는 SAS를 이용하여 ANOVA를 시행하였다.

결 과

1. 육안적 변화

콜레스테롤을 투여받은 모든 토끼들은 5주 이후에는

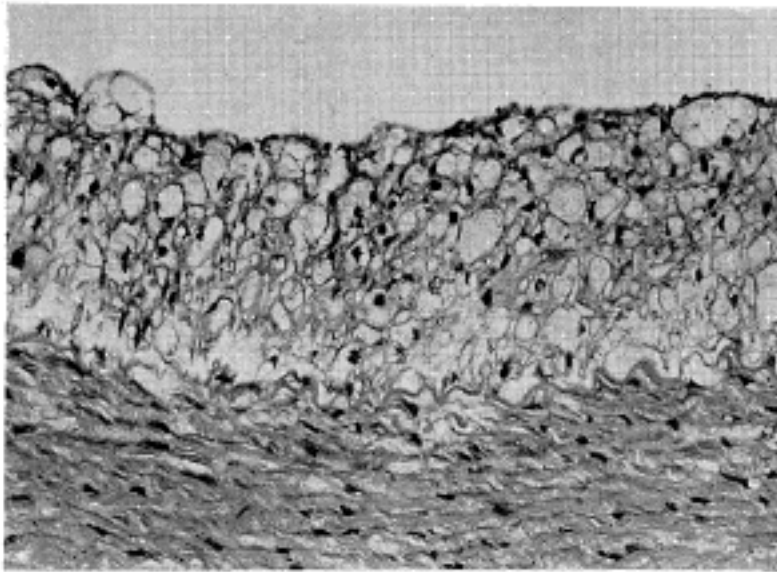


Fig. 1. There are moderate infiltration of foamy macrophages and smooth muscle cells in the intima(cholesterol only group, 8 weeks).

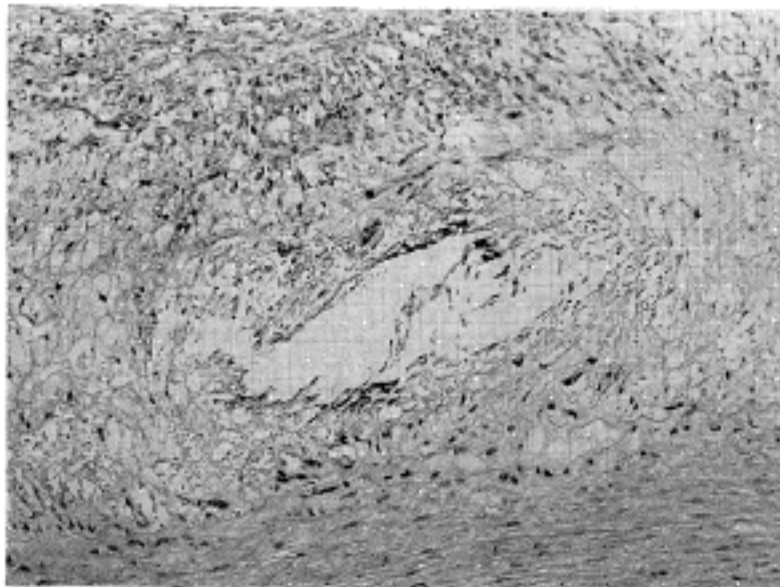


Fig. 2. Necrotic foci within the fibrous plaque(cholesterol+EPA group, 12 weeks).

지방간이 관찰되기 시작하여 8주 이후에는 거의 모든 동물에서 볼 수 있었다. 심근경색이나 동맥 혈전은 관찰되지 않았다. 동맥내막의 병변은 콜레스테롤투여군에서 실험 8주부터 뚜렷하게 관찰되었는데 대동맥에서 분지되는 동맥들이 나가는 입구에서 현저히 많이 관찰되었고 이런 소견은 실험군간에 특별한 차이가 없었다.

2. 혈관의 현미경학적 변화

1) 광학현미경적 변화: 대조군에서는 전 실험기간을 통하여 특별한 병변이 관찰되지 않았으나 콜레스테롤투여군들에서 5주때에는 내막하 포말세포의 축적이 관찰되었으며, 콜레스테롤+EPA군과 콜레스테롤+BHA군에서 병변의 훨씬 심하였다. 이 변화는 8주때에 더 조금씩 더심해져 내막하 대식구와 근육세포의 증식이 콜레스테롤을 투여한 세실험군 모두에서 비슷하게 관찰되었고(Fig. 1), 12주때에는 콜레스테롤 단독투여군에서는 더이상의 병변의 증가는 없었지만 콜레스테롤+EPA군과 콜레스테롤+BHA군에서 병변이 계속 심해져 두군다 괴사가 관찰되었다(Fig. 2). 흉부동맥과 복부동맥의 병변크기를 비교해본 결과 5주때에는 콜레스테롤 단독투여군과 콜레스테롤+BHA군

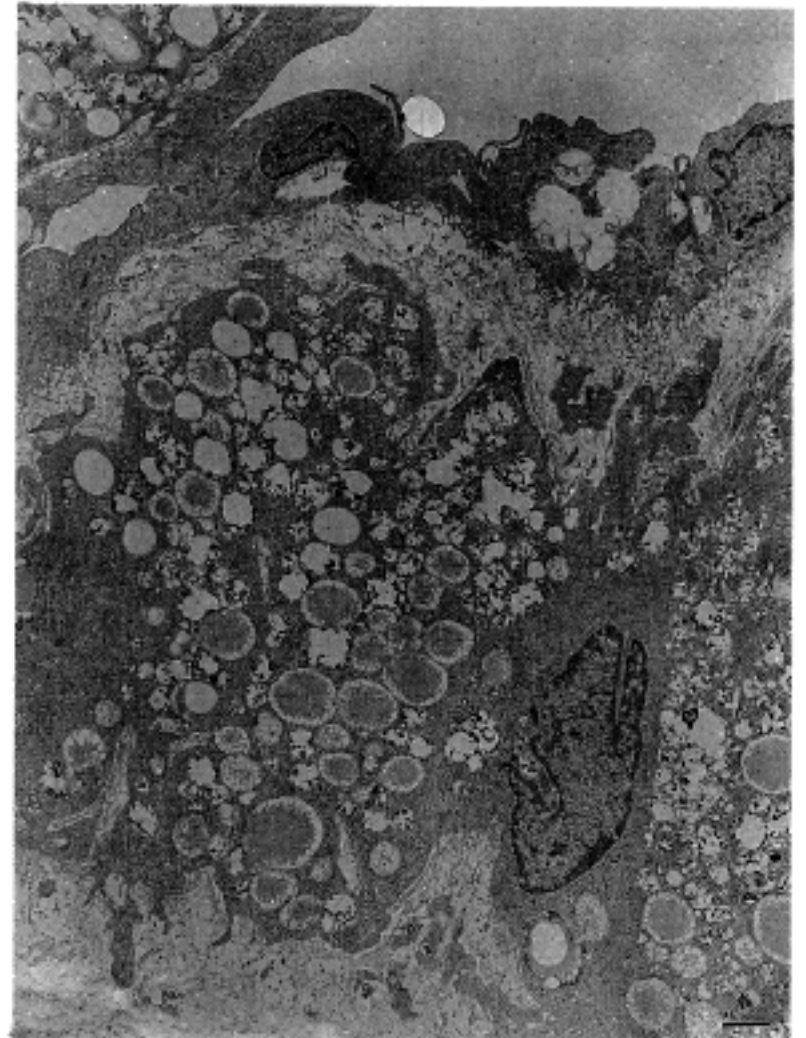


Fig. 3. The subintimal macrophages show numerous fat vacuoles in their cytoplasm(cholesterol only group, 8 week, $\times 3,500$).



