

碩士學位論文

흰쥐에 있어서 타우린보강이
혈소판 응집성, 적혈구의 나트륨 유출,
체내 지질수준 및 LDL산화에 미치는 영향



濟州大學校 大學院

食品營養學科

朴 仁 仙

2002 年 6 月

흰쥐에 있어서 타우린보강이
혈소판 응집성, 적혈구의 나트륨 유출,
체내 지질수준 및 LDL산화에 미치는 영향

指導教授 姜 晶 淑

朴 仁 仙

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함.

2002 年 6 月

朴仁仙의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長_____印

委 員_____印

委 員_____印

濟州大學校 大學院

2002 年 6 月

Effects of taurine on platelet aggregation,
Na efflux, plasma and liver cholesterol, and
LDL-oxidation in Sprague Dawley Rats.

In-Sun Park

(Supervised by professor Jung-Sook Kang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 6.

목 차

초 록	vi
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	7
1. 실험동물 및 식이배합	7
2. 시료수집	9
3. 시료분석	9
1) 혈소판 응집	
2) Na ⁺ efflux 측정	
(1) 적혈구 용액의 준비	
(2) Na ⁺ -K ⁺ ATPase	
(3) Na ⁺ leak	
3) 혈장지질농도 분석	
4) 간의 콜레스테롤과 중성지방 분석	
5) LDL-Oxidation	
6) 간 조직 검사	
4. 통계처리방법	16

III. 실험결과 및 고찰	17
1. 체중증가량,식이섭취량,식이효율 및 간/체중 비	17
2. 혈소판 응집	20
3. Na ⁺ efflux 측정	22
4. 혈장 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 중성지방	25
5. 간 총콜레스테롤과 중성지방	29
6. LDL-Oxidation	31
7. 간 조직 검사	33
IV. 결론	35
V. 참고문헌	37
Abstract	50

List of tables

Table 1. Composition of experimental diets	8
Table 2. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on growth rate and feed intake in rat	19
Table 3. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the platelet aggregation in rats.....	21
Table 4. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the Na ⁺ efflux in rats.....	24
Table 5. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the serum cholesterol and triglyceride content in rats.....	28
Table 6. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the	



liver cholesterol and triglyceride content in
rats.....30



List of figures

- Figure 1. Analytical scheme of total cholesterol
and triglyceride in the liver 13
- Figure 2. Preparation of low density
lipoprotein (LDL)..... 15
- Figure 3 LDL-Oxidation..... 32
- Figure 4. Microscopic appearance of liver tissue
(×400) 34

초 록

타우린은 대부분의 동물조직에 존재하며 다양한 생리기능을 가진다. 특히, 타우린은 이온수송을 통한 삼투압 조절과 혈소판 응집 그리고 콜레스테롤 대사에 의한 심순환질환의 예방에 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 타우린의 효과에 대해서 많은 *in vitro* 연구가 많이 진행되고 있으나 그 활동 기전에 대해 명백히 밝혀져 있지 않고 결과에 대해서도 논란이 많다. 본 연구에서는 타우린의 급여가 적혈구의 ouabain sensitive Na^+ efflux, 혈장과 간의 콜레스테롤 그리고 혈소판응집에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보고자 대조구, 타우린구, 콜레스테롤구, 타우린+콜레스테롤구로 구성하여 *in vivo* 실험을 수행하였다. 콜레스테롤구에는 0.5% cholesterol과 0.2% cholate가 함유된 식이, 타우린구에는 5% 타우린이 첨가된 식이, 타우린+콜레스테롤식이구는 모두 첨가된 식이를 각 그룹간 10마리로 구성하여 4주간 Sprague Dawley 숫쥐에게 급여하였고 그에 따른 효과를 관찰하였다.

Na^+ efflux는 타우린구에서 감소하였고, 타우린+콜레스테롤구에서는 증가하였으나 유의적 차이는 없었다. 혈장과 간의 총콜레스테롤 수준은 대조구에 비해 콜레스테롤구에서 유의적으로 증가하였고 ($P<0.05$), 타우린+콜레스테롤구에서는 콜레스테롤구에 비해 낮았다 ($P<0.05$). HDL-콜레스테롤의 경우 타우린이 영향을 미치지 못하였다. 콜레스테롤구의 혈장과 간의 중성지방 수준을 보면, 대조구에 비해 혈장 중성지방의 경우 유의적으로 낮았고 간에서는 유의적으로 증가하였다 ($P<0.05$). 타우린구에서는 혈장과 간의 중성지방 수준이 모두 유의적으로 감소하였다 ($P<0.01$). 혈소판 응집은 타우린구에서 낮았다 ($P<0.05$).

간 조직을 현미경으로 관찰했을 때 타우린+콜레스테롤구가 쥐의 지방간 형성을 억제하는 효과를 보였다. 타우린은 Na^+ -pump를 통한 Na^+ efflux를

감소하는 경향을 보였다.

타우린은 혈액과 간의 중성지방과 콜레스테롤의 강하효과를 나타내고 혈소판 응집을 감소시켰다. 이러한 결과들로 미루어 보아 타우린은 관상동맥 심장질환의 예방에 유용할 것으로 생각된다.



I. 서 론

타우린 (2-aminoethanesulfonic acid)은 인간을 비롯한 여러 포유류에 있어 가장 고농도로 존재하는 free amino acid의 하나이다. 타우린은 amino group이 β -carbon에 위치한 β -amino acid로 1827년 Tiedmann과 Gmelin이 황소의 담즙에서 처음 발견하였으며 Demercay에 의해 "Taurine"이란 명칭이 붙여지게 되었다 (Huxtable, 1992).

타우린은 포유류의 거의 모든 생체조직에 함유되어 있는데 체액보다는 조직이나 세포내에 높게 존재하며, 특히 심장, 뇌, 생식기, 골격근에 농축되어 있다. 또한 어느 동물에나 초유에 고농도로 존재하는데 이는 출생과 함께 생체가 활발한 생리적 기능을 유지하기 위해서 타우린이 중요한 역할을 하고 있음을 말해준다. 타우린은 포유동물의 담즙산을 구성하는 성분으로 지방의 소화를 돕고 담즙산 생성을 원활히 함으로서 간 기능을 보조하는 작용을 갖는 정도로 알려져 왔으나, 1980년 후반에 들어 그 생리적 역할이 재조명되고 그에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 최근, 타우린이 동맥경화, 고혈압, 뇌졸중 등의 성인병에 유효하고 과음에 대한 알코올의 독성을 완화시켜 간을 보호하는 기능이 있는 것으로 알려지면서 피로회복, 숙취 및 강장제의 음료에 널리 이용되고 있다. 타우린은 체내 생합성이 가능하지만 식이성 타우린은 스테롤계통 물질의 함량이 비교적 높은 오징어, 굴과 새우 등의 해산물에 고농도로 함유되어 있어서 이러한 식품을 통해 섭취될 수 있다 (Childs et al., 1987). 건강한 상태에서 타우린은 항상 일정량 유지되는데 70 kg의 사람에게 있어서 70 g의 타우린을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 스트레스, 세균에 의한 감염, 수술이나 외상, 방사선 조사, 과음으로 인한 간 조직의 손상 등의 위급시 몸 속의 타우린이 동원되고 이때 뇨로 배설되는 타우린의 대사산물은 2~4배로 증가된다. 건강인에 있어서 생리적 요구량은 1일 200-500 mg정도 되나 질병 상태에선 1,000 mg 이상이 필

요하게 된다 (Huxtable, 1992).

타우린의 결핍과 망막의 기능 부전 (retinal dysfunction) 관계에 대한 연구를 시작으로 타우린에 관한 연구가 급속도로 진행되면서 다양한 생물학적 기능들이 계속적으로 밝혀지고 있다. 현재까지 타우린은 체내에서 막 안정성을 유지하게 하고 (Pasantes -Morales et al., 1985), 담즙산의 구성성분으로 콜레스테롤 농도를 저하시키며 (Murakomi et al., 1996; Park et al., 1998), 여러 종류의 라디칼을 포착하는 항산화제로 작용하는 것으로 (Ogasawara et al., 1996) 알려졌다. 또한 세포 내 칼슘 항상성을 유지시켜 줄뿐만 아니라, 태아와 영유아에 있어서 신경과 시력 발달에 작용하고 (Sturman et al., 1998) 삼투압을 조절하며, 해당작용과 글리코겐 합성을 촉진시키는 등의 역할이 알려져 있다 (Obrosova et al., 1999). 특히 타우린이 지질과산화물 생성을 억제하고, 산화적 손상을 감소시키며 이를 통해서 여러 가지 질병을 예방한다고 할 수 있다 (Kilic et al., 1999).

타우린의 생리적 기전은 크게 metabolic action과 non-metabolic action으로 나누는데 타우린의 항산화적 요소, 합황 아미노산에 대한 해독작용, xenobiotic conjugation 및 bile acid conjugation은 타우린의 metabolic action에 근거를 둔 반면, 세포막의 안정, 전해질의 이동과 삼투압조절, 세포막의 인지질 및 ion channel과의 상호작용은 타우린의 zwitterionic 성질에 의한 non-metabolic action에 근거를 두고 있다 (Lombardi et al., 1998).

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ cotransport 및 passive transport와 함께 세포막의 전해질 이동에 관여하여 세포내·외액의 농도를 조절하는 기전으로서 특히 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase는 고혈압, 당뇨병, 요독증, 관절염, 신장병과 같은 질환의 병리적 부속인자로서 그 활성이 연구의 지표로 이용되고 있다 (Lshizaki et al., 1994; Kiziltunc et al., 1997; Vasarhelyi et al., 1996; Masoom, 1996; Kakimoto et al., 1995). Na^+ -pump라 불리는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase는 세포막에 결합된 단백질로서, 세포막을 통한 Na^+ 와 K^+ 를 능동적으로 운반함으로써 그에 따른 일련의 전해질 이동을 유발시켜 세포용적, 세

포질내 pH, 세포내 전해질의 조성을 생화학적으로 조절하여 적절한 세포내 환경을 유지하게 한다. 특히 신경세포 및 근세포와 같이 전기적 흥분이 유발되는 세포에서 기저상태를 유지하게 하는데 이는 신경이나 근육과 같이 흥분하는 세포에서 Na^+ 와 K^+ 의 농도 기울기를 형성하며, 활동전위가 생성되게 하고 세포 표면을 따라 전달되게 한다. Na^+-K^+ ATPase는 신경세포에서 Na^+ 의 재흡수에 관여함으로써 체액량의 조절에 기여할 뿐만 아니라 소장점막 세포에 위치하여 포도당을 비롯한 영양소의 흡수에 관여한다. 이 효소는 세포질내 ATP를 가수분해하여 세포내의 Na^+ 를 세포외로 농도에 역행하여 이동시키는데 이러한 기전은 cardiac glycoside인 ouabain에 의해 강력히 저해된다 (Pumoulin et al., 1993; Van et al., 1987). 이러한 ouabain sensitive Na^+-K^+ ATPase는 사실상 모든 세포에서 전해질 이동에 관여하며, 특히 적혈구는 쉽게 sample을 채취할 수 있는 장점 때문에 세포막의 전해질 이동에 관한 연구에 이용되고 있다.

콜레스테롤은 포유류에 있어 세포막의 구성성분으로, 세포막의 fluidity에 영향을 주며 세포막에 있어서 콜레스테롤의 과다한 유입은 콜레스테롤과 인지질과의 구성비율을 변화시켜 세포막에 존재하는 ATPase나 channel등 세포막의 integral protein의 생화학적 성질에 영향을 준다 (Gray et al., 1997; Zager, 2000). 세포막의 구성성분에 영향을 줄 수 있는 식이 콜레스테롤과 ω -3 지방산은 Na^+-K^+ ATPase의 활성을 감소시켰고 (Mayol et al., 1999), 타우린은 콜레스테롤로 인해 감소된 Na^+-K^+ ATPase를 복원하고 활성산소에 의해 억제된 활성을 증가시켰다 (Oi et al., 1995).

타우린이 Na^+-K^+ ATPase의 활성을 증가시키는 것은 활성산소로부터 세포막을 안정시키는 효과로 알려져 있으나 Igisu et al. (1976)은 타우린에 의해 증가된 적혈구막의 Na^+-K^+ ATPase의 활성은 타우린의 항산화효과와는 무관하다고 보고한 바가 있다. 한편, hamster sperm cell에 있어서 motility나 fertility와 관련이 있을 Na^+-K^+ ATPase의 활성이 타우린에 의해 감소되는 것으로 나타났다 (Mrsny et al., 1985).

