

성소의 제거와 고콜레스테롤 식이
급여가 흰쥐의 혈장과 간의
콜레스테롤, 중성지방 수준과
혈소판 응집성 및 간 조직에 미치는
영향에 있어서 암·수의 차이

강 정 숙

제주대학교 자연과학대학 식품영양학과

Gender Difference in the Effects
of Gonadectomy and
Hypercholesterol Diet on Plasma
and Liver Cholesterol and
Triglyceride Levels, Platelet
Aggregation and Liver Tissue in
Sprague Dawley Rats

Jung Sook Kang

Department of Food Science & Nutrition, College
of Natural Sciences, Cheju National University,
Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

Gender differences in the effects of gonadectomy and high cholesterol diet on body weight and body cholesterol were investigated by using Sprague Dawley rats. Body weight, plasma and liver levels of cholesterol and triglyceride and platelet aggregation were examined in ovariectomized (OVX) or orchidectomized (ODX) rats with their intact after feeding diet with or without 0.5% cholesterol.

Body weight was significantly increased ($P < 0.01$) in OVX rats and significantly decreased ($P < 0.01$) in ODX rats compared to their respective intact rats, and

cholesterol diet significantly ($P < 0.05$) decreased body weight in gonadectomized rats. Liver lobes from rats fed cholesterol diet were opaque and larger than those from rats fed control diet, resulting in a significant increase ($P < 0.01$) in LW/BW ratio. Plasma and liver levels of total cholesterol were significantly increased ($P < 0.01$) in female rats regardless ovariectomy when fed 0.5% cholesterol diet, but those levels in male rats were increased only when they were orchidectomized ($P < 0.01$). Plasma HDL-cholesterol was significantly decreased ($P < 0.05$) in both sexes when fed cholesterol diet. HDL-cholesterol were higher in female than male rats regardless treatments ($P < 0.05$). Liver triglyceride was significantly increased ($P < 0.05$) in both sexes when fed cholesterol diet. Plasma level of triglyceride was not different among groups except significant decrease ($P < 0.05$) in cholesterol fed ODX rats. Maximum platelet aggregation in female rats was significantly lower ($P < 0.05$) than male, but ovariectomy and cholesterol diet caused an increase to the level of male rats. Microscopic examination showed cholesterol diet caused a lipid accumulation in liver.

Results indicate that intact female rats have higher response to hypercholesterolemic diet than intact male rats and orchidectomy causes male rats more responsive to hypercholesterolemic diet. However, ovariectomy causes an increase female food efficiency ratio to the level of male rats, significantly increasing body weight.

Key words : hypercholesterolemic diet, ovariectomy, orchidectomy, body weight, platelet aggregation

1. 서 론

심장마비, 뇌졸중 등 심순환기질환의 주된 위험인자로
는 유전적인 요인 이외에 흡연, 스트레스, 비만, 고혈압,
고지혈증 및 고콜레스테롤혈증 등을 들 수 있다. 특히 고
콜레스테롤혈증은 동맥경화의 직접적인 요인으로 이른바
'Rich diet'이라는 포화지방, 콜레스테롤, 칼로리, 설탕의

함량이 높은 식품의 섭취증가가 주된 요인으로 인식되어지고 있다.

Beitz(1994)등에 의하면 콜레스테롤 섭취량은 1일 300-800mg으로서 식사의 내용에 따라 상당히 차이가 있으나, 체내에서 합성되는 콜레스테롤 1일 약 800mg으로 정상 건강한 성인에 있어서 체내 콜레스테롤의 body pool은 120g 정도로 대체로 일정하게 유지된다. 혈중 콜레스테롤, 특히 LDL-콜레스테롤은 나이가 들수록 전반적으로 증가되고(Ericsson S 등 1997, Bonora E 등 1996), 포화지방이나 콜레스테롤의 과다섭취에 인한 식후 lipidemia나 콜레스테롤 혈중 반응은 남자에게서 더 높다는 보고가 있지만(Weggemans RM 등 1999, Kovar J 등 2000), Framingham heart study를 비롯한 여러 임상 실험에서 식이 콜레스테롤 자체가 연령층이나 고콜레스테롤 혈중 유무에 상관없이 혈중 콜레스테롤농도에 그다지 영향을 미치지 않았다(McNamara DJ 등 1997).