Fig. 4. The smooth muscle cells also show numerous fat vacuoles in their cytoplasm(cholesterol only group, 8 weeks, $\times 3,500$).

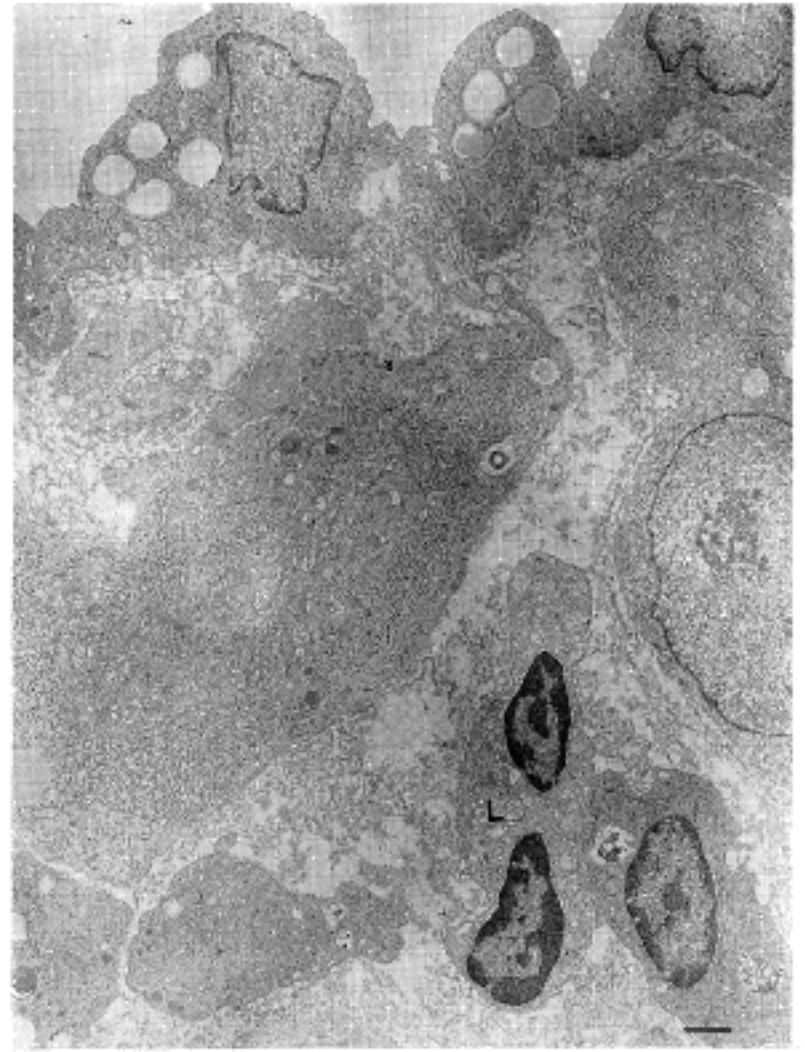


Fig. 5. Three lymphocytes (L) are also demonstrated between 'synthetic' smooth muscle cells(cholesterol only group, 12 week, $\times 3,500$).

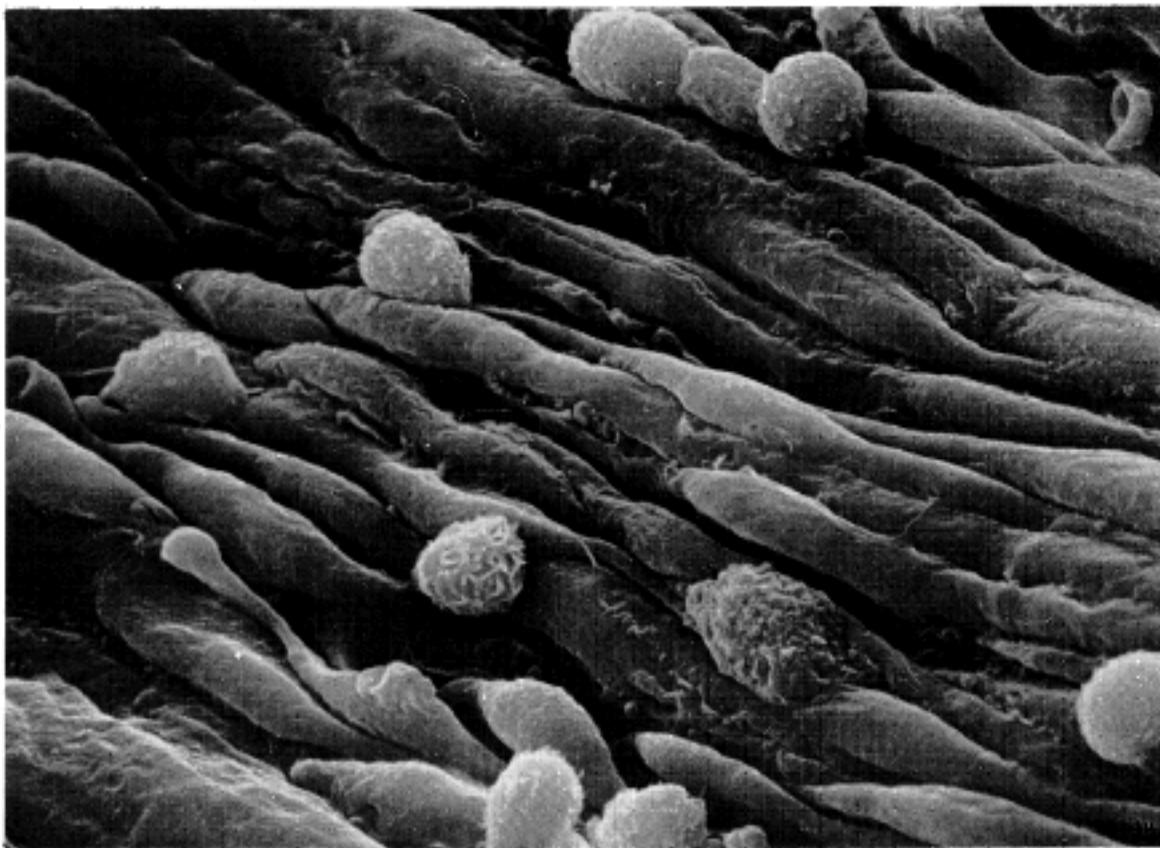


Fig. 6. There are scattered monocytes that attached on the endothelial cells(cholesterol+ EPA group, 2 weeks, $\times 2,000$).

에서 복부동맥에서 더 심하였으나 8주 이후에는 비슷하였다.