콜레스테롤의 대사과정에서 최종 산물이라 할 수 있는 담즙산은 간에서 cheryl CoA 형태로 합성된 후 장으로 분비되기 직전에 타우린이나 글리신-conjugate 형태의 1차 담즙산을 형성한 후, 대장내의 미생물에 의해서 deconjugate되고 7 α -dehydroxylation을 거치면서 2차 담즙산으로 된다. 장으로 분비된 담즙산의 99%가 재흡수되고 나머지 1%에 해당하는 500 mg/d가 변으로 배설되는데 이는 간에서 새로이 합성되는 담즙산에 상응한다. 콜레스테롤의 상당한 부분이 변을 통해 sterol형태로 배설되고 있으나 콜레스테롤의 분해산물로서 변속의 담즙산은 체 콜레스테롤을 배설하는 가장 주된 길이다 (Guyton, 1983). 타우린이 담즙산을 통해 체 콜레스테롤 감소시키는 효과는 여러 실험에 나타나 있다. Murakami et al. (1998)은 타우린이 cholesterol 7 α -hydroxylase의 활성을 증가시켰고, Yokogoshi et al. (1999)의 연구에서는 식이 타우린이 담즙산의 배설을 촉진시켜 간과 혈중 콜레스테롤을 감소시켰다.

타우린의 심순환기질환의 예방효과는 항동맥경화 및 항혈전과 관련 있는 것으로 알려져 있다 (Murakami et al., 1999; Dawson, 2000). 생체내에서의 혈소판은 외부 자극에 대하여 미세혈관을 폐쇄시키지 않고 손상을 주지 않으면서 출혈을 방지하는 등의 중요한 작용을 한다. 혈소판의 유착과 응집은 외부 자극에 의하여 혈관이 손상을 받았을 때 나타나는 최초의 지혈 반응이다. 또한 혈소판의 다양한 반응은 동맥경화증, 심맥관계 및 뇌혈관 질환과 같은 성인병의 발병과 매우 밀접한 관련이 있다고 널리 알려져 있다. 고콜레스테롤혈증의 뇌졸중 환자에 있어서 과도한 혈소판의 응집성은 일찍 보고된 바 있다 (Lou et al., 1977). Packham et al. (1991)에 의하면 유전적인 고지혈증의 토끼에 있어서 TXA₂에 대한 혈소판 민감성이 약하고 collagen에 의한 혈소판 응집도 감소한 반면, 식이 콜레스테롤에 의한 고콜레스테롤혈증의 토끼에 있어서 혈소판은 TXA₂에 민감한 반응을 보이고 혈소판 응집도 증가했다 (Latta et al., 1994). Winocour et al. (1989)에 의하면 유전적인 고콜레스테롤혈증의 쥐에서 혈소판의 응집성은 증가하나, 혈소판의 생존력

은 감소했다.

혈소판의 응집성에 있어서 타우린의 직접적인 작용에 대해서 알려진 보고는 없다. 심근경색으로 인한 수술환자의 심근에서의 타우린 농도가 증가되었으나 혈소판의 타우린 농도에는 변화가 없었다 (Paasonen et al., 1982). 한편 인슐린 의존형 당뇨병환자에 있어서 혈장과 혈소판의 타우린 농도가 정상인 보다 낮고, 타우린 처방과 동시에 혈소판 응집도가 감소되었다 (Franconi et al., 1995). 사람에게 있어서 400-1600 mg/d의 타우린 급여는 혈소판 응집성에 있어서 30-70%의 감소를 나타냈다 (Hayes et al., 1989). Welles et al. (1993)의 *in vitro* 실험에서 혈소판 응집성에 대한 타우린의 효과는 ADP로 응집이 유도된 경우 응집성이 감소된 반면, collagen에 대한 응집성은 오히려 증가됨을 보였다. 이는 타우린이 ADP에 의한 irreversible aggregation을 억제하는 것으로 해석할 수 있다.

타우린의 항산화 작용에 대해서는 아직 명확하지 않다. Biphasic 형태의 free amino acid로서 타우린은 buffer 능력이 있으나 생화학적으로 불활성이고 생리적 pH 상태에서 대체로 중성이온을 띠고 있는데 그 자체의 free radical 소거 능력에 대해서는 의견이 다르다. 항산화 능력은 hypotaurine 상태에서 가능한 것으로, *in vitro* 실험에서 hypotaurine은 hydroxyl radical이나 hypochlorite (HOCl)과 반응하거나 Fenton reagent와 반응하여 생성된 산화물로서 Cystamine-disulfone을 확인하였다 (Fellman et al., 1987). 그러나 생체내에서 lipid peroxidation에 대한 hypotaurine 항산화 효과는 millimolar 농도에서 가능한 것으로 확인되고 이러한 농도는 남성 성기관이나 재생중의 간 조직에나 가능한 것으로 알려져 있다 (Dupre et al., 1998).

타우린은 항산화 기전에 의한 생리활성 물질로 알려져 있으나 실제로 많은 *in vitro* 실험에서 lipid peroxidation에 대한 항산화 능력에 대해서 긍정적인 효과를 나타내지 못하고 있다 (Tadolni et al., 1995; Nakamura et al., 1993). 세포막에 있어서 타우린의 삼투압 조절작용은 free radical에 의한 세포막의 산화손상에 대한 방어작용에 의한 것이 아니고 세포막에 결합된 인

지질이나 지단백과의 상호작용을 통해 세포막을 안정시켜 다른 이온의 이동에 관여함으로써 이루어진다. 이렇게 타우린은 세포막의 안정화를 통한 다른 이온의 이동에 관여할 뿐만 아니라 그 자체가 하나의 osmolyte으로 작용함으로써 삼투조절작용에 관여한다.

본 연구는 *in vivo* 실험을 통하여 심순환기질환 관련 몇 가지 지표에 있어서 타우린의 효과를 관찰하고 생리활성 물질로서 타우린의 생리적 역할과 작용기전을 보다 구체적으로 규명하기 위하여 실시되었다. 이로서 타우린이 심혈관질환의 예방과 치료차원에서 식이 첨가제 또는 의약품으로서 임상적인 활용 타당성을 가늠할 수 있는 자료를 제공할 수 있기를 기대한다.



II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이배합

생후 4주된 체중 150g 전후의 Sprague Dawley 숫쥐 40마리를 대조식이구, 타우린식이구, 콜레스테롤식이구 그리고 타우린+콜레스테롤식이구의 4 비교군에 각 10마리씩 나누어 구성하였다. Stainless steel cage에서 4주간 분리·사육하였으며, 동물 사육실의 명암주기는 12시간, 온도 (20~25℃)와 습도 (40~60%)는 일정하게 유지되도록 조절하였다. 실험 기간 동안 물과 식이는 무제한으로 공급되었다.

기본 실험식은 AIN-76 (A.I.N., 1977)을 참고로 하여 <Table 1>과 같이 제조되었다. 탄수화물 급원으로는 sucrose와 corn starch를, 단백질 급원으로는 casein을, 지방 급원으로는 lard (9%)와 soybean oil (1%)을 사용하였다. 타우린 식이는 5% taurine을 첨가하였고, 콜레스테롤 식이는 0.5% cholesterol과 0.2% cholate를 첨가하고, 타우린+콜레스테롤 식이는 각 물질을 함께 보강해 조제하였다. 각 타우린과 콜레스테롤의 함량에 따른 차이는 corn starch에서 보정해 주었다. taurine은 동아시약 (서울)에서 제공을 받았다.

식이 섭취량은 전날 채워둔 식이통의 무게에서 남은 식이의 무게를 뺀 값으로 계산되었고, 체중은 식이 섭취로 인한 일시적인 체중 변화를 막기 위하여 측정하기 1시간 전에 식이를 제거한 후 이틀마다 측정되었다. 식이 공급과 체중 측정은 매번 같은 시각에 이루어졌다. 식이 효율 (FER, Food Efficiency Ratio)은 전 실험기간에 대해서 계산되었다.

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Control	Taurine	Cholseterol	Taurine Cholesterol
Casein ^{a)}	20.0	20.0	20.0	20.0
L-methionine ^{b)}	0.3	0.3	0.3	0.3
Lard ^{c)}	9.0	9.0	9.0	9.0
Soybean Oil ^{d)}	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride ^{a)}	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamin mix ^{e)}	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mix ^{f)}	3.5	3.5	3.5	3.5
Sucrose ^{d)}	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn starch ^{g)}	45.0	40.0	44.3	39.3
Taurine ^{h)}	-	5.0	-	5.0
Cholesterol ^{a)}	-	-	0.5	0.5
Cholic acid ^{a)}	-	-	0.2	0.2
Total (%)	100.0	100.0	100.0	100.0

^{a)} United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio

^{b)} Junsei Chemical Co., Ltd.

^{c)} Samlip Yugi Co.

^{d)} Jeil Jedang Co.

^{e)} Vitamin mixture(mg/100g) :Thiamine HCl 60.0, Riboflavin 60.0, Pyridoxine HCl 70.0, Nicotinic Acid 300.0, D-Calcium Pantothenate 160.0, Folic Acid 20.0, D-Biotin 2.0, Vit. B₁₂ 0.1, Vit. A 80.0, Vit. E 2000.0, Vit. D₃ 0.25, Vit. K 0.5, Sucrose 97290.0

^{f)} Mineral mixtuer(g/100g) : CaHPO₄ 50.0, NaCl 7.4, K₃C₆H₅O₇ · H₂O 22.0, K₂SO₄ 5.2, MgO 2.4, Manganous carbonate(43-48%Mn) 0.35, Ferric citrate(16.7%Fe) 0.6, Zinc carbonate(70% Zn) 0.16, Cupric carbonate(53-55%Cu) 0.03, KIO₃ 0.001, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.001, CrK(SO₄)₂ · 12H₂O 0.055, Sucrose 11.804

^{g)} Sunil Pododang Co.

^{h)} Dong-a Pharmaceutical Co., Ltd.

2. 시료수집

4 주간의 실험기간 종료 전에 16 시간을 절식시키고 ether로 마취시킨 후, cardiac puncture로 헤파린이 들어 있는 vacutainer에 혈액을 채취하였다. 혈소판 응집과 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase의 측정은 채혈 즉시 전혈로 실시되었고, 나머지 혈액을 $1000 \times g$ 에서 15분간 원심 분리한 혈장을 분리하였으며, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방 분석을 위해 -20°C 냉동고에 보관하였다.

간은 바로 적출하여 거름종이로 표면의 혈액을 제거한 후, 무게를 측정하였다. 간 조직의 일부는 조직검사를 위해 10% 포르말린용액에 고정시켜 놓고, 남은 간은 콜레스테롤과 중성지방 분석을 위해 -20°C 냉동고에 보관하였다.

3. 시료분석

1) 혈소판 응집 (Whole blood platelet aggregation)

혈소판응집은 전혈을 이용한 impedance 방법으로 Chronolog Platelet Aggregometer (Chrono-Log 500-CA, Havertown, USA)를 이용하여 측정되었다. *in vivo* 실험에서는 채혈 즉시 전혈 500 μl 를 등장액 (isotonic saline)으로 희석시켜 (1:1) 혈소판 농도 400,000/ μl 로 조정된 후, 20 μl 의 2 mM ADP (adenosine diphosphate)로 응집을 유도하였으며, 3회 반복한 평균치를 사용하였다.

타우린과 콜레스테롤의 *in vitro* test에서는 stock (8주령된 SD쥐)쥐로부터 전혈을 채취한 후, 5 mM 타우린, 2 mM cholesterol emulsion 그리고 5 mM 타우린 · 2 mM cholesterol emulsion을 첨가하여 37°C 에서 10분간 배양한 후, *in vivo* 실험과 같은 방법으로 진행하여 타우린이나 콜레스테롤을 처리하지 않은 대조군과 비교하였다.

Whole blood platelet aggregation은 응집의 진행에 따라 혈액에 삽입된 두개의 platinum electrodes 사이에 나타나는 impedance의 상승을 측정하는 방법으로, recorder response를 20 Ω 이 되게 impedance gain을 맞추어 둔 것

이다. 이 방법은 신선한 전혈을 사용하여 혈액내 다른 성분의 존재 하에서 측정하므로, 보다 생리적인 상태에서 혈소판 응집성을 관찰하는 장점이 있다.

