

불포화 지방산의 종류와 사육기간이 흰쥐의 항혈전 작용, 혈액구성 및 혈소판의 지방산 조성 변화에 미치는 영향

김정선 · 김숙희 · 한용남*

이화여자대학교 식품영양학과

서울대학교 천연물과학연구소*

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

Kim, Jeong Seon · Kim, Sook He · Han, Yong Nam*

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University,

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul, Korea*

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect on polyunsaturated fatty acid diets and feeding periods on the antithrombosis, the hematological changes in the blood and fatty acid compositions of platelets in rats. Each group of rats was fed a diet containing 20% (W/W) corn oil, beef tallow, sardine oil and the general stock diet for 10, 20, 40 and 80 days.

Rats fed sardine oil diet showed significantly longer bleeding time than any other diet groups after 20 days feeding. The whole blood clotting time of sardine oil group fed for 80 days was increased significantly. The number of platelet and the concentration of hemoglobin showed no significant difference among all groups. The number of white blood cell was decreased continuously in sardine oil group after 10 days feeding. The level of malondialdehyde generation during thrombin-induced aggregation of platelets was decreased continuously in sardine oil group after 20 days feeding.

With regard to the composition of platelet fatty acid, the ratio of eicosapentaenoic acid(EPA, 20 : 5 ω -3) to arachidonic acid(AA, 20 : 4 ω -6) was increased in sardine oil group, but decreased in corn oil groups and beef tallow groups with days.

In conclusion, the rats fed sardine oil diet for more than 20 days showed the fact that EPA induced the antithrombosis, the changes in number of white blood cell and the fatty

acid composition of platelets.

KEY WORDS : antithrombosis · corn oil · beef tallow · sardine oil · cicosapentaenoic acid.

서 론

혈전증, 동맥 경화증, 심근 경색, 고혈압 등과 같은 순환기 질환의 발병율은 최근 수십년동안 계속 증가되어 왔으며, 현재 서구 사회에서 가장 높은 사망 원인이 되고 있다¹⁾. 우리나라에서도 1990년도 사망 원인 중 순환기 질환이 26.9%로 1위를 차지하였는데²⁾, 이는 칼로리의 과다 섭취, 동물성 식품의 소비 증가 추세 등으로 미루어 앞으로 더욱 문제가 심각해질 것으로 보인다. 이들 질환들은 혈관벽과 혈소판 응집이 직접적인 원인으로 알려져 있다³⁾.

Greenland 에스키모인에게는 순환기 계통의 질환이 거의 없으나, 출혈 경향이 있음이 알려졌다. 이는 다량 섭취하고 있는 생선의 지질 성분 중 cicosapentaenoic acid(20 : 5 ω-3, EPA) 및 docosahexaenoic acid(22 : 6 ω-3, DHA)와 같은 ω-3계 고도 불포화 지방산 때문이라는 보고⁴⁻⁵⁾가 있다. 일본에서 실시된 조사에서는 어식(魚食)을 많이 하는 어촌 주민이 농촌 주민에 비해서 순환기 질환에 의한 사망율이 현저히 낮은 것으로 밝혀졌다⁶⁾. 또한, 화란에서도 과거 20년간 특정 지방에서의 사망 원인을 조사한 결과 어유 섭취가 순환기 질환의 방지에 큰 효과가 있는 것으로 보고되었다⁷⁾. 국내에서도 흰쥐에게 어유를 투여 하였을 때, 혈장 중 EPA의 함량이 상승하고 이에 따라 혈소판의 응집 능력이 저하한다고 알려졌다⁸⁻⁹⁾.

혈소판 응집은 2-series prostaglandin(PG)의 일종인 혈소판 유래의 thromboxane A₂(TXA₂)의 생성에 의해 유발되며, 혈관 유래의 prostacyclin(PGI₂)에 의해 억제된다¹⁰⁾. 세포가 어떤 물리적, 화학적 자극을 받을 때 생체막 인지질의 불포화 지방산이 유리되는데, PG는 이를 전구체로 하여 생성되는 prostanoid acid를 골격으로 하는 생리 활성 물질로서, 각 조직 세포에 따라 특이한 PG가 주로 합성되어 각 기관의 활동에 필요한 활성을 발휘한

다.

즉, TXA₂는 혈소판의 기능상 필요한 응집 반응을 촉진하는 반면, 혈관에서 유리되는 PGI₂는 출혈시 과도한 혈소판 응집을 억제하고, 또한 정상시 혈소판의 혈관 유착을 방지하는 등 TXA₂와 PGI₂는 상호 길항적으로 작용하여 혈관계의 항상성 유지에 기여한다는 기전이 밝혀지고 있다¹¹⁾. 이들 두 물질은 arachidonic acid(20 : 4 ω-6, AA)를 전구체로 하여 합성된다.

한편 3-series PG의 전구체인 EPA로부터 생성되는 TXA₃는 TXA₂보다 혈소판 응집능이 약한 반면, PGI₃는 PGI₂와 같은 정도로 항혈전 효과를 나타내므로 어유를 많이 섭취하는 집단에서 순환계 질환의 발병율이 낮다고 알려지게 되었다.

식이 지방의 차이에 따른 지질 대사에 지방의 불포화도가 가장 큰 영향을 미친다고 알려져 있으나, 각 유지 식품이 갖는 특이 지방산 성분의 종류도 또 다른 중요한 인자로 대두되며¹²⁾, 이런 관점에서 볼 때 어유는 흥미있는 연구대상이 되고 있다. 어유는 불포화도가 높아서 식물성유와 유사하다 하겠으나 식물성유의 불포화 지방산이 ω-6계열인 것에 비해 어유는 ω-3계열의 지방산의 함량이 높으며 또한 탄수소가 20개 이상의 고도 불포화 지방산이 상당량 포함되어 있다는 점이 특이하다¹³⁾.