대부분의 콜레스테롤과 심장순환기관 관련 질환에 대한 역학조사는 Framingham 연구 결과를 토대로 이루어지고 있는데, 특히 Castelli 등(Castelli WP 등 1986)의 보고에 의하면 60세 이전에 있어서 남성의 심혈관계질환의 이환률이 여성보다 훨씬 높다. Kannel(Kannel WB 등 1995)에 의하면 심근경색과 같은 심순환기 질환이 나타나는 평균 혈중 콜레스테롤 수치는 남성이 여성에 비해 낮으며 나이가 들수록 더욱 낮아진다. 이러한 심순환기 질환의 발병과 혈중 콜레스테롤의 상관관계는 청·장년기에 높게 나타나지만, 65세 이후의 남성에서 사실상 무관하게 나타나고 있다(Anderson KM 등 1987, Capurso A 등 1992, Kronmal RA 등 1993). 콜레스테롤의 분포를 보면, 건강한 젊은 여성의 경우 같은 나이의 남성에게 비해, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 그리고 중성지방은 낮고, HDL-콜레스테롤은 남성에게 비해 상대적으로 높으나 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤은 증가되어(Kannel WB 등 1976, Fukami K 등 1995, Pasquali R 등 1997) 폐경기 이후 혈관관련질환의 발병률이 높아지는 원인으로 작용하고 있다. 폐경으로 인한 내분비계의 변화는 혈중 지질 농도의 변화를 비롯한 인슐린 저항성과 비만을 야기하며, 이러한 요인들이 심혈관계 질환의 발병요인으로 작용한다.

실험 동물에 있어서 혈중 콜레스테롤의 암 수 차이는

동물에 따라 약간 다르고, 식이 콜레스테롤에 대한 혈중 콜레스테롤의 반응이나 성소 절제가 이들 요인에 미치는 영향도 동물의 모델에 따라 매우 다르게 나타나고 있다(Hanke H 등 1996, Wilson TA 등 1999, Fernandez ML 등 1999).

본 연구에서는 고콜레스테롤 식이가 체 콜레스테롤에 미치는 효과에 있어서 암·수의 차이를 보고자 한다. 또한 이러한 차이가 gonadal steroids에 의한 것이라면 성소 제거가 체 콜레스테롤과 체중에 미치는 효과에 있어서 차이를 조사하고자 Sprague Dawley 쥐를 이용하여 난소나 정소를 절제하고 0.5%의 고콜레스테롤 식이로 모델을 설정하여 실험을 진행하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험동물의 식이, 사육 및 시료채취

예비실험에서 6마리의 종축 쥐로부터 생산된 8주의 Sprague Dawley 암·숫쥐 각 20마리를 10마리씩 각 2군으로 나누어 AIN기준의 모든 영양소를 함유한 기본식을 control군으로, 기본 식이에 0.5% 콜레스테롤과 0.2% cholate를 첨가한 식이를 콜레스테롤식이군으로 하여(Table 1) 4주간 사육하였다. 본 실험에서는 8마리의 종축 쥐로부터 2-3일 간격으로 태어난 암·수 각 30마리를 총 6군으로 나누어 기본 식이, 성소 절제, 성소절제 및 콜레스테롤 첨가 등의 요인에 따른 암·수 차이를 비교하였다. 4주된 암·숫쥐를 에틸로 마취한 후, 암쥐는 양쪽 측면의 난소위치 부근에 털을 제거하여 8mm 정도 절개한 후 소독한 핀셋을 넣어 꺼집어 낸 부분 중 연한 핑크로 확인된 난소를 절제하고 수술용 clip으로 봉합하였고, 숫쥐는 양쪽 고환 부위를 1.5cm 정도씩 절개하여 고환을 꺼내고 clip으로 봉합한 후 수술부위를 알콜로 소독하여 마무리하였다. Sham 암쥐는 같은 수술과정을 거치지만 난소를 절제하지 않고 봉합하였고, 숫쥐의 경우 sham 수술 후 봉합이 어려워 intact 상태로 사용하였다. 난소절제(ovariectomy, OVX) 및 정소절제(orchidectomy, ODX)된 암·숫쥐를 일주일간 회복기간을 둔 후, 평균 체중이 숫쥐 150g 정도, 암쥐 130g 정도에서 같은 실험식이(Table 1)로 4주간의 사양실험을 시작하였다.