2) Na⁺ efflux 측정

(1) 적혈구 용액의 준비

혈액 4 ml를 1000×g에서 10분간 원심 분리한 후 plasma와 buffy coat를 걷어내고 적혈구를 cold isotonic washing solution [150 mM choline chloride, 10 mM Tris-4-morpholinopropane sulfonic acid (MOPS) 4°C pH 7.4]으로 5번 씻어준다. 적혈구를 다시 washing solution으로 희석하여 hematocrit 40-50%의 적혈구 용액이 되게 조정한 후 hematocrit을 측정한다. 적혈구 용액 50 μl를 5 ml의 0.02% acationox (metal free detergent, Scientific Product, USA) 넣은 것으로 intracellular Na⁺을 측정했다.

(2) Na⁺-K⁺ ATPase (Ouabain-sensitive Na⁺ efflux)

적혈구용액 각 2 ml에 20 ml medium 1 (70 mM MgCl₂, 10 mM KCl₂, 85 mM sucrose, 10 mM glucose, 10 mM Tris-MOPS 37°C pH 7.4) 과 20 ml medium 2 (medium 1 plus 1 mM ouabain)에 각각 넣어 섞은 후, 10개의 test tube에 고르게 분배했다. 각 2 tube 씩 37°C shaking water bath에서 0, 2, 4, 6, 8분 간격으로 배양한 즉시 얼음 속으로 옮겨 Na⁺ efflux를 중단시킨 후, 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액의 Na⁺ 농도를 atomic absorption spectrophotometer (AA6701F SHIMADZU Corporation, Japan)을 이용하여 측정하였고 기울기 (Na μg/ml/min)를 구한 후, 두 medium 간 기울기 값의 차이로부터 아래와 같이 Na⁺-K⁺ ATPase를 구하였다.

(3) Na⁺-leak (Na⁺ passive efflux)

Na⁺ leak은 Na⁺-K⁺ ATPase 과 Na⁺-K⁺ cotransport을 통해 나타나는 Na⁺ efflux를 차단하기 위해 ouabain과 furosemide를 함유한 medium 3으로 흘러나온 Na⁺을 말한다.

적혈구용액 1 ml를 20 ml의 medium 3 (150 mM choline chloride, 10 mM glucose, 1 mM ouabain, 1 mM furosemide, 10 mM Tris-MOPS 37°C pH 7.4)에 넣어 섞은 후 10개의 test tube에 고르게 분배하여 0, 10, 20, 30, 40 분 간격으로 배양한 다음 위와 같은 방법으로 Na⁺ 농도를 측정하며, 아래 계산식으로 구하여 이에 대한 기울기 값으로부터 Na⁺ leak을 구하였다. (Smith et al., 1984a : 1984b)

계산식:

$$\frac{[\text{Na } \mu\text{l/ml}]}{[\text{min}]} \frac{[60\text{min}]}{[\text{hr}]} \frac{[\mu\text{mole}]}{[23\mu\text{g}]} \frac{[31.5-(1.5 \times \text{HCT})]}{[1.5 \times \text{HCT}]} = \text{Na } \mu\text{mole/mlrbc/hr} \quad (\text{Na mmole}/\ell \text{ rbc/hr})$$

Intracellular Na⁺:

$$\frac{[\text{Na } \mu\text{l}]}{[\text{ml}]} \frac{[\mu\text{mole}]}{[23\mu\text{g}]} \frac{[101]}{[\text{HCT}]} = \text{Na mmole}/\ell \text{ rbc} \quad (\text{Na } \mu\text{mole/mlrbc})$$

3) 혈장지질농도 분석

총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 그리고 중성지방의 성분분석에는 commercial assay kit (ASAN Pharmaceutical Co., Ltd, Korea)를 사용하였다. 총콜레스테롤과 중성지방 분석에는 혈장 20 μl을 사용하였고, HDL-콜레스테롤의 분석에는 200 μl을 사용하여 두 반복으로 진행하였다. 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤은 500 nm에서, 중성지방은 550 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 분석을 통해 얻은 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤과 중성지방의 수치를 이용하여 계산 [LDL-cholesterol=T-cholesterol-(HDL-cholesterol+TG/5)] 되었다. Atherogenic index는 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤 수치를 이용하여 계산 [T-cholesterol - HDL-cholesterol]/HDL-cholesterol] 되었다.

4) 간의 콜레스테롤과 중성지방 분석

간의 콜레스테롤과 중성지방의 분석은 Folch et al. (1957)의 방법을 다소 수정하여 수행되었다. 간 조직 1 g을 6 ml chloroform / methanol mixture (2/1, v/v)과 2 ml 증류수를 넣고 조직균질기 (tissue homogenizer)로 5분간 균질화 하여, 1000 × g에서 10분간 원심분리한 후, 콜레스테롤과 중성지방을 함유하고 있는 하층액인 chloroform층을 분석에 이용하였다.

간 콜레스테롤 측정을 위해서 하층액 500 μ l을 취하여 질소가스로 건조한 후 50 μ l Triton X-100 / chloroform solution (1/1, v/v)을 첨가하여 vortex하였다. 이를 450 μ l chloroform으로 희석하여 총 500 μ l가 되게 한 후, 다시 vortex하였다. 새 tube에 10 μ l을 취하여 질소가스로 건조하고, Color reagent 1.5 ml를 넣어 37°C water bath에서 5분 간 배양 한 후, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig 1).

간 중성지방 측정을 위해서 하층액 10 μ l를 질소 가스로 건조하고, 50 μ l 메탄올을 넣고 용해시킨 후 vortex하였다. 여기에 Color reagent 1.5 ml를 넣고 37°C water bath에서 15분간 배양하여 발색시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 측정은 두 반복으로 실시되었다 (Fig 1).

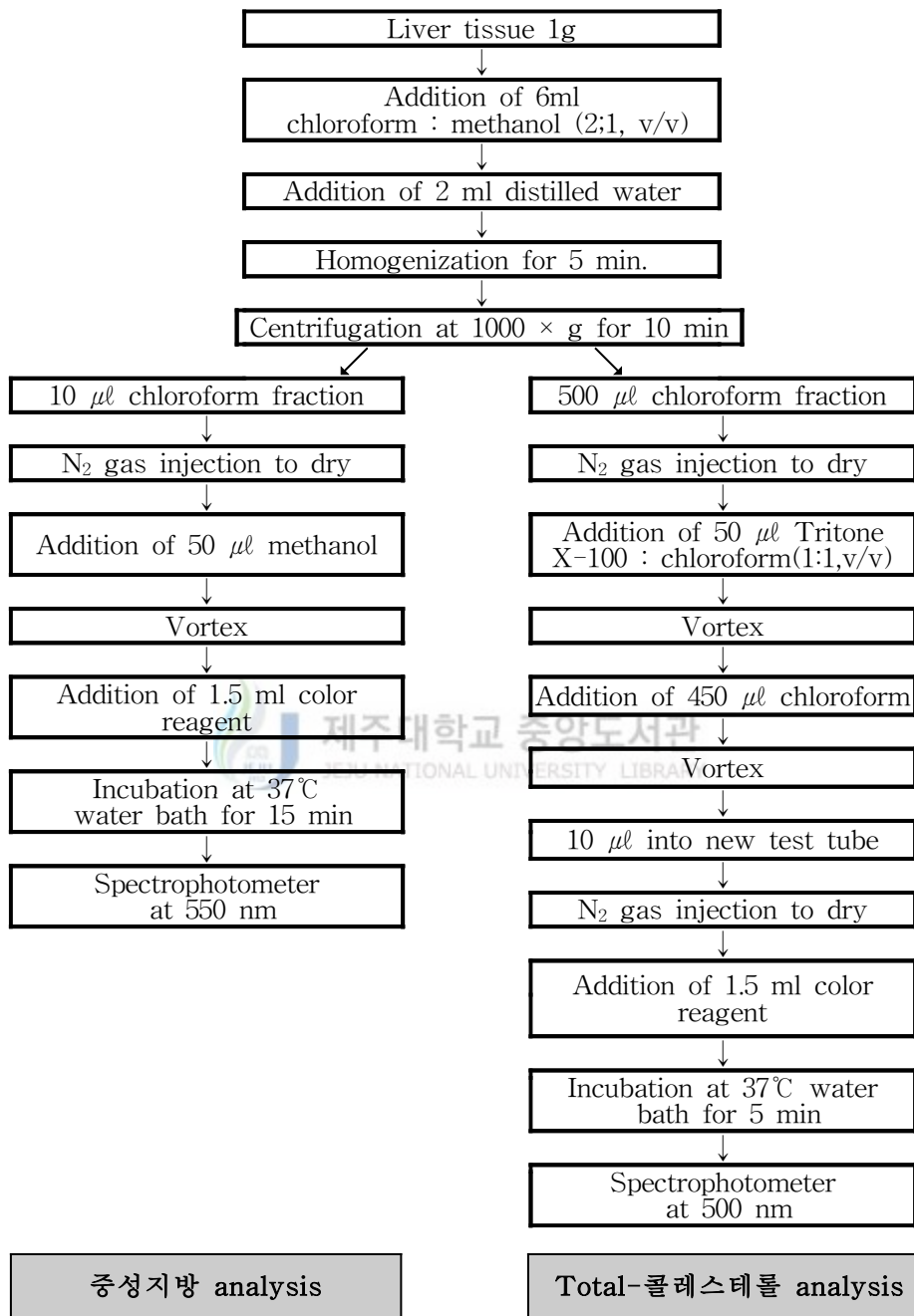


Figure 1. Analytical scheme of total cholesterol and triglyceride in the liver

5) LDL Oxidation 측정

(1) LDL의 분리

LDL은 <figure 2>와 같이 사람의 혈장을 sequential discontinuous density gradient의 초원심분리 과정을 반복하여 되었다 (Fisher, 1983; Basu et al., 1976). 우선, NaCl로 사람의 혈장 밀도를 1.063 g/ml로 조정한 후 원심분리 (150,000×g, 4℃, 20시간)하여 plasma chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL)과 LDL fraction을 HDL과 lipoprotein deficient serum (LDS) fraction에서 분리하였다. 그리고 LDL이 섞여있는 fraction은 밀도를 1.019 g/ml로 조정하여 원심분리 (150,000×g, 4℃, 20시간)한 후에 상층부분의 chylomicron/VLDL fraction을 제거하였다. 나머지 하층부분은 다시 NaCl로 밀도를 1.063 g/ml로 조정하고 같은 방법으로 원심분리하여 LDL fraction을 순수 분리하였다. 분리된 LDL은 4℃에서 0.154M NaCl, 0.01% EDTA buffer (pH 7.4)로 24시간 투석하였다.

(2) LDL의 산화

LDL (0.15 mg/ml)과 CuSO₄ (5 μM)의 전체부피가 500 μl가 되도록 F/10배지 (pH 7.4)를 섞어 5% CO₂ incubator에서 37℃로 24시간 배양하였으며 배양이 끝난후 (40 mM, 25 μl) EDTA로 CuSO₄의 산화를 억제한다.

(3) Agarose gel electrophoresis

타우린 (5 mM) 및 콜레스테롤 (2 mM)이 LDL 산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 agarose gel electrophoresis를 실시하였다. 0.7% agarose gel 을 사용하여 이동도를 관찰하였다. 시료용액과 산화 LDL을 배양하여 20 μl 를 주입하였고 135 mV의 전력으로 pH 8.6, 0.05 M barbital buffer를 사용하여 전개시켰다.