본 연구에서는 EPA가 항혈전 작용과 혈액 구성 변화에 영향을 미친다는 보고¹¹⁾에 따라, ω-3계인 EPA의 직접적인 공급원으로서 비교적 값이 저렴한 정어리유를, ω-6계인 linoleic acid 공급원으로서 옥수수유를, ω-9계인 oleic acid의 공급원으로서 우지를 선택하였다. 혈소판의 수명 반감기가 10일 이내라는 문헌¹⁴⁾에 근거하여, 흰쥐에게 10일, 20일, 40일, 80일간 식이 무게당 20%의 지방을 함유(열량의 30%에 해당)한 식이와 4%의 지방을 함유한 고형 사료를 각각 자유 급식시켜 보았다. 이들 실험군의 혈소판의 응집능을 관찰하기 위한 지표로서

출혈 시간을 측정했고, 혈소판, 혈액 응고계를 관찰할 수 있는 지표로 전혈(全血) 응고시간을, 혈액 구성에 변화를 주는지에 관해서는 혈소판수, 백혈구수, 헤모글로빈양을 측정했다. 또한, 혈소판으로부터 TXA₂의 생성을 간접적으로 측정할 수 있는 척도인 malondialdehyde(MDA) 생성양¹⁵⁾과 혈소판 내의 지방산 조성을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

실험 동물은 100~110g된 Sprague-Dawley계 수컷

Table 1. Composition of diets (g/kg diets)

Group Diet Ingredients	Corn Oil	Beef Tallow	Sardine Oil
Corn Starch	600	600	600
Casein	150	150	150
Corn Oil	200	-	-
Beef Tallow	-	200	-
Sardine Oil	-	-	200
Salt Mixture ¹⁾	50	50	50
Vitamin A,D Mixture ²⁾	1 ml	1 ml	1 ml
Vitamin E,K Mixture ³⁾	2 ml	2 ml	2 ml
Water Soluble Vitamin ⁴⁾	-	-	-
Vitamin B ₁₂ ⁵⁾	1 ml	1 ml	1 ml

1) Salt Composition(g/kg diet) : Calcium Carbonate 300.0, Dipotassium Phosphate 322.5, Magnesium Sulfate · 7H₂O 102.5, Sodium Chloride 167.5, Monocalcium Phosphate · 2H₂O 97.5, Ferric Citrate · 6H₂O 15.5, Potassium Iodide 0.8, Zinc Chloride 1.0, Copper Sulfate · 5H₂O 0.6, Manganous Sulfate · H₂O 5.0, Sodium Selenite 0.1, Chromium Potassium Sulfate · 24H₂O 0.55

2) Vitamin A,D Mixture(ml/kg diet) : Vitamin A 0.1 (850 I.U.), Vit D 0.01 (85 I.U.), Corn Oil 1ml

3) Vitamin E,K Mixture(2ml/kg diet) : α-Tocopherol Acetate (Vitamin E) 50mg, Menadin(Vitamin K) 2mg, Corn Oil 2ml

4) Water Soluble Vitamins(mg/kg diet) : Chloride 2, 000, Thiamin Hydroxide 10, Riboflavin 20, Nicotinic Acid 120, Pyridoxine 10, Calcium Pantothenate 100, Biotin 0.05, Folic Acid 4, Inositol 500, p-Amino Benzoic Acid 100

5) Vitamin B₁₂ Solution
Vitamin B₁₂ 5mg/Disilled Water 100ml

140마리를 난괴법에 의하여 16군으로 나누어 10일, 20일, 40일, 80일간 사육하였다. 실험에 사용한 실험 식이의 구성은 Table 1과 같다. Stock Group의 식이 조성은 조단백질 22%, 조탄수화물 61%, 조지방 4%, 무기질 8%, 조섬유 5%인 고품 사료를 사용하였다. 식이 중 각 식용유의 지방산 조성은 Gas Chromatography로 분석하였으며 분석 조건 및 결과는 Table 2, 3과 같다.

2. 체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이 효율

체중과 실험 기간동안의 식이 섭취량은 전기간을 통하여 매주 3회씩 일정한 시간에 측정하였다. 식이 효율은 실험 전기간의 체중 증가량을 같은 기간 동안에 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

3. 출혈 시간 및 전혈 응고 시간의 측정

출혈 시간은 Hornstra법¹⁶⁾에 의하여 Sodium Pentobarbital(40mg/kg B.W.)을 복강 내에 주사하여 마취시킨 후, 꼬리를 자른 직후부터 지혈될 때까지의 시간을 출혈 시간으로 정하였다. 마취에서 깨어난 후 다시 Ethyl Ether로 마취시킨 후 3.13% Sodium Citrate를 사용하여 심장에서 혈액을 취하였다¹⁷⁾. 1.7% CaCl₂ · H₂O 200μl를 가하여 shaking한 후 응고가 생길 때까지의 시간을 측정하여 전혈 응고시간으로 평가하였다.

4. 혈소판 수, 백혈구 수, 헤모글로빈 함량 측정

Automatic Blood Cell Counter(Coulter, U.S.A.)기를 사용하여 Whole Blood 100μl를 주입시켜, 전기적인 변화의 증폭에 의해 analyzer에서 pulse pattern으로서 cell들을 구분하였다¹⁸⁾.