쥐들은 각기 stainless steel cage 에 넣어 12시간 조명, 12시간 암흑주기가 조절되는 방에서 식이와 물은 자

유로이 공급되었다. 사양기간 동안 체중은 2일마다, 식이 섭취량 3일마다 일정한 시간에 측정하였다. 4주 때 쥐들을 12시간 절식한 후 cardiac puncture에 의해 헤파린 처리된 vacutainer에 채혈하여 hematocrit과 혈소판 응집은 즉시 전혈로 실험을 진행하고, 나머지 혈액은 혈장 분석을 위해 2000×g에서 20 분간 원심 분리하였다. 간은 바로 적출하여 거름종이로 표면의 혈액을 제거하여 무게를 측정 후, 간 조직검사를 위해 일부를 10% 포르말린용액에 고정시켜 놓고, 남은 간은 콜레스테롤과 중성지방 분석을 위해 분리된 혈장과 함께 -20℃ 냉동고에 보관되었다.

Table 1. Composition of experimental diets.

| Ingredient | Control diet | Cholesterol diet |
|---------------------------|--------------|------------------|
| Casein ^a | 20.0 | 20.0 |
| L-methionine ^a | 0.3 | 0.3 |
| Lard | 9.0 | 9.0 |
| Soy bean oil | 1.0 | 1.0 |
| Choline chloride | 0.2 | 0.2 |
| Vitamin mix ^a | 1.0 | 1.0 |
| Mineral mix ^b | 3.5 | 3.5 |
| Sucrose | 20.0 | 20.0 |
| Corn starch | 45.0 | 44.3 |
| Cholesterol ^c | - | 0.5 |
| Cholic acid ^c | - | 0.2 |
| Total(%) | 100.0 | 100.0 |

^a Teklad, Harlan Madison WI, USA

^b mineral mixture based on AIN 76A

^c Sigma chemical Co, USA

2.2 혈소판 응집성

혈소판응집은 전혈을 이용하여 측정하는 impedance 방법으로, 혈소판의 응집에 따라 형성되는 두 전극간의 저항(ohm)의 증가로 나타난다. Chronolog Aggregometer (Model 500, Havertown PA, USA)를 사용하여 0.25ml 혈액을 생리식염수로 희석하여(1:4) 혈소판이 대략 200,000/ μ l로 조정 후 ADP(2 μ M)을 첨가하여 응집을 유도했고, 3회 반복 측정하여 평균치를 사용하였다.

2.3 혈장지질농도 분석

총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤은 Waco enzymatic kit (Waco Pure Chemical Co. Japan) 으로, 중성지방은 Asan enzymatic kit (Asan Pharm. Co., Korea)로 측정되었다. 각 분석에 혈장 20 μ l 을 사용하였으며, 두 반복으로 진행하였다. LDL-콜레스테롤은 Friedwald식(1980)을 이용하여 구하였다. 분석을 통해 얻은 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤의 차이를 이용하여 계산되었다.

2.4 간의 콜레스테롤과 중성지방 분석

간 시료의 콜레스테롤과 중성지방의 추출은 Folch 등 (1957)의 방법을 수정한 것으로, 간 시료 1g을 6ml chloroform /methanol mixture (2:1, v/v) 와 2ml 증류수를 넣어 5분간 균질화 한 후 2,500×g 에서 원심 분리했다. 윗 층의 물-메탄올 혼합을 따라내고 간 고형물 아래의 콜레스테롤과 중성지방이 함유된 chloroform층을 분리해 낸 후, 500 μ l를 취하여 질소가스로 휘발시켰다. 이를 50 μ l의 Triton X-100/chloroform mixture (1:1, v/v) 와 450 μ l의 chloroform을 넣어 다시 500 μ l로 만든 후 가볍게 흔들어 내용물을 용해시켰다. 이중 20-50 μ l를 취하여 chloroform을 휘발시킨 후 enzymatic kit (Waco Pure Chemical Ind. Ltd, Japan) 사용하여 간의 콜레스테롤을 측정하였다. 간의 중성지방은 원심분리 한 chloroform층 20 μ l를 취하여 휘발시킨 후 100 μ l의 메탄올을 넣고 용해시켜 enzymatic kit (Asan Pharmaceuticals, Korea)을 사용하여 측정하였다.