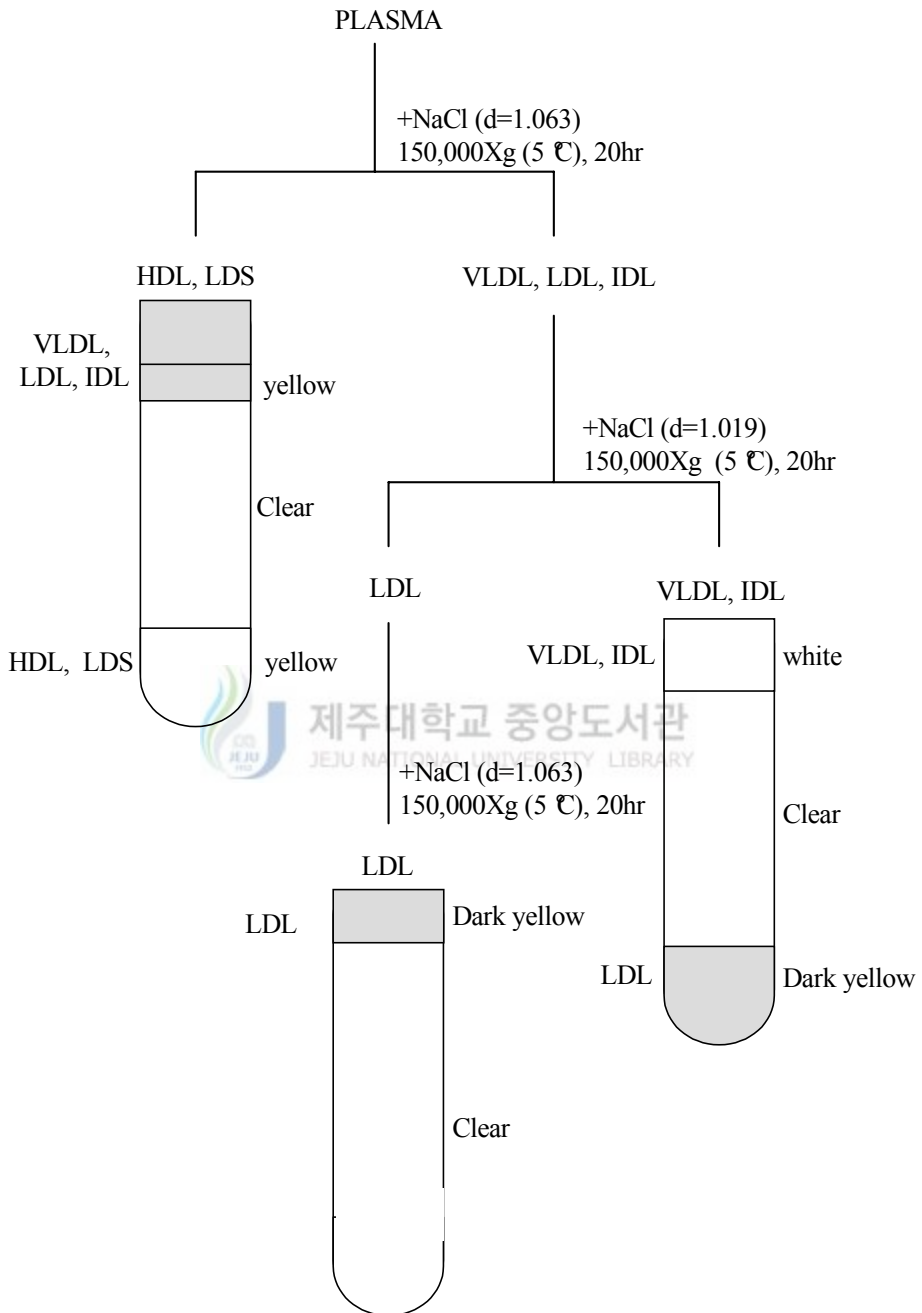


Figure 2. Preparation of low density lipoprotein (LDL)

6) 간 조직 검사

각 군마다 3 sample을 채취하여 각 2회 관찰하였다. 전처리 과정으로 간 제거 즉시 신선한 상태를 유지하고 조직의 손상을 최소화하기 위해 3 g 정도를 10% formalin 용액에 48시간 동안 1차 고정을 하고, 다시 세포 손상을 최소로 하여 2-3 mm 정도의 두께로 잘라서 capsule에 넣고 10% formalin 용액에서 2차 고정을 시켰다. 2차 고정이 끝나면, 흐르는 물에 2시간 이상 세척한 후 탈수과정을 진행시키는데, 이 과정에서는 알콜 농도가 70% → 80% → 90% → 95% → 100% → 100% → 100% → xylene → xylene 의 단계적 과정을 통해 총 18시간의 탈수과정을 거치며, 그 후 paraffin으로 조직의 형태를 고정시켰다. 형태가 고정된 조직을 두께 4 μ m로 절단하여 hematoxylin-eosin 염색을 한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 통계처리방법

본 실험의 측정치는 평균과 표준편차로 표시되었고, 실험 결과들은 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였으며, 5% 수준에서 유의차가 있을 때 Duncan multiple range test에 의해 각 처리구 간의 유의차를 검증하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율 및 간/체중 비

실험 동물의 평균 일일 증체량 (ADG), 평균 일일 식이 섭취량 (ADFI), 식이 효율 (feed efficiency ratio) 및 간/체중 비 (L.W/B.W ratio)는 <Table 2>에 제시되었다.

최종 체중은 360.88~399.57 g으로 모든 처리구에서 유의적 차이는 없었으나 타우린 식이구에서 다소 적은 경향을 볼 수 있었다. 평균 일일 증체량의 경우 타우린식이구가 대조구와 타우린+콜레스테롤구에 비해서 유의적으로 낮은 수치를 보이며 ($P<0.05$), 다른군 간에 차이는 나타나지 않았다. 평균 일일 섭취량의 경우는 콜레스테롤구가 타우린+콜레스테롤구에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보였다 ($P<0.05$). 식이효율은 대조구와 콜레스테롤구가 가장 높은 수치를 나타내었고 타우린+콜레스테롤구 다소 낮은 경향을 보였으며, 타우린구에서는 유의적인 차이를 볼 수 있었다 ($P<0.01$). 체중에 대한 간의 무게 비는 무콜레스테롤 식이구에 비해 콜레스테롤 식이구에서 유의적으로 낮은 것을 볼 수 있었다 ($P<0.01$). Gandhi et al. (1992)의 연구에서는 hypercholesterolemia 상태에서 증체량의 경우 유의적 차이는 없었으나 고콜레스테롤 상태에서 다소 적은 경향을 보였고, 식이효율의 경우도 유의적인 차이가 없었다. Marlett et al. (1990)과 Cho et al. (1989)은 콜레스테롤 식이를 급여한 Sprague Dawley 암·숫쥐에서 간 무게가 증가함을 보고하였고, 유사하게 Moundras et al. (1997)도 식이에 콜레스테롤을 0.3% 첨가한 결과 간 무게가 29% 정도 증가됐다고 하였다.

한편 고콜레스테롤에 타우린을 여러 농도 (0.25, 0.5, 10, 20, 30, 40, 50g taurine/kg)로 섭취한 경우 체중의 변화는 보이지 않았고, 간 무게에 있어서는 대조구에 비해 콜레스테롤을 섭취한 구에서 모두 유의적으로 높은 수치

를 보였다 ($P < 0.05$) (Yokogoshi et al. 1999). 콜레스테롤을 섭취시킨 구에서 간의 크기가 유의적으로 높았고, 타우린의 보충이 있는 상황에서도 간의 무게는 대조구에 비해 높았다 (Yokogoshi et al. 1999). 당뇨병을 유도시킨 쥐의 경우, 타우린의 보충에 따라 체중의 변화는 나타나지 않았다 (Nakaya et al. 2000). 이와 같은 결과를 보면 타우린은 일일증체량, 일일식이섭취량 등에 대해서 각 요인에 따라 다소 차이를 볼 수 있으나 크게 영향을 미치지 않는다고 사려된다. Kerai et al. (1999)의 연구에서 보면 알콜과 타우린의 섭취가 간의 무게에 영향을 주었다. 알콜의 섭취가 간/체중의 비를 유의적으로 높여주는 것을 볼 수 있다. 즉 간에 손상이 있을 때 간이 비대해지는 결과를 볼 수 있다. 이와 같이 간 무게의 경우에는 콜레스테롤식이에 의해 중성지방의 축적에 따라 비대해지고 간 비대에 대한 타우린의 효과는 볼 수 없었다.



Table 2. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on growth rate and feed intake in rats

	Control	Taurine	Cholesterol	Taur+chol
Initial B.W(g)	154.73±13.38	154.76±12.90	154.76±13.42	154.74±13.67
Fanal B.W(g)	399.46±36.49	360.88±20.71	379.43±34.58	399.57±32.65
ADG(g/d) ¹⁾ *	8.16± 1.08 ^a	6.56± 1.20 ^b	7.49± 0.98 ^{ab}	8.16± 1.08 ^a
ADFI(g/d) ²⁾ *	22.07± 1.90 ^{ab}	21.08± 1.84 ^{ab}	20.42± 2.15 ^b	23.17± 2.31 ^a
F.E.R ³⁾ **	0.37± 0.03 ^a	0.31± 0.04 ^b	0.37± 0.03 ^a	0.35± 0.03 ^{ab}
L.W/B.W ⁴⁾ (%)**	2.87± 0.19 ^b	2.91± 0.58 ^b	5.12± 0.33 ^a	4.74± 0.39 ^a

1) ADG : Average daily gain

2) ADFI : Average daily feed intake

3) F.E.R : Feed Efficiency Ratio

4) L.W/B.W : Liver weight to final body weight ratio

Values are means ± SD of 10 rats.

** : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.01)

* : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.05)

2. 혈소판 응집

혈소판 응집에 대한 결과는 <Table 3>에 제시되었다. 혈소판 응집을 보면, maximum aggregation에서 대조구에 비해 타우린구가 유의적으로 낮았고 ($P < 0.01$), initial slope에서도 타우린구가 유의적으로 낮았다 ($P < 0.05$). 콜레스테롤을 섭취시킨 경우에도 maximum aggregation과 initial slope이 콜레스테롤구에 비해 타우린+콜레스테롤구에서 감소하였으나 유의적 차이는 없었다. *in vitro* 실험의 경우에서도 유사한 결과를 볼 수 있었으나 유의차는 보이지 않았다. 이와 관련해 타우린과 혈소판 응집에 관련된 연구를 보면, 인슐린 의존형 당뇨병 환자의 경우 혈장과 혈소판의 타우린 농도가 정상인 보다 적고 항혈소판 응집력 또한 낮은 수치로 보고되고 있다. 이 환자에게 타우린 식이 (1.5 g/d)를 90일 동안 보충시키면 타우린의 농도와 혈소판 응집력이 정상인과 같은 수치로 나타났다고 한다 (Franconi et al., 1995).

그리고 부종, 단백뇨, 고혈압을 동반한 임신중독증 환자의 경우에서도 타우린 투여는 혈소판의 응집력을 감소하였는데, 이것은 타우린의 hypercoagulative의 예방하는 효과와 관련이 있다 (Namba et al., 1992). 또한 타우린을 고갈시킨 고양이에 있어서 타우린 보충시 혈소판 응집력이 2배의 감소를 시켰으며, 정상상태의 사람에게 1일 타우린 400 mg, 1600 mg을 각각 보충하였을 때는 혈소판 응집이 30~70% 감소되었다 (Hayes et al., 1989). 쥐의 경우, 타우린의 섭취가 혈소판 응집 감소와 혈전형성을 억제한다 (Huang et al., 1995). 따라서 타우린의 농도는 혈소판 응집력과 높은 관계를 가지고 있다고 할 수 있다 (Hayes et al., 1989; Franconi et al., 1995).

Table 3. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the platelet aggregation in rats.

	Control	Taurine	Cholesterol	Taur+chol
In vivo				
Maximum(Ω) ^{1)**}	19.46±3.20 ^a	14.36±1.85 ^b	17.13±3.72 ^{ab}	14.20±3.06 ^b
Initial Slope(Ω /min) ^{2)*}	17.43±2.13 ^a	13.04±2.93 ^b	14.11±3.37 ^{ab}	12.96±2.59 ^b
In vitro				
Maximum(Ω)	15.05±2.25	13.37±2.88	16.19±4.13	13.09±1.51
Initial Slope(Ω /min)	13.44±1.53	11.05±1.81	12.62±3.14	10.66±1.51

1) Maximum aggregation in ohm at the point where aggregation dissociated.

2) Initial slope is the base of one minute in tangent drawn to steepest part of curve.

Values are means ± SD of 10 rats.

** : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.01)

* : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.05)

3. Na⁺ efflux

적혈구막의 Na⁺ efflux는 Na⁺-K⁺ ATPase와 Na⁺-K⁺ cotransport 그리고 Na⁺ leak 등 3가지 형태로 이루어진다. 본 연구에서는 타우린과 콜레스테롤이 적혈구막의 Ouabain sensitive한 Na⁺-K⁺ ATPase와 passive Na⁺ permeability를 나타내는 Na⁺ leak을 보았고 결과는 <table 4>에 제시하였다. Na⁺-K⁺ ATPase의 경우 타우린구는 대조구에 비해서 다소 낮은 활성을 보였으나 유의차는 없었다. 콜레스테롤의 경우도 대조구에 비해 활성이 매우 낮은 것을 볼 수 있다. Na⁺ leak와 intracellular Na⁺의 경우는 모든 처리구간에서 유의적 차이가 나타나지 않았다. Na⁺-K⁺ ATPase는 콜레스테롤과 관련하여 free radical의 작용과 lipid peroxidation으로 이 효소의 활성이 억제된다는 결과가 보고되어 있지만, 항산화 기능을 갖는 타우린의 첨가로 인해 이 효소의 활성이 증가됨을 보고하였다 (BiLiFu et al., 1995). 한편 Mrsny et al. (1985)의 연구를 보면 타우린의 보충이 hamster sperm에서 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성을 억제한다는 보고도 있다. 담즙분비가 정지된 cholestasis쥐의 경우, 콜레스테롤에 의해 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성이 억제되었다 (Reichen et al., 1979). Na⁺-K⁺ ATPase를 콜레스테롤 관점에서 보면 혈장의 중성지방, 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤은 Na⁺-K⁺ ATPase과 부의 상관관계를 나타내고 HDL-콜레스테롤의 수치는 정의 상관관계를 나타낸다 (Lu et al., 1999). 당뇨병환자에게서 Na⁺-K⁺ ATPase의 활성이 감소되는데 이는 콜레스테롤과 관해서 lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)에 감소에 의한 결과라고 말하고 있다 (Kiziltunc et al., 1997). 높은 콜레스테롤의 섭취는 과산화물질이 상승이 되고 이에 따라 Na⁺-K⁺ ATPase의 활동을 억제한다고 보고하였다 (Uysal, 1986; Yeagle, 1983). 고혈압과 관련해 Na⁺ efflux를 조사한 연구에서는 고혈압에 따라 Na⁺ efflux는 유의적으로 다르지는 않았으나, intracellular Na⁺와 passive Na⁺ permeability의 경우 각각 9.1%씩 증가하였고, Na⁺-K⁺ ATPase는 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 즉 고혈압의 경우 Na⁺ transport에 변형이 있을 때, 심장질환의

위험성이 높은 것으로 신체질량지수가 높고 혈중노산의 증가와 함께 HDL-콜레스테롤의 저하를 나타낸다고 보고하였다 (Caballero et al., 1995; Yap et al., 1989). 일반 남성을 대상으로 Na^+ transport와 혈장지질의 관계를 보면 passive Na^+ permeability는 혈장 중성지방과 관련이 있는 반면, 콜레스테롤과는 무관한 것으로 보고되었다 (Garay et al., 1990). 유구적혈구증의 경우 Na^+ transport에 변화가 일어나는데 세포막 지질의 성분, 특히 phosphatidylcholine에 따라 passive Na^+ permeability가 증가한다고 보고되었다 (Wiley et al., 1975).

결론적으로 본 연구에서 타우린이나 콜레스테롤이 Na^+ efflux에 유의적 차이를 나타내지 않았으나, 영양 병리적 측면에서 적혈구막에서 나타나는 Na^+ efflux의 변화는 타우린이 세포막의 중성지방, 콜레스테롤 또는 인지질의 구성에 영향을 줌으로서 나타날 수 있는데, 세포막의 cation 이동에 있어서 타우린의 생리적 기전에 대해 보다 많은 연구가 필요하다고 사려된다.



Table 4. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the Na efflux in rats.

	Control	Taurine	Cholesterol	Taur+chol
Intracellular Na ¹⁾	6.00±1.87	5.58±1.96	5.53±1.16	7.03±2.52
Na Efflux				
Na ⁺ -K ⁺ ATPase ²⁾	2.91±0.64	2.12±0.73	2.33±0.89	2.70±0.62
Na Leak ³⁾	3.06±0.81	2.29±0.67	2.67±0.80	2.80±0.49

Values are means ± SD of 10 rats.

- 1) Intracellular Na ; upper values are for intact red blood cells. (Na mmole/l rbc)
- 2) Na⁺-K⁺ ATPase is ouabain sensitive Na efflux through Na-pump. (Na μ mole/ml rbc / hr)
- 3) Na leak is Na efflux through passive sodium channel in intact red blood cells.

4. 혈장의 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 중성지방 및 Atherogenic index

혈장의 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 중성지방 및 atherogenic index 등에 수치를 <Table 5>에 제시하였다. 5%의 타우린이 함유된 식이를 섭취시킨 타우린구의 혈장 총콜레스테롤은 대조구에 비해 낮은 경향은 있었으나 유의차는 나타나지 않았다. 그러나 0.5%의 cholesterol + 0.2% cholate을 포함한 콜레스테롤구에 타우린을 보강시킨 타우린+콜레스테롤구에서는 콜레스테롤구에 비해 총콜레스테롤 수치를 24% 정도 감소시켰다 ($P < 0.01$). 총콜레스테롤 수치를 대조구와 콜레스테롤구의 측면에서 볼 때 대조구에 비해 콜레스테롤구에서 2배 이상의 높은 총콜레스테롤 수치를 나타내는 것을 볼 수 있는데, 이와 같이 식이 콜레스테롤이 체콜레스테롤 수준에 반영된 것은 이미 여러 연구에 나타나 있다 (Kelley et al. 1978; Nishina et al. 1990; Topping et al. 1993). 대조군 식이와 콜레스테롤을 첨가한 식이군에 있어서 타우린의 보충이 HDL-콜레스테롤에 영향을 미치지 않았으나, 콜레스테롤이 첨가된, 콜레스테롤구 및 타우린+콜레스테롤구에서는 HDL-콜레스테롤이 유의적으로 감소했다 ($P < 0.01$). LDL-콜레스테롤에 있어서 대조구와 타우린구를 비교할 때 차이가 없었으나 콜레스테롤을 첨가한 경우, 타우린+콜레스테롤구에 비해 유의적으로 감소한 것을 알 수 있다 ($P < 0.01$). 콜레스테롤 섭취가 단지 총콜레스테롤의 수치만을 높이는 것 뿐만 아니라 동맥경화의 위험성과 높은 관련이 있다고 알려진 혈장 LDL-콜레스테롤의 수치를 높이고 HDL-콜레스테롤의 수치를 낮춤으로서 동맥경화증의 예견지표로 사용되는 atherogenic index (ohba et al. 1985)를 심하게 증가시킨 반면, 콜레스테롤구에 비해 타우린+콜레스테롤구의 atherogenic index가 유의적으로 감소됨을 볼 수 있다 ($P < 0.01$). 혈장 중성지방 수준을 대조구와 비교할 때, 타우린구에서 44%나 감소시켰고 ($P < 0.01$), 콜레스테롤구와 타우린+콜레스테롤구를 비교할 때 타우린 보충이 혈장 중성지방을 상당히 낮추었다. Gandhi et al. (1992)의 연구에서 고지혈증을 유도시킨 흰쥐에서 타우

린을 1~2% 첨가했을 때 혈중 중성지방 농도를 19% 감소시켰고, Park et al. (1997) 연구에서는 혈중 중성지방의 농도가 정상인 상태에서 타우린의 보충으로 53% 감소시키는 등 타우린이 혈중 중성지방 저하효과를 나타내는 것을 볼 수 있다.

혈장 중성지방에 있어서 콜레스테롤 첨가 효과를 비교해 볼 때, 대조구에 비해 콜레스테롤구와 타우린+콜레스테롤구에서는 혈중 중성지방의 수치를 각 46%, 57% ($P < 0.01$)로 감소하는 경향을 볼 수 있었는데 이는 <Table 6>에서 보는 것과 같이 간에 중성지방의 축적이 증가하게 되고, 그에 따라 혈중 중성지방의 농도가 감소한 것으로 볼 수 있다. Kushwaha et al. (1978)의 연구에서 콜레스테롤의 보충이 총콜레스테롤의 수치를 100% 증가시킨 반면 중성지방은 44% 감소한 결과를 나타냈다. 고콜레스테롤 식이로 인한 간의 콜레스테롤 대사에 이상이 생기면, 간에서 합성된 중성지방이 분비되지 않고 간에 있어서 중성지방의 축적과 함께 혈중 중성지방 수준을 급격히 낮추는 경향을 나타낸다 (Liu et al. 1995).

타우린은 고지방 또는 고콜레스테롤 식이에서 혈장콜레스테롤을 감소시키는 영향을 미친다는 것은 선행연구에서 많이 밝혀졌다 (Murakami et al. 2000). 특히, 타우린은 변으로 담즙산의 분비를 증가시켜서 나이에 따라 증가되는 혈중 콜레스테롤을 낮추는데 보다 효과적이다 (Kishida et al. 2001). Liu (2000)의 역학조사에서 보면, 관상심장질환이 적은 지중해지역에서 타우린수준이 높았고, 심장병에 의한 사망율이 가장 낮은 일본여성이 타우린의 혈장 농도가 가장 높은 수치를 나타내었다고 한다. 즉 타우린은 심순환 질환의 예방인자임은 분명하다고 여겨진다. 타우린을 장기간 섭취했을 때 동맥지질의 퇴적을 낮출 뿐 아니라 (Murakami et al. 2000), 식이로 유도된 고콜레스테롤혈증의 쥐에 있어서 타우린의 섭취는 HDL-콜레스테롤을 유의적으로 높였다 (Mochizuki et al. 2001). 당뇨병에 관해서도 타우린은 인슐린의 저항을 개선시키고 지방의 축적을 유의적으로 낮춘다고 보고하고 있다 (Nakaya, 2000). 반면 Kondo et al. (2000) (2001)의 연구에서는 아포단백질 E-결핍 마우스에게 2% 타우린을 보충시, 혈장 HDL-콜레스테롤의 변화는

없이 LDL-콜레스테롤과 VLDL-콜레스테롤을 유의적으로 높였다고 보고되었다. 그러나 이 연구에서 타우린은 TBARS의 수치를 26% 낮추어 줌으로써 항산화를 통해 동맥경화 진행단계를 억제한다는 결론을 짓는다 (Murakami et al. 1999b). 고혈압에 민감한 쥐에게 고콜레스테롤 식이 섭취 후 타우린 3% 를 50일 보충하였을 때, 이로 인해 유도되는 혈장, 간, 동맥과 소장에서 콜레스테롤의 수치가 증가되는 것을 방지할 수 있다고 한다. 타우린의 hypocholesterolemic 효과는 담즙산 합성에 관여하는 7 α -hydroxylase 효소의 활성화에 영향을 줌으로서 담즙산의 생성을 촉진하며, 소장에서 acyltransferase의 활성을 감소시켜, 콜레스테롤의 흡수를 억제한다 (Murakami et al., 1996; Mochizuki et al., 1999).

이와 같은 타우린의 hypocholesterolemic과 hypolipidemic의 효과는 콜레스테롤에 대사과정에서 최종 산물이라 할 수 있는 담즙산의 배설과정에서 타우린이 1차 담즙산 형성에 관여함으로써 담즙산의 분비를 용이하도록 하는 역할에서 나타나는 효과라고 사려된다. 타우린의 작용이 혈장지질에 어떤 기전으로 영향을 미치는지에 대한 연구가 더욱 이루어져야 될 것이다.

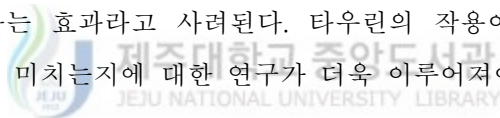


Table 5. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the serum cholesterol and triglyceride content in rats

	Control	Taurine	Cholesterol	Taur+chol
Total-cholesterol*	100.49±14.33 ^c	90.71±10.52 ^c	227.32±66.27 ^a	172.10±26.22 ^b
HDL-cholesterol**	22.40± 6.23 ^{ab}	23.90± 6.86 ^a	16.34± 4.28 ^{bc}	15.52± 4.31 ^c
LDL-cholesterol*	52.69± 6.57 ^c	52.65±12.59 ^c	197.27±41.68 ^a	145.77±27.12 ^b
Triglyceride*	126.99±33.59 ^a	70.83±19.82 ^b	68.54±11.51 ^b	54.08±11.04 ^b
Atherogenic index*	3.71± 1.17 ^c	3.13± 1.32 ^c	13.36± 5.84 ^a	11.02± 5.08 ^b

Plasma levels in mg/100ml

LDL-cholesterol calculated from an equation ; LDL-cholesterol =T-cholesterol - (HDL-cholesterol + TG/5)

Atherogenic index = (T-cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol

Values are means ± SD of 10 rats.

** : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.01)

* : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.05)

5. 간의 총콜레스테롤과 중성지방

간의 총콜레스테롤과 중성지방의 함량은 <Table 6>에 제시되었다. 간의 총콜레스테롤 수준은 혈장의 총콜레스테롤과 유사한 경향을 보였는데, 대조구에 비해 타우린구가 다소 낮은 수치를 보였고, 콜레스테롤구에 비해 타우린+콜레스테롤구의 간 콜레스테롤은 감소되었다 ($P<0.05$). 간의 총콜레스테롤은 대조구에 비해 콜레스테롤 식이를 처리한 구에서 높은 차이를 볼 수 있다 ($P<0.01$). 간의 평균 중성지방 수준은 타우린구에 있어서 대조구에 비해 37% 감소하였으나 표준편차가 커서 통계적인 유의성은 나타나지 않았는데, 이는 Park et al. (1997)의 연구에서 대조구에 비해 타우린구가 44%의 감소를 보이는 결과와 유사한 경향을 보여준다. 콜레스테롤구에 비해 타우린+콜레스테롤구의 경우, 간의 중성지방 수준은 다소 낮았으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. 대조군식이와 콜레스테롤첨가 식이군 간에 많은 차이를 볼 수 있는데, 이는 혈장 중성지방 <Table 4>과 비교해 볼 때 현격히 증가한 것을 알 수 있다. 높은 콜레스테롤을 섭취한 고혈압 쥐의 경우에서 지방간을 유발하고 콜레스테롤 ester와 중성지방은 간에서 크게 축적이 된다고 보고되었다 (Ueno et al., 1986). 구리를 첨가시 손상되는 간에서 타우린의 보충이 MDA의 저하작용과 ALT (alanine transaminase)와 AST (aspartate transaminase)의 효소의 활성을 유의하게 낮추어 줌으로서 간을 보호한다는 보고가 있다 (Hwang et al. 1998). 이와 같이 식이내 타우린의 보충은 여러 가지 기전을 통해서 간의 보호역할을 하는 것으로 사려된다.

Table 6. Effects of feeding diets containing taurine, cholesterol or taurine+cholesterol on the liver cholesterol and triglyceride content in rats.

	Control	Taurine	Cholesterol	Taur+chol
Total-cholesterol ^{**}	5.53±1.01 ^c	4.37±1.15 ^c	43.62±7.28 ^a	33.28±6.68 ^b
Triglyceride ^{**}	16.78±5.19 ^b	10.65±3.77 ^b	47.59±16.94 ^a	43.04±11.48 ^a

Liver levers in mg/g

Values are means ± SD of 10 rats.

** : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.01)

* : Values in the same row not sharing the same superscript differ (P < 0.05)

6. LDL Oxidation

산화정도에 따른 LDL표면의 charge변화를 agarose gel electrophoresis에서의 이동을 통해 관찰하였는데, 이에 대한 결과가 <figure 3>에 나타나 있다. 본 실험에서는 native LDL을 CuSO₄로 산화시켰는데, 이와 같이 산화변성된 LDL은 native LDL과 비교해서 다음과 같은 여러 가지의 구조적 변화를 주었다. 이렇게 산화된 LDL은 산화형 콜레스테롤의 증가, 형광 세기의 증가, apoB의 단편화 증가, (-)전하의 증가, scavenger 수용체에 의한 탐식 증가 등이 나타난다. Niki et al. (1993)은 LDL이 산화되는 동안에 apoB의 응집, 단편화 그리고 (-)charge의 증가 등이 지질과산화 현상의 세기와 관련이 있음을 증명하였다. 즉 agarose gel electrophoresis에서 LDL이 산화되어 (-)charge가 증가되고, 이로 인해 (+)charge로 이동하는 것을 볼 수 있다.

산화된 LDL이 (+)charge에 이동하는데, 이것을 taurine이 항산화 역할로서 어느 정도 억제하는지 알아보았으나 산화억제의 효과가 나타나지 않았다. 반면 항산화제로 알려진 tocopherol은 타우린과 같은 농도 (5 mM)로 첨가했을 때, (+)charge로의 이동을 억제하였다. tocopherol과 비교시 타우린이 항산화 역할이 없음을 알 수 있었다. 타우린은 항산화제로 많이 알려져 있는데 본 LDL oxidation 에서는 항산화의 역할을 하지 못했다. 따라서 타우린의 항산화 역할에 대해서 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.



A : native LDL, B : LDL+Cu²⁺, C : Taurine (5 mM),
 D : Cholesterol (2 mM), E : Taur+Chol, F : Tocopherol (5 mM)

0.7% agarose gel eletrophoresis (0.05M barbital buffer)

Figure 3. LDL - oxidation

7. 간 조직 검사

광학현미경을 이용해 관찰한 각 처리구의 간 조직 사진은 <Figure 4>에 제시되었다. 육안으로 간의 상태를 관찰하면, 콜레스테롤 식이는 대조구에 비해 현저하게 크기와 색의 변화를 가져와 비대성 (hypertrophic)·저색소성 (hypochromic) 간을 관찰할 수 있었고, 간엽 끝이 뭉뚱해져 있는 상태였으나, 그 중 대조구와 타우린구의 간은 크기가 가장 작았으며, 색깔도 다른군에 비해 선홍색을 보였다.

정상 식이를 섭취한 쥐의 간 조직에서는 지방공포를 관찰할 수 없었는데, 본 실험에서 콜레스테롤구는 상당수의 지방공포를 나타냈다. 콜레스테롤구에서 지방공포 생성이 많은데, 이는 세포내의 소지방구와 이것이 더욱 진행된 상태인 대지방구가 다수 관찰되는 양상이었다. 이러한 지방구들은 세포핵을 한쪽으로 밀어내 버리고, 세포의 모양을 변화시킨다. 한편, 타우린+콜레스테롤구에서는 대지방구에 비해 소지방구가 많이 발견되어, 지방간 억제 효과는 확실한 것으로 나타났다. 대조구와 타우린구에서는 지방구 형성을 전혀 볼 수 없었고 콜레스테롤을 보충한 식이구에서만 지방구 형성을 볼 수 있었다. 콜레스테롤의 섭취는 지방간에 확실히 작용하는 것으로 사료된다. 이와 같이 타우린은 간보호작용에 많은 역할을 한다고 볼 수 있다.

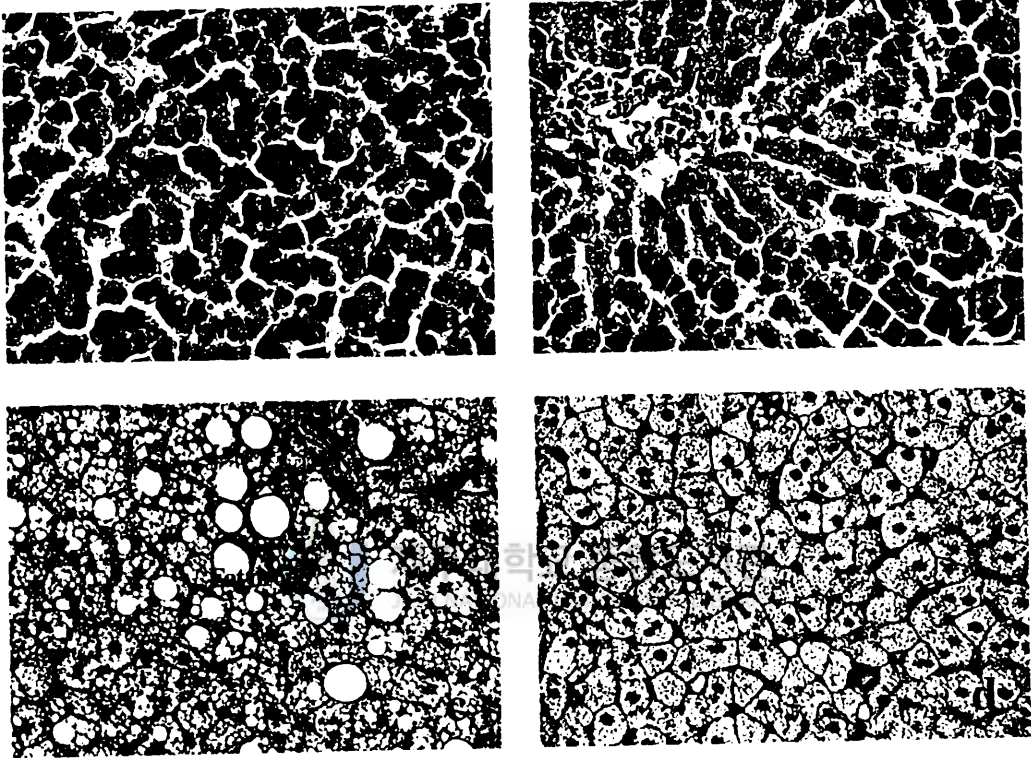


Figure 4. Microscopic appearance of liver tissue, ($\times 400$)

a : Control

b : Taurine

c : Cholesterol

d : Taut + Chol

IV. 결 론

심순환기질환에 여러 인자 중 혈소판 응집성, 적혈구의 나트륨 유출, 체내 지질수준 및 LDL산화에 타우린보강이 흰쥐에 있어서 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 이 실험을 수행하였다. 생후 4주의 Sprague Dawley계 숫 쥐를 대상으로 5% 타우린을 무콜레스테롤 식이와 0.5% 콜레스테롤과 0.2% cholate를 함유한 콜레스테롤 식이에 보충하였다. 결과를 요약하면 다음과 같다:

1. 증체량, 식이섭취량 및 식이효율은 타우린구가 다른구에 비해 유의적으로 낮았고 최종 체중이 다소 적게 나타났다 ($P < 0.05$). 간/체중비는 대조구에 비해 콜레스테롤을 보충한 식이구들에서 유의적으로 높은 것을 볼 수 있다.
2. 혈소판응집에 있어서 *in vivo*의 경우 maximum, initial slope이 대조구에 비해 타우린구가 유의적으로 감소되었고, 콜레스테롤구에 비해 타우린+콜레스테롤구가 유의적인 차이는 없었으나 다소 감소하는 경향을 보였다. *in vitro*의 경우에도 비슷한 경향을 보였으나 통계적으로 유의성은 없었다.
3. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, Na^+ leak의 경우 대조구에 비해 타우린구에서 다소 감소하였으나, 모든 구에서 유의적 차이는 보이지 않았다.
4. 혈장 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도는 콜레스테롤식이구에 비해 타우린+콜레스테롤이 유의적으로 감소시켰다. 대조구에 비해 타우린구에서도 감소하는 경향이 나타났으나 유의차는 없었고, 콜레스테롤식이구

에서는 현저히 증가하였다. HDL-콜레스테롤의 경우 대조구와 처리구들 사이에 유의차가 없었다.

중성지방의 경우 대조구에 비해 타우린식이구, 콜레스테롤식이구에 비해 타우린+콜레스테롤식이구에서 현저히 낮은 농도를 보였다.

5. 간의 총콜레스테롤은 콜레스테롤식이구에 비해 타우린+콜레스테롤식이구가 유의적으로 감소되었고, 대조구와 비교해 볼 때 콜레스테롤구에서 현격히 증가한 것을 볼 수 있다. 간 중성지방 경우 대조구에 비해 타우린식이구, 콜레스테롤식이구에 비해 타우린+콜레스테롤식이구 등에서 현저히 낮은 경향을 보였다.

6. LDL-Oxidation 반응에서 타우린의 산화억제 효과는 보이지 않았다.

7. 광학 현미경을 통해 살펴본 간 조직은 콜레스테롤구에서 상당수의 소지방구와 대지방구가 관찰되었다. 타우린+콜레스테롤식이구에서는 대지방구는 볼 수 없었으며, 대부분이 세포내 소지방구였고 그 크기나 수가 다른구에 비해 작았다. 그리고 콜레스테롤을 섭취하지 않은 대조구와 타우린구에서는 지방구를 볼 수 없었다.