5. 혈소판 시료의 제조¹⁶⁾¹⁹⁾

Table 2. The condition of gas chromatography

Instrument	Hewlett-Packard 5840 A/GC
Column	Carbowax 20 M-Fused Silica Capillary Column 0.2mm i.d.×25m
Detector	F.I.D.
Column temp.	140°C~210°C, (Rate : 2°C/min)
Inj.temp.	240°C
Det.temp.	280°C
Carrier gas	Helium (20cm/sec)

불포화 지방산에 따른 흰쥐의 지질 대사 연구

Table 3. Fatty acid composition of dietary oil

(Unit : %)

Fatty acid	Corn oil	Beef tallow	Sardine oil
14 : 0	—	2.6	5.8
16 : 0	12.0	25.1	14.8
1	—	—	7.9
18 : 0	1.3	23.1	7.0
1 (ω-9)	25.7	42.4	9.9
2 (ω-6)	58.4	3.6	1.2
3 (ω-3)	0.8	—	1.0
20 : 0	—	1.8	0.5
1	—	—	3.6
4 (ω-6)	—	—	1.3
5 (ω-3)	—	—	17.3
22 : 1	—	—	4.6
5 (ω-3)	—	—	2.6
6 (ω-3)	—	—	12.6
Rcst	1.5	1.4	9.9
polyunsaturated fatty acid	59.5	3.6	36.0
P/S ratio*	4.5	0.07	1.3

*P : polyunsaturated fatty acid, S : saturated fatty acid

채취한 혈액을 원심 분리기(Sorvall RT-6000 Centrifuge)로 분리하여 platelet rich plasma(PRP)를 얻은 후, 상등액은 버리고 platelet pellet을 얻었다. 이것을 0.01M phosphate buffered saline(pH 7.4)으로 농도가 1.5×10^9 platelets/ml되게 현탁시켜서 malondialdehyde(MDA) 측정 시료로 사용하였다.

Platelet pellet에 0.01M phosphate buffered saline을 넣어 2800rpm에서 10분간 원심 분리하고, 다시 0.01M phosphate buffered saline에 현탁시켜 지방산 분석 시료로 사용하였다.

6. Malondialdehyde(MDA) 생성량의 측정¹⁶⁻¹⁹⁾

혈소판 현탁액(1.5×10^9 platelets/ml) 1ml을 37.5°C 항온조에서 3분간 미리 배양한 후, thrombin 100μl (0.05U/μl)을 가하여 혈소판을 응집시켰다. 반응시킨 혈소판을 Thiobarbituric Acid(Sigma Chemical Co.)로 발색시킨 후 n-BuOH층을 UV-spectrometer (Gilford, 2600)로 534nm에서 흡광도를 측정하였다²⁰⁾. 측정된 흡광도에서 $\epsilon = 1.56 \times 10^5$ (molecular extraction coefficient)에 의해 10^9 개의 혈소판에서 생성된 MDA nmol수를 계산하였다¹⁴⁾.

7. 지방산 조성의 분석

혈소판 지질의 추출은 Bligh and Dyer법²¹⁾으로 실시하였다. 에스테르 교환 반응을 시켜서 지방산 메틸 에스테르를 제조한 것을 hexane 10μl에 녹여 기체 크로마토그래피의 시료로 사용하였다²²⁾. 이

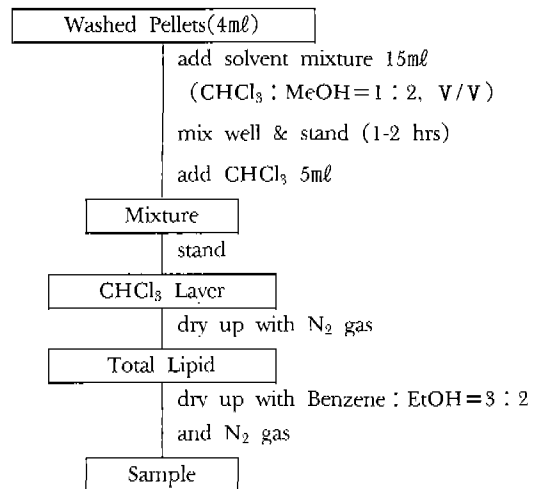


Fig. 1. Preparation of Total Lipid.

과정을 Fig. 1에 제시하였고, GC의 분석 조건²³⁻²⁶⁾은 Table 2와 같다.

식용유의 지방산 메틸 에스테르는 혈소판 지방산 메틸 에스테르와 같은 방법으로 지방산 조성을 측정하였다.

8. 자료의 처리

각 실험군의 평균치간의 유의성을 $\alpha=0.05$ 의 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였다. 사육 기간(A)와 식이(B)에 따른 차이는 2요인 분산 분석으로 분석하였다.

결 과

1. 체중 변화량

Table 4에서와 같이 실험 시작시 동물의 초기 체중을 군간에 유의적 차이가 없도록 120~130g에 맞추어 사육을 시작하였다. 대체적으로 Stock Group의 체중 증가량이 다른 세 Group에 비해 유의적으로 컸다. 특히, Sardine Oil Group의 체중

증가량이 가장 적었는데, 이것은 어유 과량 섭취시 체중 증가가 감소된다는 이 등의 보고²⁶⁾와 일치한다.

Stock Group는 사육기간이 증가함에 따라 체중 증가량이 감소하였고 다른 세 Group에서는 사육 20일까지는 체중 증가량이 유의적으로 증가했으나, 그 이후로는 오히려 감소 추세를 나타내었다. 위에서 살펴본 바와 같이, 체중 증가량은 사육기간이 식이에 따라 유의적인 변화 양상을 보여 주었다 (Table 4-1).

Table 4-1. Significant factor of experimental parameters

Experimental Parameters	Significant Factor
Final Body Weight	A, B, AB ¹⁾
Body Weight Gain	A, B, AB

* A : Significantly different among feeding periods at $\alpha=0.05$

B : Significantly different among diets at $\alpha=0.05$

AB : There is interaction between feeding periods and diets at $\alpha=0.05$

Table 4. Initial and final body weight and body weight gain mean \pm S.E.