2) 투과전자현미경적 변화: 투과전자현미경상에는 세개의 콜레스테롤 투여군들에서 실험 2주때부터 소수의 대식구의 혈관내피부착이 관찰되었으며, 8주때에는 콜레스테롤 단독투여군에서 심한 대식구의 내피 부착과함께 내피하에 수많은 지방 공포를 가진 단핵구가 관찰되었으며(Fig. 3) 콜레스테롤+EPA군에서는 혈관내강으로 다시 들어가는 것으로 보이는 많은 지방을

탐식하고 있는 단핵구가 관찰되었다. 그밖에 근육세포 역시 세포질내에 지방공포를 가지고 있었으며(Fig. 4), 세포막의 주름이 증가한 것을 볼 수 있었다. 그러나 전체적으로 볼 때 콜레스테롤을 투여한 세군간에 특별한 차이는 없었다. 실험 12주때에는 콜레스테롤을 투여한 세군 모두에서 5주때 관찰되었던 소견들과 함께 근육세포내에 RER의 비대가 뚜렷해지면서 소위 합성형 근육세포(synthetic smooth muscle cell)들이 많이 관찰되었으며 이들 세포사이에 임파구의 침윤도

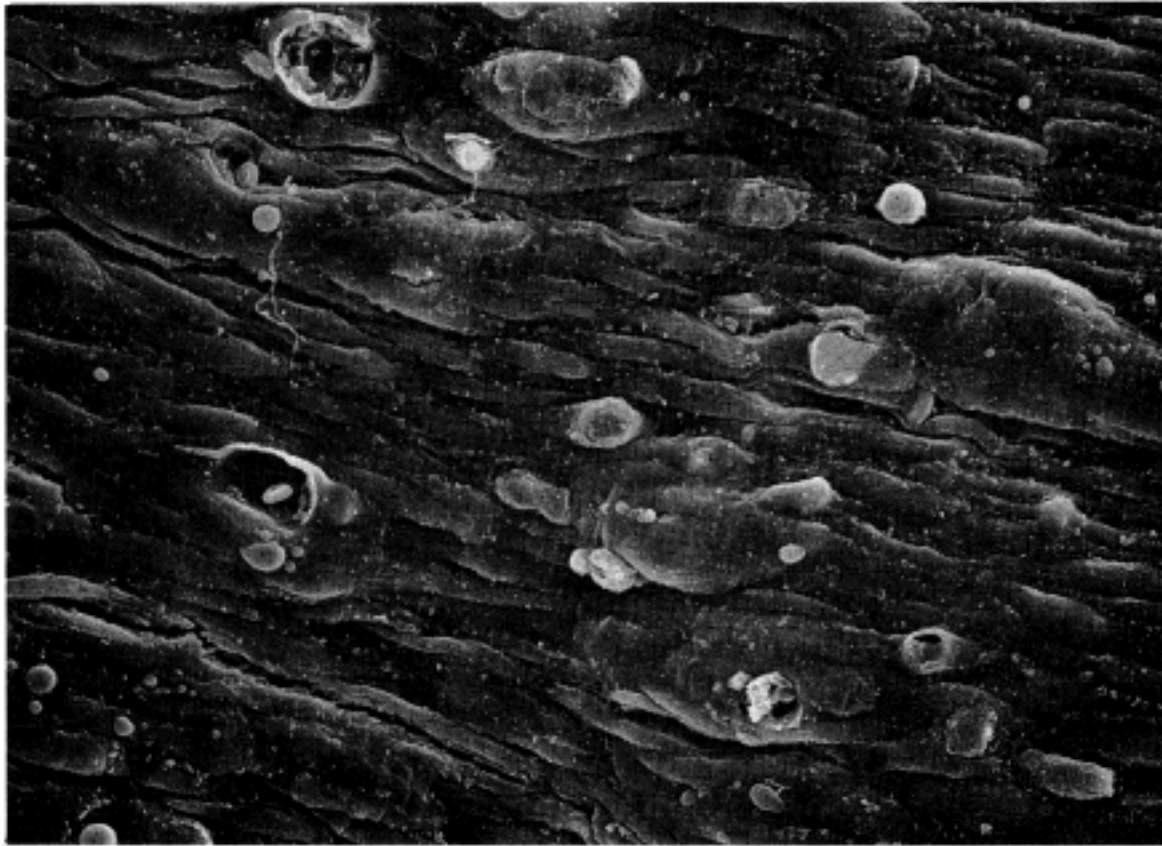


Fig. 7. The endothelial surface reveals irregular swelling of the endothelial cells with occasional denudation. There is also adhesion of the monocytes and platelets(cholesterol + BHA group, 8 week, $\times 500$).

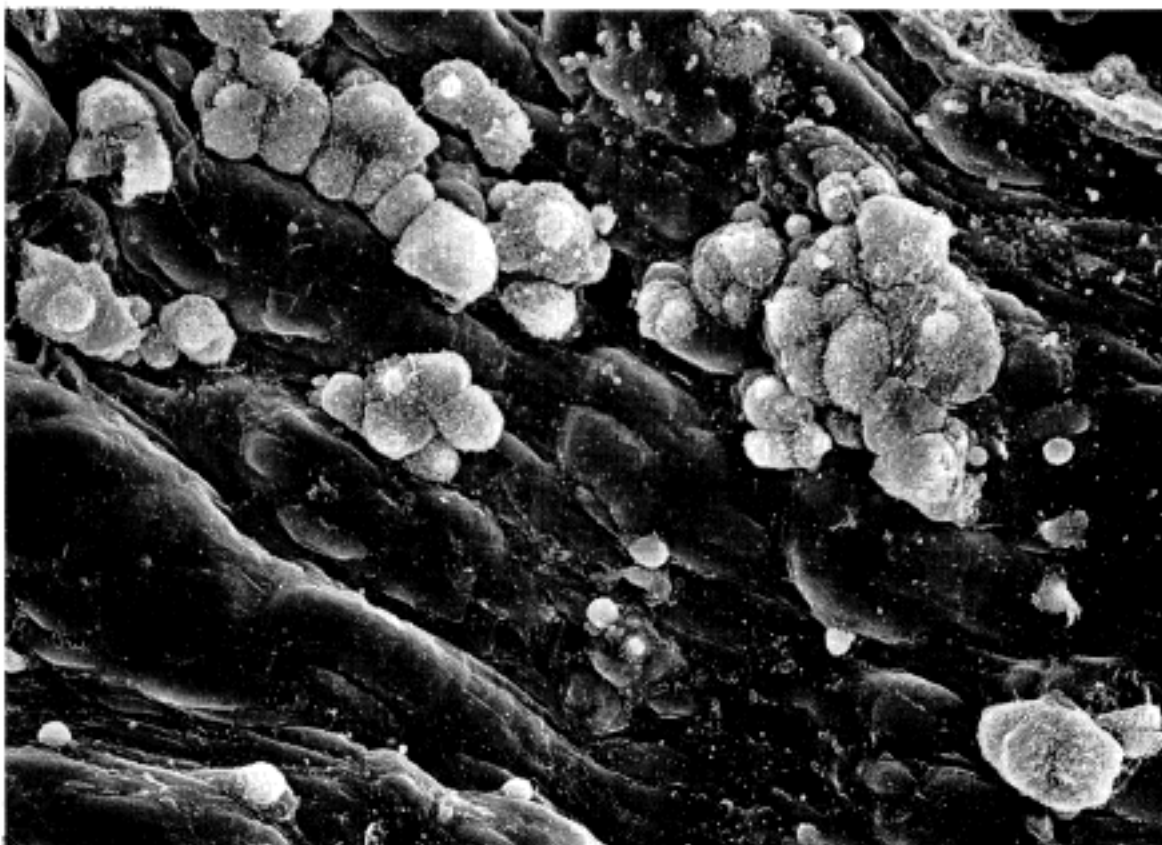


Fig. 8. Marked aggregation of activated monocytes and platelet clumps on the swollen endothelial surface(cholesterol only group, 8 weeks, $\times 500$).