본 연구는 타우린의 생리활성을 심순환기 질환의 예방에 초점을 맞춰 세포막의 이온 이동의 조절, 콜레스테롤 대사, 혈소판 응집에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 타우린의 작용기전을 항산화에 초점을 맞춰 해석 하려했으나 LDL산화 및 Na^+ passive leak 등의 결과를 종합해볼 때 항산화에 의한 생리활성이라고는 결론을 내릴 수 없었다. 간보호, 숙취 및 장기적으로 심순환기질환의 예방차원에서 필수영양물질인 타우린은 그 생리적 기능을 담즙산의 구성성분으로서 Hypocholesterolemic 효과로 집약 할 수 있으리라 생각되지만 이러한 결론에 앞서 보다 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 참 고 문 헌

American Institute of Nutrition, AIN 76A semipurified diet : Report of the American Institute of Nutrition ADOC Committee on standards for Nutritional Studies. (1977) *J Nutr.* 107:1340-1348

Basu, S.K., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. and Brown, M.S. (1976) Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 73:3178-3182

BiLiFu, Q., Takashi Y., Yuuchi, N., Shigeru, S. and Sadanobu, K. (1995) Effects of Taurine on Depletion of Erythrocyte Membrane Na-K ATPase Activity Due to Ozone Exposure or Cholesterol Enrichment. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 41, 627-639

Bilifu, Q., takashi, Y., Yuuchi, N., Shigeru, S. and Sadanobu, K. (1995) Effects of taurine on depletion of erythrocyte membrane Na-K ATPase activity due to ozone exposure or cholesterol enrichment. *J Nutr.* 41, 627-634

Caballero, O.A., Stiefel, G.P.P., Garcia-Donas L.M. A., Villar O.J. and Carneado, F. J. (1995) Transmembrane Na⁺ transport kinetics in arterial hypertension: relations with vascular risk parameters. *Med Clin.* 105(20), 768-773

Childs, M. T., Dorsett, C. S., Failor, A., Roidt, L. and Omern, G. S.

(1987) Effect of shellfish consumption on cholesterol absorption in normolipidemic men. *Metabolism*. 36(1), 31-35

Cho, S. Y., Park, M. L., Park, W. H. and Jeong, J. H. (1989) Effect of caffeine and vitamin E on the lipid composition of serum and liver in cholesterol-fed rats. *J Korean Soc Food Nutr*. 18(1), 53-61

Corine, M., Stephen, R. B., Christian, R. and Christian D. (1997) Fecal Losses of sterol and bile acids induced by feeding rats guar gum are due to greater pool size and liver bile acid secretion. *J Nutr*. 127, 1068-1076

Dawson, R. J., Liu, S., Jung, B., Messina, S. and Eppler, B. (2000) Effects of high salt diets and taurine on the development of hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Amino Acids*. 19(3-4), 643-645

Dumoulin, J.C., Evers, J.L., Michiels, A.H., Pieters, M.H., Bras, M., Land, J.A. and Geraedts, J.P. (1993) Modulation of embryonic Na⁺-K⁺-ATPase activity and mouse preimplantation development in vitro in media containing high concentrations of potassium. *Mol Reprod Dev*. Nov, 36(3), 320-327

Dupre, S., Macone, A., Masella, R., Modesti, D. and Catafora, A. (1998) In vitro evaluation of taurine activity oxidized LDL. In: Taurine 3, edited by Schaffer et al., *Plenum Press New York*, 9-15.

Fellman, J.H., Green, T.R. and Eicher, A.L. (1987) The oxidation of hypotaurine to taurin: bis- α -disulfone, a metabolic intermediate in

mammalian tissue, In; *Adv Exp. Med Biol.* "the biology of taurine: Methods and Mechanism" edited by Huxtable, RJ., Franconi, F., and Giotti, A. Plenum Press, New York vol 217. 39-48

Fisher, W. R., (1983) Heterogeneity of plasma low density lipoprotein : manifestation of the physiologic phenomenon in man. *Metabolism.*, 32, 283-291

Flavia, F., Federico, B., Antonella, M., Mauro, M., Mila, C., Maurizio, M., Alfredo, G., Roberto, A. and Giuseppe, S. (1995) Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. *Am J Clin Nutr.* 61, 1115-1119

Franconi, F., Bennardini, F., Mattana, A., Miceli, M., Ciuti, M., Mian, M., Gironi, A., Anichini, R. and Seghieri, G. (1995) Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. *Am J Clin Nutr.* May 61(5), 1115-1119

Gandhi, V. M., Cherian, K. M. and Mulky, M. J. (1992) Hypolipidemic action of taurine in rats. *Indian Journal of Experimental Biology.* May 30 413-417

Garay, R. P., Hajem, S., Moreau, T., Hannaert, P., Lellouch, J., Orssaud, G., Huel, G., and Claude, J. R. (1990) Erythrocyte cation transport systems and plasma lipids in a general male population. *J Hypertens.* 8(10), 891-896

Gray, D. F., Hansen, P. S., Doohan, M. M. and Hool, L. C., Rasmussen,

H., H. (1997) Dietary cholesterol affects $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump function in rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 272, H1680-1689

Gross, P. L., Rand, M. L., Barrow, D. V. and Packham, M. A. (1991) Platelet function in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Decreased sensitivity to thromboxane A₂. *Arterioscler Thromb.* 11(3), 610-616

Guyton. (1983) Harper's review of biochemistry. 19th edit : *Lange medical publications, Lithographed in USA.* 450-548

Hayes, KC., Pronczuk, A., Addesa, AE. and Stephan ZF. (1989) Taurine modulates platelet aggregation in cats and humans. *Am J Clin Nutr.* Jun 49(6), 1211-1216

Hidehiko, Y., Hideki, M., Ken, N., Yuko, H., Fuyuko, M. and Hiroaki, O. (1999) Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *J Nutr.* 129, 1705-1712

Huang, H.L. and Rao, M.R. (1995) Effects of neferine and its combination with taurine on platelet aggregation and experimental thrombosis in rats. *Yao Xue Xue Bao.* 30(7), 486-490

Huxtable R. J. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiological reviews* 72, 101-163

Hwang, D. F., Wang, L. C. and Cheng H. M. (1998) Effect of taurine on toxicity of copper in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 36, 239-244

Igisu, H., Izumi, K., Goto, I. and Kina, K. (1976) Effects of taurine on the ATPase activity in the human erythrocyte membrane. *Pharmacology*. 14(4), 362-366

Ishizaki, M., Teraoka, K., Tsuritani, I., Honda, R., Ishida, M. and Yamada, Y. (1994) Erythrocyte Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase and membrane and serum lipid profiles: as related to alcohol, body mass index and blood pressure. *Clin Exp Hypertens*. 16(6), 741-759

Kakimoto, H., Imai, Y., Kawata, S., Inada, M., Ito, T. and Matsuzawa, Y. (1995) Altered lipid composition and differential changes in activities of membrane-bound enzymes of erythrocytes in hepatic cirrhosis. *Metabolism*. 44(7), 825-832

Kelly, J.J. and Tsai, A.C. (1978) Effect of pectin, gum arabic and agar on cholesterol absorption, synthesis, and turnover in rats. *J Nutr*. Apr 108 (4), 630-639

Kerai, M.D., Waterfield, C.J., Kenyon, S.H., Asker, D.S. and Timbrell J.A. (1999) Reversal of ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats. *Alcohol Alcohol*. 1999 Jul-Aug 34(4):529-41

Kilic, F., Bhardwaj, R., Caulfeild, J. and Trevithick, JR. (1999) Modelling cortical cataractogenesis 22 : is in vitro reduction of damage in model diabetic rat cataract by taurine due to its antioxidant activity? *Exp Eye Res* Sep, 69(3), 291-300

Kishida, T., Akazawa, T. and Ebihara, K. (2001) Influence of age and ovariectomy on the hypocholesterolemic effects of dietary taurine in rats

fed a cholesterol-free diet. *Nutr Res.* Jul 21(7), 1025-1033

Kiziltunc, A., Akcay, F., Polat, F., Kuskay, S. and Sahin, Y. N. (1997) Reduced lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) and Na⁺, K⁺, ATPase activity in diabetic patients. *Clin Biochem.* 30(2), 177-182

Kondo, Y., Murakami, S., Oda, H. and Nagate, T. (2000) Taurine reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Adv Exp Med Biol.* 483, 193-202

Kondo, Y., Toda, Y., Kitajima, H., Oda, H., Nagate, T., Kameo, K. and Murakami, S. (2001) Taurine inhibits development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Oct 28(10), 809-815

Latta, E. K., Packham, M. A., Gross, P. L. and Rand, M. L. (1994) Enhanced collagen-induced responses of platelets from rabbits with diet-induced hypercholesterolemia are due to increased sensitivity to TxA₂. Response inhibition by chronic ethanol administration in hypercholesterolemia is due to reduced TxA₂ formation. *Arterioscler Thromb.* 14(8), 1379-1385

Liu, C.H., Huang, M.T., and Huang, P.C. (1995) Sources of Triacylglycerol Accumulation in Livers of Rats Fed a Cholesterol-Supplemented Diet. *Lipids.* 30, 527-531

Liu, XQ. and Li, YH. (2000) Epidemiological and nutritional research on prevention of cardiovascular disease in China. *Br J Nutr.* Dec 84, Suppl 2, S199-203

Lombardi, J. B., Schaffer, S. and Huxtable R. J. (1998) Taurine ; Cellular and regulatory mechanism (Advances in Experimental medicine and biology). edit : *plenum press, USA*

Lou, H. C., nielsen, J. D., Bomholt, A. and Gormsen, J. (1977) Platelet hyperaggregability in young patients with completed stroke. *Acta Neurol Scand.* 56(4), 326-334

Lu, G., Ouyang, S. and Pei, Z. (1999) changes of erythrocyte membrane ATPase activities and plasma lipids in patients with coronary heart disease. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 24(1), 68-70

Marian, T. C., Carol, S. D., Irena, B. K., Joyce, G. O. and William, K. Y. (1990) Effects of shellfish consumption on lipoproteins in normolipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 51, 1020-1027

Masoom, Y. M. (1996) Altered fatty acid, cholesterol and Na^+/K^+ ATPase activity in erythrocyte membrane of rheumatoid arthritis patients. *Z Naturforsch.* 51(5-6), 401-403

Mayol, V., Duran, M. J., Gerbi, A., Dignat, G. F., Levy, S., Sampol, J. and Maixent, J. M. (1999) Cholesterol and omoga-3 fatty acids inhibit Na, K-ATPase activity in human endothelial cells. *Atherosclerosis.* 142(2), 327-333

Mita, D. J. K., Catherine, J. W., Susan, H. K., Daniel, S. A. and John, A. T. (1999) Reversal of ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats. *Alcohol & Alcoholism.* 34(4), 529-541

Mochizuki, H., Oda, H. and Yokogoshi, H. (2001) Dietary taurine potentiates polychlorinated biphenyl-induced hypercholesterolemia in rats. *J Nutr Biochem.* Feb 12(2), 109-115

Mochizuki, H., Takido, J., Oda, H. and Yokogoshi, H. (1999) Improving effect of dietary taurine on marked hypercholesterolemia induced by a high-cholesterol diet in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* Nov 63(11), 1984-1987

Moran J., Salazar, P. and Pasantes-Morales, H. (1987) Effect of tocopherol and taurine on membrane fluidity of retinal rod iuter segments. *Exp Eye Res* Dec, 45(6), 769-776

Mrsny, R. J. and Meizel, S. (1984) Inhibition of hamster sperm Na^+ , K^+ -ATPase activity by taurine and hypotaurine. *Life Sciences.* 36, 271-275

Mrsny, R.J. and Meizel, S. (1985) Inhibition of hamster sperm Na^+ - K^+ -ATPase activity by taurine and hypotaurine. *Life Sci.* Jan 21, 36(3), 271-275

Murakami, S., Kondo, Y and Tomisawa, K. (1999b) Improvement in cholesterol metabolism in mice given chronic treatment of taurine and fed a high-fat diet. *Life sciences.* 64(1), 83-91

Murakami, S., Kondo, Y. and Nagate, T. (2000) Effects of long-term treatment with taurine in mice fed a high-fat diet: improvement in cholesterol metabolism and vascular lipid accumulation by taurine. *Adv Exp Med Biol.* 483, 177-186

Murakami, S., Kondo, Y., Tomisawa, K. and Nagate, T. (1999) Prevention of atherosclerotic lesion development in mice by taurine. *Drugs Exp Clin Res.* 25(5), 227-234

Murakami, S., Yamagishi, I., Asami, Y., Ohta, Y., Toda, Y. and Nara, Y. (1996) Hypolipidemic Effect of Taurine in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Pharmacology.* 52, 303-313