Days of Feeding	Groups		Initial Body Weight (Unit : g)	Final Body Weight (Unit : g)	Body Weight Gain (Unit : g/day)
		Diet			
10		Stock	127.3 \pm 5.3 ^{N S 1)}	186.7 \pm 7.3 ^{b2)}	5.9 \pm 0.3 ^a
		Corn Oil	128.3 \pm 4.7	148.6 \pm 7.6 ^a	2.0 \pm 0.1 ^{dc}
		Beef Tallow	129.5 \pm 3.9	156.4 \pm 6.4 ^a	2.7 \pm 0.2 ^{cd}
		Sardine Oil	130.2 \pm 4.2	148.3 \pm 5.2 ^a	1.8 \pm 0.2 ^c
20		Stock	128.4 \pm 3.8	242.5 \pm 5.9 ^{bc}	5.7 \pm 0.4 ^a
		Corn Oil	130.6 \pm 4.3	198.7 \pm 3.9 ^b	3.4 \pm 0.2 ^{bc}
		Beef Tallow	130.9 \pm 5.0	206.8 \pm 5.4 ^{bc}	3.8 \pm 0.2 ^b
		Sardine Oil	129.8 \pm 3.6	201.5 \pm 3.2 ^{bc}	3.6 \pm 0.2 ^b
40		Stock	126.4 \pm 6.6	290.6 \pm 9.7 ^d	4.1 \pm 0.5 ^b
		Corn Oil	126.6 \pm 6.6	262.9 \pm 5.4 ^{cd}	3.4 \pm 0.3 ^{bc}
		Beef Tallow	122.6 \pm 6.2	270.5 \pm 6.7 ^{cd}	3.7 \pm 0.2 ^b
		Sardine Oil	125.5 \pm 8.3	233.6 \pm 4.8 ^{bc}	2.6 \pm 0.1 ^{cd}
80		Stock	131.0 \pm 5.9	395.2 \pm 10.1 ^e	3.3 \pm 0.2 ^{bc}
		Corn Oil	130.9 \pm 5.3	291.1 \pm 9.8 ^{cf}	2.0 \pm 0.2 ^c
		Beef Tallow	130.8 \pm 4.8	306.9 \pm 7.7 ^f	2.2 \pm 0.3 ^{dc}
		Sardine Oil	129.6 \pm 4.2	313.5 \pm 8.6 ^f	2.3 \pm 0.2 ^{dc}

1) not significant among all data within the column at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

2) Values with different alphabet within the column at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

불포화 지방산에 따른 흰쥐의 지질 대사 연구

Table 5. Daily food intake and food efficiency ratio

mean±S.E.

Groups		Daily Food Intake (Unit : g/day)	Food Efficiency Ratio
Days of Feeding	Diet		
10	Stock	19.1±0.7 ^{bc}	0.31±0.08 ^a
	Corn Oil	16.0±1.2 ^{bc}	0.12±0.01 ^b
	Beef Tallow	16.4±0.6 ^{bc}	0.16±0.03 ^b
	Sardine Oil	15.3±0.8 ^c	0.12±0.02 ^b
20	Stock	21.1±0.7 ^b	0.26±0.03 ^a
	Corn Oil	17.9±0.8 ^{bc}	0.19±0.01 ^b
	Beef Tallow	17.3±0.4 ^{bc}	0.20±0.02 ^b
	Sardine Oil	15.1±0.5 ^c	0.24±0.02 ^a
40	Stock	21.4±1.3 ^b	0.20±0.05 ^b
	Corn Oil	20.4±1.4 ^b	0.16±0.03 ^{bc}
	Beef Tallow	20.4±2.0 ^b	0.21±0.04 ^{ab}
	Sardine Oil	17.0±0.5 ^{bc}	0.17±0.01 ^b
80	Stock	24.1±0.8 ^a	0.14±0.02 ^b
	Corn Oil	19.1±0.8 ^{bc}	0.11±0.01 ^b
	Beef Tallow	18.6±0.6 ^{bc}	0.12±0.02 ^b
	Sardine Oil	17.7±0.6 ^{bc}	0.13±0.03 ^b

* Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 5-1. Significant factor of experimental parameters

Experimental Parameters	Significant Factor
Daily Body Weight	B, AB ^a
Body Efficiency Ratio	AB

^a A : Significantly different among feeding periods at $\alpha=0.05$

B : Significantly different among diets at $\alpha=0.05$

AB : There is interaction between feeding periods and diets at $\alpha=0.05$

2. 일일 식이 섭취량 및 식이 효율

Table 5에서와 같이 대체적으로 Stock Group의 식이 섭취량(19.1~24.1g)이 다른 Group(15.1~20.4g)에 비해 유의적으로 컸다. 이것은 분말 형태의 식이보다는 흰쥐의 일반적인 고형 사료의 선호 경향을 반영하는 것으로 한 등의 보고²⁷⁾와 일치된 결과를 보인다. 또한, Stock diet의 fiber함유와 열량농도의 차이로 인한 영향도 생각해 볼 수 있다. Sardine Oil Group의 식이섭취량이 적은 이유는 고도 불포화 지방산의 강한 냄새와 향기로 인한 것이라고 생각된다. Stock Group과 Sardine Oil Group은 사육기간이 증가할수록 식이 섭취량이

증가하였다.

그러나, Corn Oil Group과 Beef Tallow Group은 사육 40일까지는 식이 섭취량이 증가하다가 그 이후로는 오히려 감소 경향을 보여주었다. 대체적으로 볼때, 일일 식이 섭취량은 식이와 유의적 관계를 갖고 있음을 알 수 있었다(Table 5-1).

사육 10일의 결과를 보면 Stock Group의 식이 효율(0.31)이 다른 식이 Group(0.12~0.16)보다 유의적으로 컸으나, 사육 40일 이후부터는 모든 Group의 식이효율에 있어서, 유의적인 차이가 나타나지 않음을 보이고 있다.

3. 출혈 시간

Table 6에서와 같이 사육 10일 경에는 모든 식이 Group간에 출혈 시간에 있어 거의 비슷한 수치(110.7~115.3초)를 나타내었다. 그러나, 사육 20일부터 Sardine Oil Group의 출혈시간(157.3초)이 Beef Tallow Group(115.8초)에 비해 유의적으로 현저히 연장되었다. Beef Tallow Group의 경우, 사육 기간 전반에 걸쳐 다른 Group에 비해 가장 빠른 지혈 효과를 나타내었다. 따라서, 출혈 시간은 사육

Table 6. Bleeding and whole blood clotting time (Unit : sec) mean ± S.E.