2.5 간 조직 검사

각 군당 2마리씩의 간을 같은 부위에서 채취하여 건본 2개씩을 만들어 관찰하였다. 간 조직을 10% formalin용액으로 고정하였으며, 탈수과정을 거친 후, paraffin 포매 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 한 후, 광학현미경으로 400 배율에서 관찰하였다.

2.6 통계처리방법

본 실험결과의 분석치는 평균±표준편차로 표시되었고, 실험군의 분석치에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 사용했으며, 분석 결과 P<0.05에서 유의성 있으면 Duncan의 다중검정법을 이용하여 각 실험군 평균치간의 유의적 차이를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 체중증가량, 식이섭취량 및 간/체중 비

고 콜레스테롤 식이에 대한 암·숫쥐의 반응을 비교한

예비실험 결과가 Table 2에 나타나 있고, 본 실험에 있어서 일일 체중증가량 (ADG)을 비롯한 식이섭취량 (ADFI), 식이 효율 (ADG/ADFI ratio), 및 간의 무게비 (liver/body weight ratio)가 Table 3에 나타나 있다.

Table 2. Preliminary study : Effects of cholesterol supplemented diet in intact rats

| | Control | | Cholesterol | |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | male | female | male | female |
| ADG (g/d) | 6.1±0.7 | 3.2±0.5 | 6.1±0.7 | 3.0±0.8 |
| ADFI (g/d) | 19.7±2.5 | 16.5±0.9 | 19.3±2.0 | 16.4±2.0 |
| FER | 0.31±0.03 ^a | 0.19±0.03 ^b | 0.32±0.03 ^a | 0.18±0.03 ^b |
| LW/BW ratio (%) | 2.8±0.2 ^b | 2.6±0.2 ^b | 4.5±0.3 ^a | 4.5±0.3 ^a |
| Hematocrit (%) [*] | 46.9±2.0 ^a | 44.7±1.8 ^a | 45.3±1.8 ^a | 42.1±2.2 ^b |
| Plasma (mg/dl) | | | | |
| Total cholesterol [*] | 158.5±32.2 ^c | 147.3±31.1 ^c | 265.8±76.2 ^b | 519.4±198.3 ^a |
| LDL-cholesterol [*] | 102.5±30.7 ^c | 95.6±30.5 ^c | 225.6±75.8 ^b | 479.7±183.2 ^a |
| HDL-cholesterol [*] | 43.7±12.2 ^a | 42.5±8.5 ^a | 33.6±9.6 ^b | 24.3±7.2 ^c |
| Triglyceride [*] | 61.9±13.4 ^{ab} | 46.1±25.4 ^b | 32.5±11.6 ^{bc} | 77.1±45.7 ^a |
| Liver (mg/g) | | | | |
| Total cholesterol | 9.3±3.3 ^a | 8.4±2.2 ^a | 38.0±11.1 ^b | 54.9±9.1 ^c |
| Triglyceride | 21.5±7.9 | 24.8±8.9 | 26.5±8.6 | 28.6±7.3 |

¹⁾ ADG : Average daily weight gain

²⁾ ADFI : Average daily food intake

³⁾ FER : Food Efficiency Ratio (ADG/ADFI)

⁴⁾ LW/ BW ratio : Liver and final body weight ratio

LDL-cholesterol calculated as follow : LDL-cholesterol = T-cholesterol - (HDL-cholesterol + TG/5)

Values are means ± SD of 9 rats

Values in the same row not sharing the same superscripts differ significantly (P<0.01)

*Values in the same row not sharing the same superscripts differ significantly (P<0.05)

Table 3. Effects of diets and gonadectomy on growth rate and food intake

| | Control | | Control | | Cholesterol | |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Intact | Sham | ODX ¹⁾ | OVX ¹⁾ | ODX | OVX |
| | male | female | male | female | male | female |
| Initial BW(g) | 155.5±20.4 ^a | 125.9±14.1 ^c | 148.7±15.0 ^{ab} | 128.9±8.4 ^c | 137.1±10.2 ^{bc} | 125.6±8.7 ^c |
| Final BW(g) | 355.9±18.4 ^a | 213.5±32.6 ^d | 320.6±34.3 ^{ab} | 283.6±35.4 ^{bc} | 297.3±23.9 ^b | 253.0±25.0 ^c |
| ADG ²⁾ (g/d) | 6.7±0.7 ^a | 2.9±0.9 ^d | 5.7±0.8 ^{ab} | 5.2±1.0 ^{bc} | 5.3±0.6 ^b | 4.3±0.7 ^c |
| ADFI ³⁾ (g/d) | 21.7±1.1 ^a | 15.4±1.8 ^c | 19.5±1.8 ^{ab} | 18.0±2.2 ^b | 17.2±1.7 ^{bc} | 15.7±1.3 ^c |
| FER ⁴⁾ | 0.30±0.03 ^a | 0.18±0.06 ^b | 0.29±0.02 ^a | 0.27±0.05 ^a | 0.31±0.02 ^a | 0.26±0.04 ^a |
| LW/BW ²⁾ ratio(%) | 3.0±0.3 ^b | 2.9±0.3 ^b | 2.8±0.3 ^b | 2.6±0.1 ^b | 4.9±0.6 ^a | 4.7±0.4 ^a |