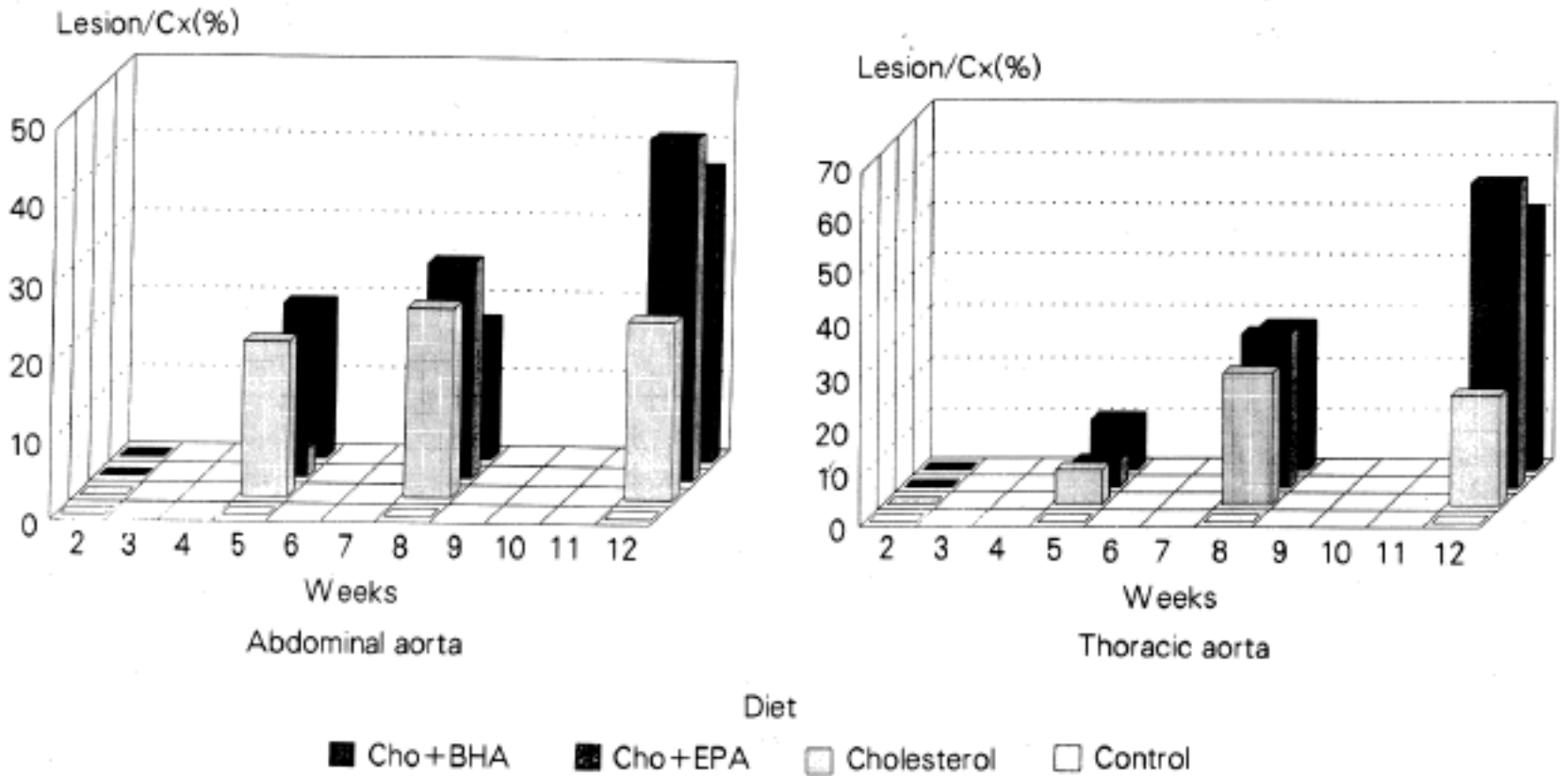


Fig. 9. Comparison of lesion areas per cross section among dietary groups.

많이 관찰되었다(Fig. 5). 그리고 어떤 포말세포들은 변성의 변화를 보여주고 있었다.

3) 주사전자현미경적 변화: 주사전자현미경상에서는 대조군에서는 평행으로 달리는 규칙적으로 배열된 내피세포들이 잘 관찰되었으나 실험 2주때에 콜레스테롤 +EPA 투여군에서는 벌써 단핵구의 혈관내피부착이 관찰되었으며(Fig. 6), 실험 5주때에는 콜레스테롤을 투여한 세군 모두에서 내피세포의 종창, 결손과 혈소판의 부착이 관찰되었다(Fig. 7). 실험 8주때에는 역시 콜레스테롤투여군들에서 이러한 내피세포의 결손과 함께 많은 단핵구들과 혈소판들의 심한 내피부착이 관찰되었으며(Fig. 8) 이들 변화는 복부동맥보다 흉부동맥에서 더심한 경향을 보였다. 실험 12주때에도 역시 비슷한 변화를 볼 수 있었다. 실험군간의 비교에서는 콜레스테롤에 어유를 첨가한 군에서 다른군에 비하여 좀 더 심한 양상이 보였다.

4) 화상분석: 화상분석(Morphometry)을 통한 혈관 단면적당 동맥경화병변의 면적비를 산출한 결과를 그래프로 그려본 결과(Fig. 9) 실험 5주때에는 콜레스테롤 단독 투여군에서는 복부동맥에서 흉부동맥보다 약 두배의 병변이(복부:19.8%, 흉부:8.9%) 관찰되었으나 시간이 경과하면서 이 차이는 적어졌으며 콜레스테롤+EPA군과 콜레스테롤+BHA군에서는 혈관간의 차이는 통계학적인 의의가 없었다. 실험 8주 이후에는 콜레스테롤단독 투여군을 제외하고는 실험기간에 비례하여 대체적으로 상대적인 병변의 크기가 증가하여 12주때 콜레스테롤+EPA군에서 최고의 수치(흉부동맥:60%, 복부동맥 43.8%)를 나타냈다.

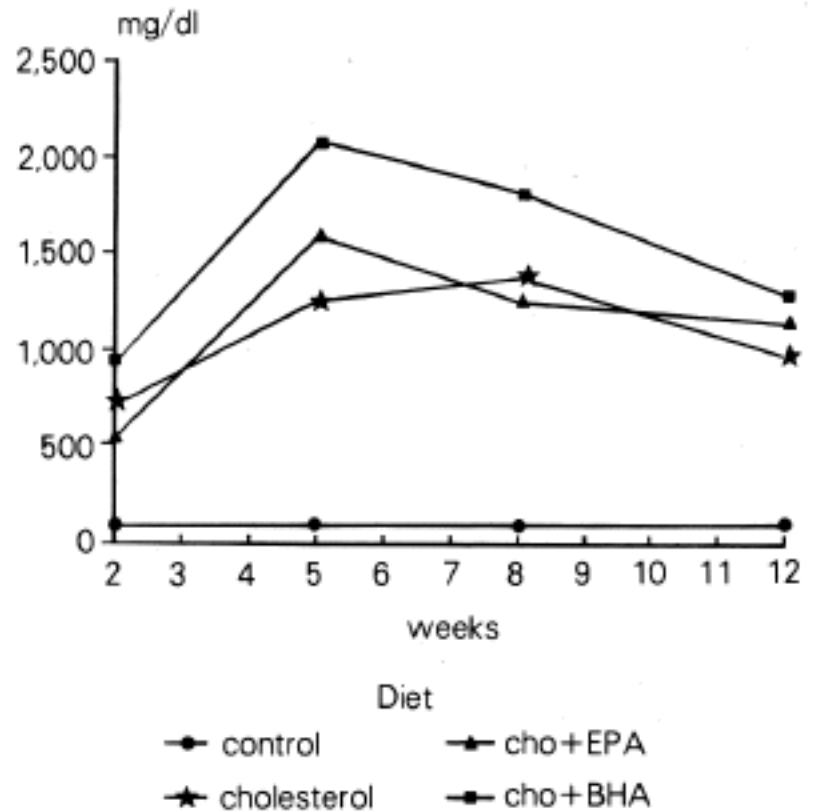


Fig. 10. Serum cholesterol levels.