Groups		Bleeding Time	Whole Blood Clotting Time
Days of Feeding	Diet		
10	Stock	115.3 ± 18.0 ^d	149.3 ± 7.8 ^c
	Corn Oil	114.5 ± 4.4 ^d	160.9 ± 14.0 ^{ac}
	Beef Tallow	110.7 ± 9.9 ^d	154.2 ± 13.0 ^{ac}
	Sardine Oil	115.3 ± 15.0 ^d	157.7 ± 14.0 ^{ac}
20	Stock	144.7 ± 9.2 ^{bc}	153.7 ± 11.0 ^{ac}
	Corn Oil	116.0 ± 8.0 ^d	156.0 ± 12.0 ^{ac}
	Beef Tallow	115.8 ± 17.0 ^d	155.8 ± 14.2 ^{ac}
	Sardine Oil	157.3 ± 26.0 ^b	156.2 ± 14.8 ^{ac}
40	Stock	196.0 ± 41.0 ^{ab}	164.2 ± 11.0 ^a
	Corn Oil	166.7 ± 37.0 ^b	157.5 ± 24.0 ^{ac}
	Beef Tallow	129.5 ± 29.0 ^c	156.8 ± 16.0 ^{ac}
	Sardine Oil	256.7 ± 25.0 ^a	174.5 ± 15.1 ^{ab}
80	Stock	223.7 ± 14.0 ^{ab}	165.9 ± 19.0 ^a
	Corn Oil	254.0 ± 32.0 ^a	164.5 ± 7.4 ^a
	Beef Tallow	171.6 ± 25.0 ^b	155.7 ± 11.0 ^{ac}
	Sardine Oil	272.5 ± 15.0 ^a	196.6 ± 18.1 ^b

* Values with different alphabet within the column were significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 6-1. Significant factor of experimental parameters

Experimental Parameters	Significant Factor
Bleeding Time	A, B, AB*
Whole Blood Clotting Time	B

* A : Significantly different among feeding periods at $\alpha=0.05$

B : Significantly different among diets at $\alpha=0.05$

AB : There is interaction between feeding periods and diets at $\alpha=0.05$

기간과 식이에 따라 각각 유의적인 변화 양상을 나타냄을 알 수 있었다(Table 6-1).

4. 전혈 응고 시간

Table 6에서와 같이 사육 10일과 사육 20일 경에는 모든 식이 Group에서 전혈 응고 시간(사육 10일의 경우 149.3~160.9초, 사육 20일의 경우 153.7~156.2초)의 차이가 없었다. 그러나, 사육 40일부터 Sardine Oil Group(174.5초) 이 다른 식이 Group(156.8~164.2초)에 비해 전혈 응고 시간이 다소 길어지는 경향을 보이다가 사육 80일경에는 다른 식이 Group(155.7~165.9초)에 비해 상당히

유의적으로 응고 시간이 연장되었다(Sardine Oil Group의 경우는 196.6초). Beef Tallow Group과 Sardine Oil Group간의 전혈 응고 시간 차이는 사육 40일 보다 사육 80일에 훨씬 크게 나타났다.

즉, 사육 전반기에는 전혈 응고 시간과 식이의 종류와는 유의적인 관계가 전혀 없었으나, 사육 80일경에는 Sardine Oil Diet Group의 전혈 응고 시간이 유의적으로 길었다(Table 6-1).

5. 혈소판 수, 백혈구 수, 헤모글로빈 함량

Table 7에서 보는 바와 같이, 각 Group 모두의 혈소판 수는 대체적으로 사육 기간이 길어질수록 증가하였다. Sardine Oil Group은 사육 전반에 걸쳐 다른 식이 Group에 비해 혈소판의 수가 가장 적게 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 사육 10일과 20일 경우에는 모든 식이 Group에서 5×10^8 개 정도를 나타내었으나, 사육 40일과 80일이 되면, 7×10^8 개로 혈소판 수가 증가되었다. 따라서, 혈소판 수는 사육 기간과 유의적 관계가 있음을 알 수 있었다(Table 7-1).

사육 10일의 결과에서 Sardine Oil Group($7.14 \times$

불포화 지방산에 따른 흰쥐의 지질 대사 연구

Table 7. Hematological Changes

mean± S.E.

Days of Feeding	Groups Diet	Platelet	White Blood	Hemoglobin	MDA Formation
		Number (Unit : 10 ⁸ mℓ)	Cell Number (Unit : 10 ⁷ mℓ)	Content (Unit : g/dℓ)	Content(Unit : n mol/ 10 ⁹ platelets)
10	Stock	5.32± 0.47 ^{a1)}	8.86± 1.10 ^{ac}	14.83± 0.30 ^{N.S.2)}	13.8± 0.4 ^{ab}
	Corn Oil	5.79± 0.45 ^a	9.20± 0.36 ^a	13.70± 0.31	14.5± 0.5 ^a
	Beef Tallow	5.36± 0.41 ^a	8.96± 1.20 ^{ac}	13.74± 0.38	14.8± 0.5 ^a
	Sardine Oil	5.12± 0.28 ^a	7.14± 0.45 ^c	13.88± 0.46	14.1± 1.3 ^{ab}
20	Stock	5.37± 0.58 ^a	10.63± 0.63 ^a	14.57± 1.2	14.3± 1.3 ^{ab}
	Corn Oil	5.81± 0.46 ^a	8.90± 0.57 ^{ac}	13.97± 0.29	13.9± 0.7 ^{ab}
	Beef Tallow	5.90± 0.51 ^a	9.40± 0.30 ^a	14.80± 1.30	14.7± 0.8 ^a
	Sardine Oil	5.36± 0.42 ^a	6.84± 0.63 ^c	14.72± 0.66	11.9± 2.1 ^b
40	Stock	7.08± 0.28 ^{ab}	13.58± 2.90 ^b	13.83± 0.76	12.4± 0.8 ^b
	Corn Oil	7.18± 0.78 ^b	9.90± 2.0 ^a	14.17± 1.40	13.2± 1.3 ^{ab}
	Beef Tallow	7.76± 0.72 ^b	12.00± 2.1 ^a	14.67± 0.88	15.3± 1.2 ^a
	Sardine Oil	6.94± 0.35 ^{ab}	6.90± 0.71 ^c	14.63± 0.71	8.6± 0.3 ^c
80	Stock	7.19± 0.25 ^b	11.78± 1.01 ^a	14.92± 0.27	11.3± 0.5 ^b
	Corn Oil	7.27± 0.27 ^b	10.86± 1.7 ^a	14.53± 0.40	13.6± 1.4 ^{ab}
	Beef Tallow	7.29± 0.35 ^b	12.10± 0.89 ^{ab}	14.80± 0.65	15.2± 1.6 ^a
	Sardine Oil	7.07± 0.28 ^{ab}	5.23± 0.36 ^d	14.57± 0.54	8.4± 0.7 ^c