Nakamura, T., Ogasawara, M., Koyama, I. and Yoshida T. (1993) The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by oxygen radicals. *Biol Pharm Bull* 16(10):970-972

Nakaya, Y., Minami, A., Harada, N., Sakamoto, S., Niwa, Y. and Ohnaka, M. (2000) Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* Jan 71(1), 54-58

Namba, K., Ejiri, K., Kanemori, H., Kudo, T. and Sekiba, K. (1992) Effect of taurine concentration on platelet aggregation in gestosis patients with edema, proteinuria and hypertension. *Acta Med Okayama.* Aug 46(4), 241-247

Nishina, P.M. and Freedland, R.A. (1990) Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr.* Jul 120(7), 668-673

Obrosova, I. G. and Stevens, M. J. (1999) Effect of dietary taurine supplementation on GSH and NAD(P)-redox status, lipid peroxidation, and energy metabolism in diabetic precataractous lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(3), 680-688

Ogasawara, M., Nakamura, T., Koyama, I., Nemoto, M. and Yoshida, T. (1993) Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* Dec, 41(12), 2172-2175

Ohba, T., Tonooka, M., Kawashima, I., Nakayama, S., Yasuhara, H., and Sakamoto, K. (1985) Effect of nicardipine on cholesterol-fed S.H.R.. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 86(2). 93-103

Paasonen, M. K., Penttila, O., Merikallio, E., Siltanen, P., Himberg, J. J. and Solatunturi, E. (1982) Taurine in human auricular myocardium and blood platelets. *Ann Clin Res*. 14(3), 115-118

Park, T.S. and Lee, Kyungshin. (1997) Effect of Dietary Taurine Supplementation on Plasma and Liver Lipid Levels in Rats Fed a Cholesterol-Free Diet. *Kor. J. Nutr.*, 30, 1132-1139

Park, T.S., Lee, K.S., and Um Y.S. (1998) Dietary taurine supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a high cholesterol diet. *Nutr. Res*. 18(9), 1559-1571

Pasantes-Morales, H., wright C.E., and Gaull, G.E. (1985) Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem Pharmacol*. 34(12), 2205-2207

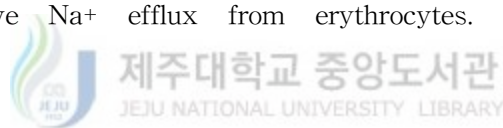
Rampratap, S.K., Kushwaha, W.R., Hazzard, L.A. Harker and Jonathan, E. (1978) LIPOPROTEIN METABOLISM IN BABOONS. *Atherosclerosis*. 31, 65-76

Reichen, J. and Paumgartner, G. (1979) Inhibition of hepatic Na^+, K^+ -adenosinetriphosphatase in tauroolithocholate-induced cholestasis in the rat. *Experientia*. Sep 15, 35(9), 1186-1188

Seiler, D. and Fiehn, W. (1976) Effect of cholesterol oxidation on (Na^+ , K^+) ATPase activity of erythrocyte membranes. *Experientia*. 32(7), 849-850

Shinnick, F. L., Ink, S. L. and Marlett, J. A. (1990) Dose response to a dietary oat bran fraction in cholesterol-fed rats. *J Nutr*. 120(6), 561-568

Smith, J. B., Ash, K. O., Sprowell, W. L., Hentschel, W. M., Williams, R. R. (1984a) An improved non-radioisotopic method for increasing ouabain-sensitive Na^+ efflux from erythrocytes. *Clin Chim Acta*. 143:295-299



Smith, J. B., Ash, K. O., Hentschel, W. M., Sprowell, W. L., Williams, R. R. (1984b) A simplified method for simultaneously determining countertransport and cotransport in human erythrocyte. *Clin Chim Acta*. 137:167-177

Tadolni B, Pintus G, Pinna GG, Franconi F. (1995) Effect of taurine and hypotaurine on lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Comm*. 24:213(3) 820-826

Topping, D.L., Illman, R.J., Clarke, J.M., Trimble, R.P., Jackson, K.A. and Marsono, Y. (1993) Dietary fat and fiber alter large bowel and portal venous volatile fatty acids and plasma cholesterol but not biliary steroids in pigs. *J Nutr*. Jan 123(1), 133-143

- Ueno, K. and Okuyama, H. (1986) A high cholesterol/cholate diet induced fatty liver in spontaneously hypertensive rats. *Lipids*. 21(8), 475-480
- Uysal, M. (1986) Erythrocyte lipid peroxidation and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity in cholesterol fed rabbits. *Int J Vitam Nutr Res*. 56(3), 307-310
- Van Dyke, R.W. and Scharschmidt, B.F. (1987) Effects of chlorpromazine on Na⁺-K⁺-ATPase pumping and solute transport in rat hepatocytes. *Am J Physiol*. Nov 253(5 Pt 1), G613-621
- Vasarhelyi, B., Sallay, P., Balog, E. and Reusz, T. (1996) Altered Na⁽⁺⁾-K⁺ ATPase activity in uraemic adolescents. *Acta Paediatr*. 85(8), 919-922
- Vaureswari, A., and Narayanareddy, K. (1992) Effect of dietary fats on some membrane-bound enzyme activities, membrane lipid composition and fatty acid profiles of rat heart sarcolemma. *Lipids*, 27, 339-343
- Welles, E. G., Boudreaux, M. K. and Tyler, J. W. (1993) Platelet, antithrombin, and fibrinolytic activities in taurine-deficient and taurine-replete cats. *Am J Vet Res*. 54(8), 1235-1243
- Wiley, J.S., Ellory, J.C., Shumam, M.A., Shaller, C.C. and Cooper, R. (1975) Characteristics of the membrane defect in the hereditary stomatocytosis syndrome. *Blood* 46(3), 337-356
- Winocour, P. D., Rand, M. L., Richardson, M. and Mustard, J. F. (1989) Platelet function and survival in rats with genetically determined hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 76(1), 63-70

Yamamoto, K., Yoshitama, A., Sakono, M., Nasu, T., Murakami, S. and Fukuda, N. (2000) Dietary taurine decreases hepatic secretion of cholesterol ester in rats fed a high-cholesterol diet. *Pharmacology*. Jan 60(1), 27-33

Yap, L., Arrazola, A., Soria, F. and Diez, J. (1989) Is there increased cardiovascular risk in essential hypertensive patients with abnormal kinetics of red blood cell sodium-lithium countertransport? *J Hypertens*. 7(8), 667-673

Yeagle, P. L. (1983) Cholesterol modulation of (Na⁺ + K⁺)-ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta*. 727(1), 39-44

Yokogoshi, H., Mochizuki, H., Nanami, K., Hida, Y., Miyachi, F. and Oda, H. (1999) Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *J Nutr*. 129, 1705-1712

Yutaka, N., Asako, M., Nagakatsu, H., Sadaichi, S., Yasuharu, N. and Masaharu, O. (2000) Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 71, 54-58

Zager, R. A. (2000) Plasma membrane cholesterol: a critical determinant of cellular energetics and tubular resistance to attack. *Kidney Int*. 58(1), 193-205

Abstract

Effects of taurine on platelet aggregation, Na efflux, plasma and liver cholesterol and LDL-oxidation in Sprague Dawley Rats.

In Sun Park

Department of Food Science and Nutrition, Graduate School
Cheju National University, Cheju, Korea

It has been demonstrated that taurine present in most animal tissues has various physiological functions. Especially, taurine is known to be effective in protecting cardiovascular diseases by affecting osmoregulation through ion transport, platelet aggregation and cholesterol metabolism. However, the effects of taurine in vitro study are still controversial and its action mechanisms are far from clear.

We conducted an in vivo study to examine effects of taurine on erythrocyte ouabain sensitive Na efflux and plasma and liver cholesterol and platelet aggregation in Sprague Dawley rats fed control or 0.5% cholesterol diet. Supplementation of 5% taurine decreased in Na efflux in rats fed control diet and rather increased the reduced Na efflux by cholesterol diet, but not statistically significant. Both plasma and liver levels of total cholesterol increased significantly ($P<0.05$) in rats fed cholesterol diet compared to the control, and taurine significantly decreased the elevated levels of plasma and liver total cholesterol in rats fed cholesterol diet ($P<0.05$). Taurine did not influence HDL cholesterol. Plasma triglyceride decreased and liver triglyceride increased both significantly ($P<0.05$) in rats fed cholesterol compared to the control. Taurine caused a decrease in plasma and liver triglyceride significantly ($P<0.01$) in rats fed control diet. Platelet aggregation was significantly ($P<0.05$) lower in rats with than without taurine supplement for both control and cholesterol groups.

Microscopic examination showed that taurine prevents fatty liver in

rats fed cholesterol diet. Taurine known for stimulating Na-K ATPase rather decreased Na efflux through Na-pump in the present study.

Taurine had hypolipidemic and hypocholesterolemic effects and inhibited platelet aggregation which may be favorable for prevention of cardiovascular diseases.



감사의 글

제게는 너무 멀게만 느껴졌던 논문이 여러분들의 도움으로 이렇게 나오게 되었습니다.

먼저 제가 대학원이란 것을 생각할 수 있게 해주시고 이렇게 졸업까지 갈 수 있게 끈임없이 지켜주신 어머니 같은 강정숙교수님 정말 감사드립니다. 교수님 저 서울에 올라가서도 교수님은 평생 교수님으로 아니 저의 어머니로 모시겠습니다. 다시 한번 감사드립니다. 저에게 학문이나 인생에 있어서 힘들 때 항상 바른길로 인도하신 홍양자교수님, 고양숙교수님 감사드립니다. 그리고 삶에 대한 자세를 가르쳐주신 윤창훈교수님, 양양한교수님, 신동범교수님 감사드립니다. 저의 부족한 논문을 심사하시느라 마침표까지 찾아주시던, 너무나도 고생하신 김규일교수님 감사드립니다. 참고수라는, 연구자라는 면모를 가르쳐주신 한림대 강영희교수님 감사드립니다.

지현아, 은희야, 주현아 생각나니! 본격적으로 쥐 분석 들어갈 때 너무나도 눈이 많이 와서 고생했던 일. 은희는 집에도 못 가고 실험했지. 그리고 언니 논문 발표하는 날 우리 실험실에 비상 걸렸다고 같이 있어주던, 항상 힘들 때나 짜증날 때도 한결같이 옆에 있어준 소중한 우리 동생들 지현아, 주현아, 은희야 우리의 논문 나왔다. 정말 고맙다! 잊지 않을게, 영원히~

제주도에 올 수 있고 정말 든든한 힘이 되어주신 작은 아빠, 엄마 정말 감사드립니다. 그리고 누구보다 내 논문에 큰 힘을 쓴 우리 친언니와 다름없는 지영이 언니. 언니야 항상 행복하고 건강해야돼! 언제나 나의 반쪽처럼 모든 일을 함께 즐거워해주고 슬퍼해준 우리 연속이. 연속아! 난 너가 있었기에 정말 힘든지도 모르고 버텼다. 고맙다. 우리 맴버 지현, 민정, 성애, 주영 내가 얼마나 고마워하는지 알지. 멀리 서울에서 힘이 되어준 인숙이, 진주, 미영이, 나의 영원한 룸메이트 세라이, 동욱 언니 하나뿐이 없는 대학원 동기 순자언니, 제가 논문을 시작한다고 여러모로 도와주신 자연대 행정실 선생님들, 양희언니, 민숙언니, 실험과 마음으로 격려해준 귀여운 후배 연정이, 성희, 동철, 그리고 한림대 생리학실험실, 여러모로 챙겨주고 가르쳐주던 철용, 재욱, 원우. 헤아릴 수 없이 너무 많은 분들에게 고개 숙여 감사를 드립니다. 언제나 내편에서 항상 걱정해주는 우리 오빠, 언니. 친자매나 다름없는 지영이, 정아 정말 고맙다.

저에게 세상에서 가장 소중하고 너무나도 사랑하는 아버지, 어머니 감사드립니다. 아버지, 어머니 끝날 것 같지 않았던 대학원을 이제 졸업합니다. 이 못된 막내딸이 해달라고 하는 것은 묵묵히 다 해주시고 언제나 저에게 큰 언덕이 되어 제가 뭘 하든 믿어주시고 살피주시고 저의 큰 후원자가 되어 주신 우리 부모님. 정말 사랑합니다. 항상 바쁘다는 핑계로 소홀히 하고 힘들 때 곁에 있지 못했던 것이 제일 죄송스럽습니다. 마지막으로 이 작은 결실을 부모님께 드립니다.