3. 혈청내 지질성분의 변화

혈중 콜레스테롤의 변화는 콜레스테롤을 투여한 세군에서 5주이후 모두 현저히 증가하였으며($p < 0.05$) 이후 시간이 경과하면서 다소 감소하였고 BHA를 첨가한 군에서 가장 높았으나 대조군을 제외한 실험군간

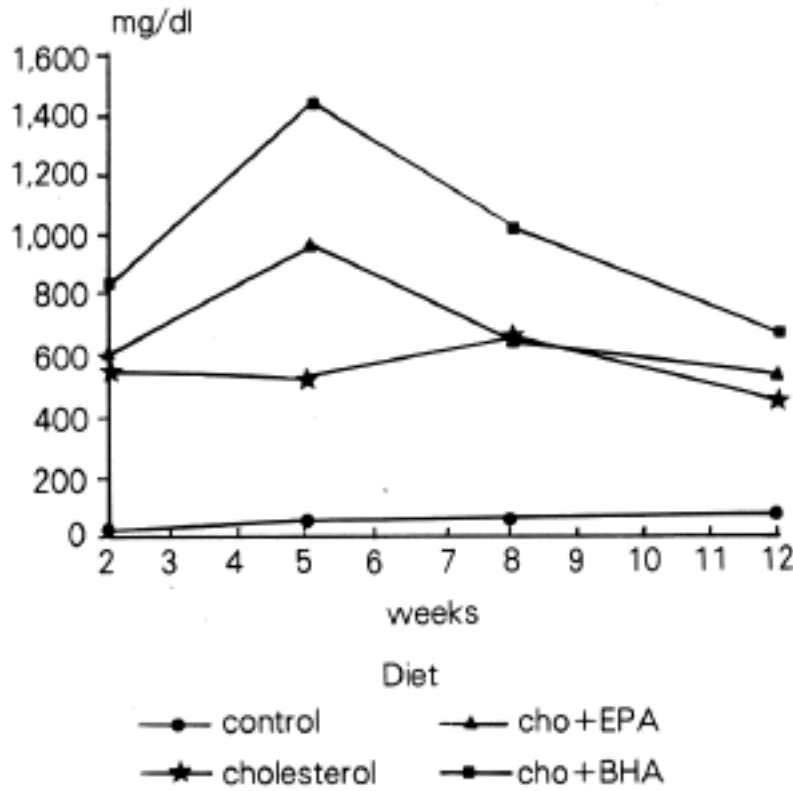


Fig. 11. Serum LDL-cholesterol levels.

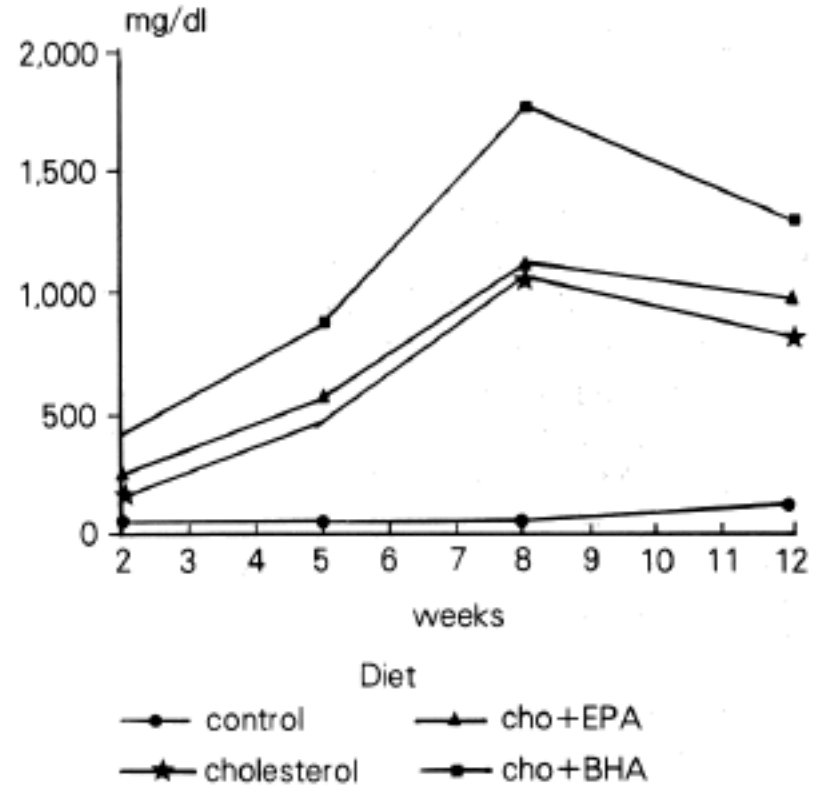


Fig. 13. Serum HDL-cholesterol levels.

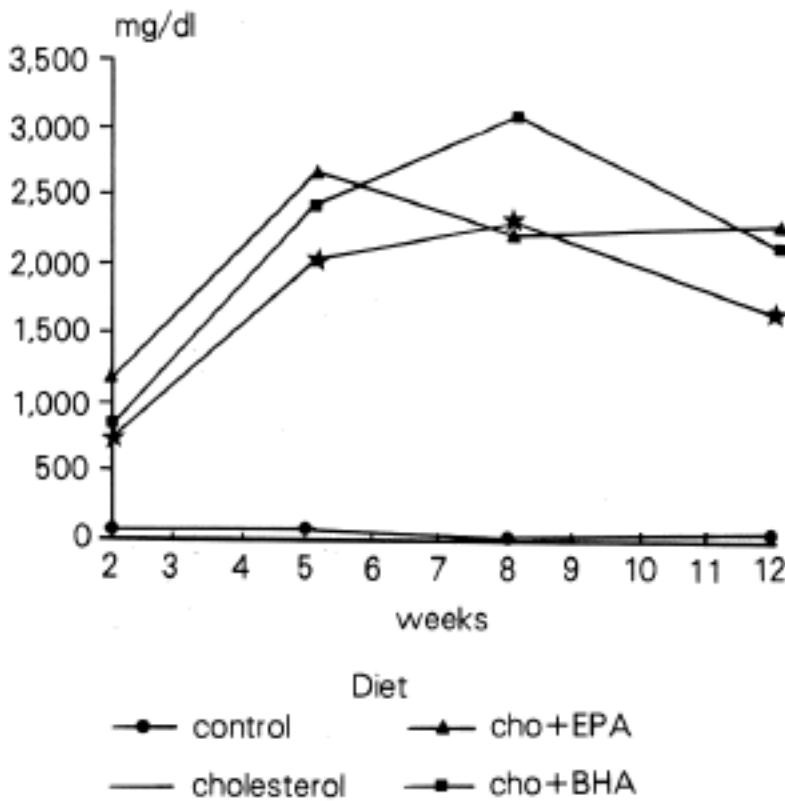


Fig. 12. Serum VLDL-cholesterol levels.

의 통계학적 의의 없었다(Fig. 10 참조). 혈중 LDL 역시 실험 2주부터 콜레스테롤을 투여한 세 군모두에서 증가하였는데($p < 0.05$), EPA와 BHA를 첨가한 군에서는 5주때에 가장 높았고 이후 감소하여 12주때에는 2주때와 비슷한 수치를 보였으나 BHA군에서 EPA군보다 유의하게 높았고($p < 0.05$), 콜레스테롤 단독 투여군에서는 실험기간동안 큰 변화가 없었다(Fig.