1) Values with different alphabet within the column were significantly different at α=0.05 by Duncan's multiple range test

2) not significant among all data within the column at α=0.05 by Duncan's multiple range test

Table 7-1. Significant factor of experimental parameters

Experimental Parameters	Significant Factor
Platelet Count Number	A*
White Blood Cell Number	A, B, AB
Malondialdehyde	B, AB

* A : Significantly different among feeding periods at α=0.05

B : Significantly different among diets at α=0.05

AB : There is interaction between feeding periods and diets at α=0.05

10⁷개/ml)이 다른 Group(8.86×10⁷~9.20×10⁷)에 비해 가장 적은 수치를 나타내었다. 사육 20일부터 Sardine Oil Group의 경우, 사육 기간 증가와 더불어 백혈구 수가 대체로 감소된 경향을 보이는 반면, 다른 식이 Group의 경우, 유의적인 증가를 보여 주었다. 사육 기간이 증가할수록, Beef Tallow Group과 Sardine Oil Group간의 백혈구 수차이는 점점 커졌다. 즉, 백혈구 수는 사육 기간과 식이의 종류에 따라 유의적인 변화가 있었다(Table 7-1).

Table 7에서 살펴본 바와 같이 식이의 종류와 헤모글로빈 함량과는 아무런 관계가 없음을 알 수 있다. 헤모글로빈의 모든 수치(13.70~14.92g/dℓ)는 큰 변화없이 비슷한 경향을 보여 주었다.

6. Malondialdehyde(MDA) 생성량

10⁹개 혈소판에서 생성된 MDA는 Table 7과 같았다. 사육 10일에는 MDA 생성량에 있어서 모든 Group(13.8~14.8nM)간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 사육 20일부터 Sardine Oil Group(11.9 nM)이 다른 식이 Group(13.9~14.7nM)에 비해 MDA 생성량이 적은 수치를 나타내었으며 사육 기간 증가와 더불어 그 수치가 더욱 감소되었다. 그러나, 다른 Group은 큰 변화가 없었다. 사육 기간이 증가할수록, 다른 식이 Group들과 Sardine Oil Group의 MDA생성량의 차이가 점점 증가 하였다. 즉, MDA 생성량은 사육 기간과는 유의적 관계가 없지만, 식이의 종류와는 유의적 관계가 있음을 알 수 있었다(Table 7-1).

Table 8. Relative fatty acid composition of platelet(Unit : The value expressing the fatty acid content of 18 : 0 as 100)

Days of Feeding	20 days			40 days			
	Group	Corn Oil	Beef Tallow	Sardine Oil	Corn Oil	Beef Tallow	Sardine Oil
14 : 0		14.8	30.5	13.8	13.9	36.1	16.5
16 : 0		160.3	192.3	181.9	159.2	208.1	163.5
1		2.6	23.7	14.7	2.8	24.9	14.9
18 : 0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1(ω-9)		32.4	62.8	53.4	34.6	71.3	54.2
2(ω-6)		42.6	34.8	27.4	50.7	42.4	24.6
3(ω-3)		1.7	0.6	7.3	1.6	0.3	8.1
20 : 0		3.8	13.0	2.9	3.4	10.6	2.5
4(ω-6)		124.3	126.7	100.7	139.7	129.6	90.2
5(ω-3)		2.9	0.7	79.3	1.9	0.9	82.8
18 ω-3/ω-6		0.04	0.017	0.27	0.03	0.007	0.33
20 ω-3/ω-6		0.02	0.006	0.79	0.01	0.007	0.92
18+20 ω-3/ω-6		0.03	0.008	0.68	0.02	0.007	0.79

7. 혈소판의 지방산 조성

혈소판의 지방산 조성을 측정하여 Table 8에 정리하였다. GC로 동정이 가능한 범위까지, stearic acid(18 : 0)를 기준으로 하여 이를 100으로 설정하고 나머지의 지방산 조성은 기준에 대한 상대적인 수치로서 나타내었다.

Corn Oil Group의 경우, 18 : 2, ω-6는 상당히 높은 수치를 나타내었고, 사육 기간이 증가할수록 그 수치가 많아졌다(42.6에서 50.7로 증가). Beef Tallow Group의 경우는 18 : 1, ω-9의 함량이 모든 식이 Group중에서 가장 많았으며, 사육기간 증가와 더불어 그 수치가 증가하였다(62.8에서 71.3으로 증가). 18 : 3, ω-3와 20 : 5, ω-3의 경우, Corn Oil Group과 Beef Tallow Group은 매우 적은 함량을 포함하였다. 그러나, Sardine Oil Group의 경우, 다른 식이 Group에 비해 상당히 많은 양을 포함하였으며, 사육 기간 증가와 더불어 그 수치가 증가되었다.