11 참조). 혈중 VLDL은 콜레스테롤을 투여한 세 군모두에서 2주때에 다소 증가를 하였으며 5주때에 급격한 증가를 보였고 이후 그 수치가 유지되었다($p < 0.05$). 그러나 대조군을 제외한 실험군간의 통계학적 의의 없었다(Fig. 12 참조). 혈중 HDL은 콜레스테롤을 투여한 세 군에서 실험 2주때부터 서서히 증가하여 8주때에 가장 높았으며($p < 0.05$) 특히 BHA 첨가군에서 높았으나 대조군을 제외한 실험군간의 통계학적 의의는 없었다(Fig. 13 참조).

고 찰

어유가 동맥경화증을 연구하는 사람들의 관심을 끈 것은 1971년 Bang⁷⁾을 시작으로 Dyerberg⁸⁾, Kromann⁹⁾등이 그린란드 에스키모인들을 상대로 한 역학조사의 결과를 발표하면서였다. 이들은 덴마크사람들과의 비교에서 n-3(혹은 w-3) 불포화지방산이 많이 함유된 육식을 주식으로 하고 있는 에스키모인들에서 혈중 지방단백이 현저하게 낮고(HDL만 예외) 이들은 혈소판 응집력의 감소로 인한 bleeding time의 지연과 함께 심근경색으로 인한 사망율이 덴마크나 북미주인에 비해 거의 1/10정도밖에 안되고 있다는 사실에 비추어 그들의 식사에 많이 함유돼 있는 n-3 불포화지방산이 동맥경화를 억제시키는데 어떤 작용이 있을 것이라고 강한 의심을하였으며 이후로 이들 지방산에 대한 수많은 연구가 이루어지고 있다.

n-3 불포화지방산은 실험적으로 동맥경화증을 억제시키며¹⁰⁻¹¹⁾ 심혈관계질병에 의한 사망감소나 예방효과가 있는 것으로 동물실험¹²⁾과 사람을 대상으로한 임상

연구보고¹⁴⁻¹⁷⁾도 있다. 그러나 n-3 불포화지방산이 동물실험에서 별다른 영향이 없으며^{18,19)} 오히려 더 심해졌다는 보고²⁰⁾도 있어 아직 이에 대한 단정은 내리기 어려운 실정이다.

어유가 동맥경화증을 억제시킬 수 있다는 기전은 어유의 주성분인 Eicosapentaenoic acid와 Docosapentaenoic acid(DHA)는 소위 n-3 fatty acid로서 조직내의 n-6 fatty acid인 Arachidonic acid에 경쟁적으로 작용하여 결국 Arachidonic acid의 대사과정중 cyclooxygenase pathway를 통한 아주강한 혈관 수축 및 혈소판 응집인자인 Tromboxane A₂ (TxA₂)의 생성을 억제하는 반면 Prostacyclin의 대체효과(PGI₂→PGI₃)로 혈관확장 및 항혈소판응집 작용을 하게 되며^{21,22)} Leukotriene 감소로 chemotaxis 및 염증반응을 저하시켜²³⁾ 결과적으로 동맥경화증을 억제시킨다는 이론이다.

저자들의 실험결과 0.5%라는 비교적 적은 양의 콜레스테롤에 의해서도 가토의 동맥벽에서는 동맥경화증 병변이 잘 생성됐으며 초기에는 주로 내피세포의 종창, 세포질의 일부탈락등이 관찰되어 고콜레스테롤 혈증만으로도 동맥내피세포의 손상이 일어난다는 것을 확인 할 수 있었으며 이후 단핵구의 내피부착과 혈관내 침윤소견이 관찰되고 12주에 이르러서는 사람에서와 유사한 괴사도 관찰되었다. 이러한 병변의 양상은 초기의 동맥경화증 유발면에서 저농도의 콜레스테롤투여로도 가토에서 충분히 실험모델로 사용할 수 있음을 확인 시켜 주었다.

단핵구의 혈관내피부착을 잘 관찰 할 수 있는 주사 현미경상으로는 콜레스테롤에 어유를 첨가한 군에서 다른군에 비하여 좀더 심한 양상이 보인 것은 전체적인 병변의 크기가 역시 어유첨가군에서 컸던 것과 관계가 있다고 생각된다. 그러나 저자가 돼지에서 했던 실험²⁴⁾에서는 어유군에서 지방투여군에 비하여 전체병변의 크기는 같았으나 단핵구의 부착이 감소했던 결과와는 약간 달랐다. 이 이유는 확실한 것은 알 수 없으나 개체간의 차이와 식이내의 지방양의 차이에 따라 많은 차이가 보고되고 있기 때문에²⁵⁾ 이러한 원인이라 할까 하는 생각이며 좀더 다양한 농도의 실험이 필요하다고 사료된다. 병리학적으로 관찰된 소견들은 대체적으로 인간의 병변에서 관찰되는 것들과 비슷하며 특히 근육세포내의 RER의 비대는 정상시의 근육세포에서는 관찰되지 않는 소견으로서 이들세포가 단순히 수축과 이완만을 하는 세포가 아니라 때에 따라서는 단백질의 합성에도 관여한다는 것을 잘 보여주는 것으로서 이러한 세포를 따로 합성형 근육세포(synthetic smooth muscle cell)라고 하며 이는 혈관내 근육세포의 기능적 또는 형태적변화²⁶⁻³¹⁾의 한 근거라고 생각된다. 또 임파구의 침윤도 관찰되는 것은 면역학적 반응이 동맥경화증의 병인에 중요하다고 하는 최근의 이론들³²⁻⁴⁰⁾에 관련되는 소견이다. 이들 세포는 주로 T

림프구⁴¹⁾로 알려져 있으며 interferon γ (IFN γ), granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor α (TNE α)를 통하여 단핵구/탐식구를 자극한다⁴²⁾.

항산화제인 BHA를 첨가한 군에서의 병변크기가 콜레스테롤 단독투여군에 비해서는 병변이 증가하였으나 어유첨가군에 비해서는 8주이후 병변의 감소를 보였다. 이 결과는 초기의 동맥경화병변형성에도 지방단백의 산화가 큰영향을 미친다는 것을 확인 할 수 있는 결과로서 최근 노화(老化) 연구에서도 지방의 산화가 큰비중을 차지하고 있는 것에 비추어 동맥경화증의 예방에도 항산화제의 사용에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 항산화제인 BHA는 근원적인 부작용⁴³⁾이 있으나 그 용량과 방법을 잘 고려하면 인체에 유익하게 쓰일수 있다고 생각한다.

혈중 콜레스테롤과 지방단백의 변화는 콜레스테롤을 투여했던 군들에서 전반적으로 초기부터 증가하여 8주때에 가장 높은 수치를 보이고 12주때에는 그것이 유지되거나 약간 감소하는 경향을 보인다. 실험군간의 비교에서 BHA 첨가군에서 가장 높았으나 통계적으로 의는 LDL만이 있었다(p<0.05). 이중에서 동맥경화증의 발생과 비례관계에 있다고 알려져 있는 LDL^{44,45)}은 EPA군에 비하여 그 수치가 높았음에도 불구하고 병변의 증가가 없었다는 결과는 지방의 산화억제가 동맥경화병변의 발생에 큰 역할을 하고 있음을 추측 할 수 있으며 Björkhem등⁴⁶⁾의 결과와 일치한다. 그러나 항산화제인 BHA가 혈중 콜레스테롤이나 지방단백의 증가와 관련이 있다는 보고는 아직 없으며 저자의 생각으로는 BHA가 본 실험동물에서 그 기전은 알 수 없으나 지방단백의 대사과정중에 관여했을 것으로 추정된다.