즉, Sardine Oil Group은 사육 기간이 증가됨에 따라 ω-3/ω-6비는 탄소수 18개인 경우, 0.27에서 0.33으로 탄소수 20개인 경우 0.70에서 0.92로 증가되었으며 Corn Oil Group과 Beef Tallow Group은

그 비가 감소되었음을 알 수 있었다. 이것은 Sardine Oil Group에 있어서, oil자체 내의 EPA가 혈소판 내에 축적됨을 보여 준 것이다.

따라서, 앞의 실험 결과와 관련지어 보면, Sardine Oil Group에서의 혈소판 내의 EPA의 축적이 출혈 시간, 전혈 응고 시간, 백혈구 수 및 MDA 생성량에 있어서 유의적인 차이를 나타내게 하였음을 보여 주었다.

고찰 및 결론

본 논문에서는 지방산 조성이 현저히 다른 정어리유(eicosapentaenoic acid, EPA, 17.4% 함유), 옥수수유(linoleic acid, 58.4% 함유), 우지(oleic acid 42.4% 함유)를 각각 식이 무게당 20% 함유한 식이와 사판되고 있는 동물사료를 흰쥐에게 공급하였다. 혈소판의 수명 반감기인 10일을 기준으로, 10일, 20일, 40일, 80일 동안 사육 기간을 달리하여 불포화 지방산의 종류와 사육 기간이 항혈전 효과와 혈소판을 비롯한 혈액 구성에 어떻게 영향을 미치는지에 관해 연구해 보았다.

Sardine Oil을 섭취시킨 여러 연구에서 출혈 시간이 유의적으로 연장되었다고 하였다^{28,31)}. 본 연

구에서도 Sardine Oil Group에서 출혈 시간이 사육 기간이 길어짐에 따라 상당히 연장되었다. EPA/AA 비가 가장 적은 Beef Tallow Group에서 가장 빠른 지혈 효과를 나타내었고, 그 비가 가장 큰 Sardine Oil Group에서 출혈 시간과 전혈 응고 시간이 길어진 것으로 보아, 여러 논문에서 살펴 본 바와 같이, EPA/AA비가 혈관, 혈소판, 혈액 응고계의 항혈전 효과와 상당히 관련되어 있음을 알 수 있었다³²⁻³³⁾.

고도 불포화 지방산이 체내외에서 쉽게 산화되어 혈액 구성에 변화를 줄 수 있다는 보고^{12,13)}가 있어, 본 연구에서는 혈소판 수, 백혈구 수, 헤모글로빈의 양을 측정하여 본 결과, 백혈구 수에 있어서 사육 10일후부터 Sardine Oil Group이 다른 Group에 비해 이들 수치가 현저히 감소되었다. 이는 고도 불포화 지방산이 hydroperoxide와 같은 물질을 생성시켜, 백혈구 세포막을 파괴시킨 결과라고 생각된다. 혈전증 환자를 대상으로 한 연구³⁵⁾에서도, Sardine Oil을 5주간 먹인 결과, 혈소판 수와 헤모글로빈 함량에는 유의적인 차이가 없었으나, 백혈구 수에 있어서 유의적인 감소를 나타내었다. 따라서, EPA와 같은 물질이 세포의 파괴에 관여한다는 사실에 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한, 항혈전 작용을 일으키는 요인은 혈액 응고에 관여하는 혈소판의 수가 아니라, TXA₂와 같은 물질을 생성시키는 혈소판의 기능에 보다 더 관련이 있었다.

흰쥐에게 최소한 얼마의 기간동안 어유를 섭취시켰을 때 항혈전 작용과 혈소판의 지방산 조성에 변화를 주는가는 각 분석 항목에 따라 그 결과가 다르지만, 어유 내에 있는 EPA에 의해 사육 10일 후에는 백혈구 수가 유의적으로 감소하였고, 사육 20일 후에는 혈소판의 지방산 조성의 변화로 출혈 시간과 MDA 생성양에, 사육 80일 후에는 전혈 응고 시간에 영향을 줌을 관찰하였다.

사육 20일의 경우, Beef Tallow Group의 혈소판 지방산 조성 중 탄소수 18개 ω -3/ ω -6비를 1로 보았을 때, Corn Oil Group은 2.4, Sardine Oil Group의 경우는 15.9였다. 사육 40일 후에는, Corn Oil Group과 Sardine Oil Group이 각각 4.3과 47.1로

증가하였다. 탄소수 18개와 20개를 합친 ω -3/ ω -6의 비는 Beef Tallow Group을 1로 하였을 때, 사육 20일 후에는 Corn Oil Group이 3.8, Sardine Oil Group이 85이었다. Sardine Oil Group의 경우, 사육 40일 후에는 112.9로 현저히 증가되었다.

따라서, 흰쥐에게 어유를 최소한 20일 정도 섭취시킬 때 Sardine Oil내의 EPA가 혈관, 혈소판, 혈액 응고계에 변화를 주어, 항혈전 효과를 나타내었다고 생각된다.

Sardine Oil은 고도 불포화 지방산이 많이 포함되어 있는 관계로, 쉽게 산패되기 때문에, 아직까지 식용유원으로는 널리 이용되지 못하고 있는 형편이다. 특히 본 실험의 Sardine Oil의 급원으로 쓰인 정어리는 그 생산량이 연간 약 18만톤에 이르고 가격이 저렴할 뿐만 아니라 어체 무게의 약 2.5%, Sardine Oil의 기준으로는 30% 이상에 달하는 ω -3 고도 불포화 지방산을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다³⁶⁾.

그러므로, 보다 폭넓은 수준에서 식용으로 하기 위하여, 가공 공정의 하나인 탈취 과정과 Sardine Oil 섭취시 α -tocopherol과 같은 항산화제를 함께 섭취하는 등의 다각적인 연구와 관심이 필요하다고 본다.

Literature cited

- 1) Stamler J. Introduction to risk factors in coronary artery, McIntosh HD eds Baylor College of Medicine Cardiology Series. *Medical Communication, Northfield* 1(3), 1981
- 2) 보건 연간. 1991년, 보건 신문사
- 3) Weiss HJ. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *New Engl J Med* 293 : 531, 1975
- 4) Dyerberg J, Bang HO, Hjorne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland eskimos. *Am J Clin Nutr* 28 : 958-966, 1975
- 5) Dyerberg J, Bang HO. Eicoasapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet* 117-119, 1978
- 6) Kagawa Y, Nishizawa M, Suzuku M, Mijatake T, Hamamoto T, Goto K. Eicosapentaenoic acid in

- the serum of Japanese Islanders' low cardiovascular diseases. *J Nutr Sci Vitaminol* 28 : 441-453, 1982
- 7) Kromhout D, Boschieter B, Koulander DC. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New Engl J Med* 312(19) : 1205-1209, 1985
 - 8) 정승은, 하태열, 임정교, 조성희. 어유 식이에 의한 흰쥐 체내의 생화학적 변화 연구. *한국영양학회지* 17(4) : 290-296, 1984
 - 9) 서미영, 조성희. 식이 ω -3 지방산 섭취가 흰쥐 심장 미토콘드리아 호흡 및 지질 구성에 미치는 영향. *한국생화학학회지* 19(2) : 160-167, 1986
 - 10) Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *New Engl J Med* 300 : 1142-1147, 1979
 - 11) Marcus AT. The eicosanoids in biology and medicine. *J Lipid Res* 215 : 1511-1518, 1984
 - 12) Ruitter A, Jongbloed AW, Van Gent CM, Danse LHJC, Metz SHM. The influence of dietary mackerel oil on the composition of organs and on blood lipid composition in the young growing pig. *Am J Clin Nutr* 31 : 2159-2166, 1978
 - 13) Opstvedt J, Svaar H, Hansen P, Peetersen J, Langmark FT, Barlow SM and Dutie IF. Composition of lipid status in the hearts of piglet and rats on short term feeding of marine oils and rapeseed oil. *Lipids* 14 : 356-371, 1979
 - 14) Harker LA. *Prog. Hemostasis Thromb* 4 : 321, 1978
 - 15) 大石誠子. 과산화 지질 측정법. *최신의학* 33(4) : 660-663, 1978
 - 16) Hornstra G, Christ-Hazelhof E, Hadderman E, Nugteren DH. Fish oil feeding lowers thromboxane and prostacyclin production by rat platelets and aorta and does not result in the formation of prostaglandin. *Prostaglandin* 21 : 723-728, 1981
 - 17) Oates JA, Fitzgerald GA, Branch RA, Jackson EK, Knapp HR, Roberts LJ. Clinical implications of prostaglandins and thromboxane A₂ formation. *New Engl J Med* 319 : 689-761, 1988
 - 18) Guideline to Automatic Blood Cell Count
 - 19) Chase W. Methods in immunology and immunochemistry. New York and London : *Academic Press Inc.*, 1986
 - 20) Yagi K. Lipid peroxidation in biology and medicine, p223 Academic Press, NY, 1982
 - 21) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911-917, 1959
 - 22) Christie W. Lipid Analysis 2nd ed Oxford : Pergamon Press, 1982
 - 23) Folch J, Lees Mand Sloane-Stanley GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Bio Chem* 226 : 497-509, 1957
 - 24) Morrison WR, Smith LK. Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipids with boronfluoride-methanol. *J Lipid Res* 5 : 600-608, 1964
 - 25) Shomberg G. *Chromatographia* 8 : 517, 1975
 - 26) 이양자, 강승현 송 일, 김혜경, 이기열. 불포화 지방산의 필요성과 안정성에 관한 연구. *한국영양학회지* 12(2) : 99-105, 1979
 - 27) 한용남, 유혜원, 김숙희, 한병훈. 들깨유 섭취가 흰쥐의 출혈 시간, 트롬복산 생성 및 혈소판의 지방산 조성에 미치는 영향. *한국생약학회지* 18(1) : 5-13, 1987
 - 28) Sanders TAB, Roshanai F. The influence of different types of ω -3 polyunsaturated fatty acid on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin Sic* 63 : 91-99, 1983
 - 29) Goodnight SH, Harris WS, Connor WE. The effect of dietary ω -3 fatty acids on platelet composition and function in man : a prospective, controlled study. *Blood* 58 : 880-885, 1981
 - 30) Herald P, Kinsella JE. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease : a comparison of findings from animal and human trials. *Am J Clin Nutr* 43 : 566-598, 1986
 - 31) Kris Etherton PM, Krummel D, Russel ME, et al. The effect of diet on plasma lipids, lipoproteins and coronary heart disease. *J Am Diet Asso* 88 : 1373-1385, 1988
 - 32) Terano T, Hirai A, Hamazak T, Kobayashi S, Fujita T, Tamura Y, Kumagai A. The effect of oral administration of highly purified eicosapentanoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell

불포화 지방산에 따른 흰쥐의 지질 대사 연구

- deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis* 46 : 321-331, 1983
- 33) Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Beslow J. Dietary polyunsaturated fats of the ω -3 series reduce postprandial lipoprotein levels. *J Clin Invest* 82 : 1884-1893, 1988
- 34) Saynor R, Hay CRM, Durber AP. Effect of fish oil on platelet kinetics in patients with ischaemic heart disease. *The Lancet*, June, 1269-1272, 1982
- 35) Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47(5) : 412-426, 1982
- 36) 안병학, 신현경. 한국산 주요 어종의 ω -3 고도 불포화 지방산 함량 비교. 한국식품학회 제36차 학술 발표지, 1986