실험결과를 종합해 볼 때 식이에 0.5%의 콜레스테롤 첨가에의하여 가토에서도 인체에서와 비교적 유사한 동맥경화증 병변이 유발되었으며 어유성분인 EPA와 항산화제인 BHA의 첨가로서 병변은 비슷하게 증가하였으나 혈중콜레스테롤과 지방단백은 BHA첨가군에서 훨씬더 많이 증가하였다. 기대되었던 EPA의 동맥경화병변의 억제효과는 관찰이 되지않았다. BHA의 첨가는 혈중 콜레스테롤이나 지방단백의 더 높은 증가를 나타냈으나 병변의 증가는 없었던 것으로 볼 때 동맥경화병변의 감소효과가 있다고 생각된다. 따라서 EPA에 대한 연구는 그 투여량을 달리한 연구가 필요하며 항산화제 역시 그양에 대한 억제효과와 임상적인 사용 가능성에 대한 보다 세밀한 연구가 필요할 것으로 생각되며 저자들은 이제 동맥경화증을 남의나라 일로 생각할때가 아니며 우리나라에서도 이에 대한 대비가 시급하다고 생각한다. 특히 그나마 국내에서 수행되고있는 이병에 대한 연구는 주로 임상적연구에 치우쳐있기 때문에 보다 심도있는 병태생리학적 기초 연구가 필요하다고 사료되는 바이다.

결 론

생후 45일된 웅성 New Zealand종 가토 28마리를 대상으로 0.5%의 콜레스테롤 식이와 콜레스테롤에 주요한 어유 성분인 eicosapentaenoic acid(EPA)와 항산화제로 쓰이고 있는 butyrate hydroxyanisole (BHA)을 각각 첨가하여 12주간 실험을 하여 동맥내 병변의 관찰과 혈중 지방단백의 변화를 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 콜레스테롤을 투여받은 모든 토끼들은 육안적으로 5주 이후부터 지방판(fatty streak)이 관찰되기 시작하여 8주 이후에는 거의 모든 동물에서 나타났으며 대동맥에서 분지되는 동맥들의 입구에서 현저히 많이 관찰되었고 이런 소견은 실험군간에 특별한 차이가 없었으며 광학현미경적으로는 5주때에는 내막하 포말세포의 축적이 확인되었다. EPA와 BHA첨가군들에서 콜레스테롤 단독 투여군보다 병변이 훨씬 심하였고 8주때부터는 내막하 대식구와 근육세포의 증식이 더욱 심해져 12주때에는 괴사도 관찰되었다. 흉부동맥과 복부동맥의 병변발생은 5주때에는 복부동맥에서 더 심한 발생경향을 보였으나 8주 이후에는 비슷하였다.

투과전자현미경상에는 콜레스테롤 투여군들에서 실험 초부터 소수의 대식구의 혈관내피부착이 관찰되었으며 그후 근육세포의 불규칙한 배열, 대식구의 내피부착과함께 내피하계 수많은 지방 공포를 가진 단핵구와 근육세포가 관찰되었다. 실험 12주때에는 콜레스테롤을 투여한 세군 모두에서 근육세포질내에 RER의 비대가 뚜렷해지면서 소위 합성형 근육세포(synthetic smooth muscle cell)들과 임파구의 침윤, 일부 포말 세포들의 변성들도 많이 관찰되었다.

주사전자현미경상에서 실험 2주때에 콜레스테롤 + EPA 투여군에서는 벌써 단핵구의 혈관내피부착이 관찰되었으며, 이후 콜레스테롤을 투여한 세군 모두에서 내피세포의 종창, 결손과 혈소판들이 심한 내피부착이 관찰되었고 이들 변화는 EPA를 첨가한 군에서 다른 군에 비하여 좀더 심한 양상이 보였다.

2) 화상분석(Morphometry)을 통한 단면적당 동맥경화병변의 면적비를 산출한 결과 실험 5주때에는 콜레스테롤 단독 투여군에서는 복부동맥에서 흉부동맥보다 약 두배의 병변이 관찰되었으나 시간이 경과하면서 이차이는 적어졌으며 EPA와 BHA첨가군간의 차이는 별로 없었다. 이 면적비는 실험기간에 비례하여 증가하여 12주때 EPA추가군에서 최고의 수치를 나타냈으나 실험군간의 차이는 없었다.

3) 혈중 콜레스테롤의 변화는 콜레스테롤을 투여한 세 군에서 5주이후 모두 증가하였으며($p < 0.05$) 이후 기간이 경과하면서 다소 감소하였고 BHA를 첨가한 군에서 가장 높았다. 혈중 LDL은 EPA와 BHA를 첨가한 군들에서는 5주때에 가장 높았으며 BHA군에

서 다른군들에 대하여 의의있게 높았다($p < 0.05$). 혈중 VLDL은 콜레스테롤을 투여한 세 군 모두에서 5주때에 급격한 증가를 보였다. 혈중 HDL은 콜레스테롤을 투여한 세 군에서 모두 증가하여 8주때에 가장 높았으며 특히 BHA 첨가군에서 가장 높았다.

이상의 결과로 기대했던 EPA의 항동맥경화효과는 관찰할 수 없었으나 BHA는 혈중 LDL의 높은 증가에도 병변의 증가가 없었고 동맥경화의 억제에 이로운 것으로 생각되는 HDL의 증가가 관찰되어 동맥경화증의 억제제로서 효과가 있는 것으로 생각되며 앞으로 이들 제제에 대한 보다 구체적인 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) DePalma RG, Insull Jr. W, Bellon EM, Roth WT, Robinson AV. *Animal models for the study of progression and regression of atherosclerosis. Surgery* 1972; 72: 268-74.
- 2) Malinow MR. *Regression and resolution in atherosclerosis. In Recent Advances in Arterial Diseases: Atherosclerosis, Hypertension, and Vasospasm. Ed. by Tulenko TN and Cox RH, New York, Alan R Liss Inc, 1986; 31-40.*
- 3) Fischer-Dzoga K, Fraser R, Wissler RW. *Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit aortic smooth muscle cells. I, Effects of lipoprotein fractions of hyperlipemic serum and lymph. Exp Mol Pathol* 1976; 24: 346-52.
- 4) Kim DN, Schmee J, Lee KT, Thomas WA. *Role of plasma intermediate and low density lipoprotein in early atherogenesis in hyperlipidemic swine. In: Swine in biomedical research, Ed. by Tumbleson ME, Plenum Publishing 1986 Vol. 3p. 1555-62.*
- 5) Watson ML. *Staining of tissue sections for electron microscopon microscopy with heavy metals. J Biophysic Biochem Cytol* 1958; 226: 475-79.
- 6) Reynolds ES. *The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol* 1963; 17: 208-12.
- 7) Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. *Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic west-coast eskimos. Lancet* 1971; 1: 1143-7.
- 8) Dyerberg J, Bang HO. *Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. Lancet* 1979; 2: 433-37.
- 9) Kromann N, Green A. *Epidemiological studies in the Upernivik District Greenland: Incidence of some chronic diseases 1950-1974. Acta Med Scand* 1980; 208 401-12.
- 10) Thomas WA, Kim DN, Sxhnee J. *Retardation of atherogenesis and other effects of a fish oil additive*

- to a hyperlipidemic diet for swine. *Ann NY Acad Sci* 1990; 598: 308-14.
- 11) Davis HR, Bridenstine RT, Vesselinovich D, Wissler RW. *Fish oil inhibits development of atherosclerosis in Rhesus Monkeys. Arteriosclerosis* 1987; 7: 441-9.
- 12) Weiner BH, Ockene IS, Levine PH, Cuenoud HF, Fisher M, Johnson BF, Daoud AS, Jarmolych J, Hosmer D, Johnson MH, Natale A. *Inhibition of atherosclerosis by cod-liver oil in a hyperlipidemic swine model. NEJM* 1986; 315: 841-50.
- 13) Hock CE, Holahan MA, Reibel DK. *Effect of dietary fish oil on myocardial phospholipids and myocardial ischemic. Am J Physiol* 1987; 252: H554-7.
- 14) Schmitz JM, van den Berg EK, Prewitt JP, Malloy CR, Willerson JT, Dehmer GJ. *Dietary supplementation with N-3 fatty acids may reduce the rate of restenosis after coronary angioplasty. Clin Res* 1987; 35: 6A.
- 15) Kromhout D, Bosschieter EB, Coulander CL. *The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. N Eng J Med* 1985; 312: 1205-11.
- 16) Wood DA, Riemersma RA, Butler S, Thomson M, Macintyre C, Elton RA, Oliver MF. *Linoleic and eicosapentaenoic acids in adipose tissue and platelets and risk of coronary heart disease. Lancet* 1987; 1: 177-82.
- 17) Fitzgerald GA, Catella F, Oates JA. *Eicosanoid biosynthesis in human cardiovascular disease. Hum Pathol* 1987; 18: 248-55.
- 18) Rich S, Miller JF, Charous S, Davis HR, Shanks P, Glagov S, Lands WEM. *Development of atherosclerosis in genetically hyperlipidemic rabbits during chronic fish-oil ingestion. Arteriosclerosis* 1989; 9: 189-96.
- 19) Clubb FJ, Schmitz JM, Butler MM, Buja LM, Willerson JT, Campbell WB. *Effect of dietary omega-3 fatty acid on serum lipids, platelet function, and atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. Arteriosclerosis* 1989; 9: 529-35.
- 20) Thiery J, Seidel D. *Fish oil feeding results in an enhancement of cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis* 1987; 63: 53-61.
- 21) Mehta JL, Lawson D, Mehta P, Saldeen T. *Increased prostacyclin and thromboxane A biosynthesis in atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4511-9.
- 22) O' dea K, Steel M, Naughton J, Sinclair A, Hopkins G, Angus J, He GW, Niall M, Martin Tj. *Butter-enriched diets reduce arterial prostacyclin production in rats. Lipids* 1988; 23: 234-42.
- 23) Schmidt EB, Pederson JO, Varming K, Ernst E, Jersild C, Grunnet N, Dyerberg J. *n-3 Fatty acids and leukocyte chemotaxis. Effects in hyperlipidemia and dose-response studies in healthy men. Arteriosclerosis and Thrombosis* 1991; 11: 429-35.
- 24) Kim DN, Schmee J, Lee CS, Eastman A, Ross JS, Thomas WA. *Comparison of effects of fish oil and corn oil supplements on hyperlipidemic diet induced atherogenesis in swine. Atherosclerosis* 1991; 89:191-201.
- 25) Harris WS. *Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. J Lipid Res* 1989; 30: 785-807.
- 26) Ross R, Glomset JA. *Atherosclerosis and arterial smooth muscle cell. Science* 1973; 180: 1332-9.
- 27) Kim DN, Schmee J, Ho HT, Thomas WA. *The "turning off" of excessive cell replicative activity in advanced atherosclerotic lesions of swine by a regression diet. Atherosclerosis* 1988; 71: 131.
- 28) Babaev VR, Bobryshev YV, Stenina OV, Torarak EM, Gabbiani G. *Heterogeneity of smooth muscle cells in antheromatous plaque of human aorta. Am J Pathol* 1990; 136: 1031-9.
- 29) Mosse PRL, Cambell GR, Wang ZL, Cambell JH. *Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal intimal thickenings adjacent tp atheromatous plaques with those of the media. Lab Invest* 1985; 53: 556-63.
- 30) Campbell GR, Campbell JH, Campbell IL, Horrigan S, Manderson JA, Mosse PRL, Renick RE. *Phenotypic changes in smooth muscle cells of human atherosclerosis plaque. In: Pathobiology of the hman atherosclerotic plaque. Ed. by Glagovs Newman III WP and Schaffer SA. Springer-Verlag NY, 1990; 69-76.*
- 31) Thomas WA, Jones R, Scott RF, Morroson E, Goodale F, Imai H. *Production of early atherosclerotic lesions in rats characterized by proliferation of "modified smooth muscle cells". Exp Mol Pathol* 1963; Suppl: 40-9.
- 32) Roberts JC. *The effects of serum sickness on cholesterol atherosclerosis in the rabbit. Circulation* 1960; 22: 657-76.
- 33) Minick CR, Murhy GE. *Experimental induction of atherosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. II. Effect of repeatedly injected foreign protein in rabbits fed a lipid-rich, cholesterol-poor diet. Am J Pathol* 1973; 73: 265-72.
- 34) Lamberson HV, Fritz KE. *Immunological enhancement of atherogenesis in rabbits. Arch Pathol* 1974; 98: 9-15.
- 35) Munro JM, Van Der Walt JD, Chalmers JAC, Cox EL. *An immunohistochemical analysis of human*

- aortic fatty streaks. Hum Pathol* 1987; 18: 375-82.
- 36) Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK. *Expression of Class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. J Clin Invest* 1985; 76: 125-32.
- 37) Hansson GK, Holm J, Kral JG. *Accumulation of IgG and complement factor C3 in human arterial endothelium and atherosclerotic lesions. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect A.* 1984; 92: 429-33.
- 38) Hansson GK, Bondjers G, Nilsson LA. *Plasma protein accumulation in injured endothelial cells. Immunofluorescent localization of IgG and fibrinogen in the rabbit aortic endothelium. Exp Mol Pathol* 1979; 30: 12-9.
- 39) Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. *Immune mechanisms in atherosclerosis. Arteriosclerosis* 1989; 9:567.
- 40) Hansson GK, Lagerstedt E, Bengtsson A, Heideman M. *IgG binding to cytoskeletal intermediate filaments activates the complement cascade. Exp Cell Res* 1987; 170: 338-45.
- 41) Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. *Regional accumulations of T-cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-40.
- 42) Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature* 1993; 362 • 29: 801-9.
- 43) Choe SY, Yan KH. *Toxicological studies of antioxidants, butyated hydroxytoluene(BHT) and butyated hydroxyanisole(BHA). Korean J Food Sci Tech-nol* 1982; 14: 283-288.
- 44) Kim DN, Schmee J, Lee KT, Thomas WA. *Role of plasma intermediate and low density lipoprotein in early atherogenesis in hyperlipidemic swine. In: Swine in biomedical research, Ed by Tumbleson ME, Pelnum Publishing, 1986; 3: 1555-67.*
- 45) Fischer-Dzoga K, Fraser R, Wissler RW. *Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit aortic smooth muscle cells. I. Effects of lipoprotein fractions of hyperlipemic serum and lymph. Exp Mol Pathol* 1976; 24: 346-55.
- 46) Björkhem I, Henriksson-Freyschuss A, Breuer O, Diczfalusy U, Berglund L, Henriksson P. *The antioxidant butyated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. Arterioscl Throm* 1991; 11: 15-20.