¹⁾ ODX : Orchidectomized, OVX : Ovariectomized

²⁾ ADG : Average daily weight gain

³⁾ ADFI : Average daily food intake

⁴⁾ FER : Food Efficiency Ratio (ADG/ADFI)

⁵⁾ LW/BW: Liver and final body weight ratio

Values are means ± SD of 9 rats

Values in the same row not sharing the same superscripts differ significantly (P<0.01)

일일증체량 (ADG)과 식이 섭취량 (ADFI)은 모두 같은 처리구의 암·숫쥐를 비교할 때 숫쥐가 암쥐에 비해 높은 경향을 보이고 있는데, 이를 식이 섭취량에 대한 증체량 (FER)으로 비교할 때 intact 숫쥐가 0.30~0.31 인데 비해 sham 암쥐는 0.18~0.19 로서 식이 섭취량에 대한 증체량이 낮아 식이효율 면에서 암쥐가 현저하게 떨어진다(Table 2, 3). 성소 절제에 의한 식이 섭취량의 변화를 비교하면 ODX숫쥐의 경우 약간 감소했으나 OVX 암쥐의 경우 유의적으로 증가했는데 ($P<0.01$), 식이 효율 측면에서는 ODX 숫쥐가 intact 숫쥐에 비해 식이 섭취량과 증체량이 함께 감소하여 전반적으로 변화가 없는 반면, OVX 암쥐의 경우 sham 암쥐와 비교할 때 식이 섭취량의 증가에 비해 체중 증가량이 현저하게 많아 식이 효율 측면에서 숫쥐 수준으로 유의적으로 증가하였음을 알 수 있다($P<0.001$)(Table 3). Intact 암·숫쥐의 경우 콜레스테롤식이 자체가 식이 섭취량이나 증체량에 영향을 미치지 않으나 (Table 2), 성소가 절제된 상태에서 암·숫쥐 모두 식이 섭취량과 증체량이 감소되었는데, 특히 OVX 암쥐의 경우 식이 섭취가 유의적으로 감소되고 ($P<0.01$) 이는 증체량의 감소로 이어지고 있다(Table 3). 간과 체중비 (LW/BW)는 지방간의 형성 정도를 비교하기 위한 것으로 성소 절제한 암·숫쥐에서 유의적이진 않지만 다소 감소하였고 콜레스테롤 식이의 모든 쥐에서 간의 무게비가 증가되어 있는데 이는 지방과 콜레스테롤 축적으로 인한 간의 비대 현상임을 알 수 있다.

성소 절제에 의한 식이 섭취량과 증체율의 변화는 암·수가 다르고 동물의 모델에 따라 매우 다르다. 성소 절제한 암·수 고양이의 경우 intact에 비해 심각한 체중 증가를 보였지만(Fettman MJ 등 1997), 전반적으로 male의 경우 성소절제에 의한 증체량은 변화가 없거나 감소한 반면(Hanke H 등 1996, Thys E 등 1989, Shimizu H 등 1999), 대부분의 OVX female의 경우 hyperphagia와 체중증가를 보였다(Flynn MF 등 1996, Chu SC 등 1999, Chen Y 등 2001). Fettman 등(1997)은 난소 절제에 의한 증체의 원인을 fasting metabolic rate의 감소로 설명하고 있으나, Chu 등(1999)은 leptin에 대한 민감도의 저하로 인한 hyperphagia를 증체의 원인으로, Chen 등(2001)은 leptin의 감소로 인한 fat utilization의 감소와 fat mass의 증가를 원인으로 보고하고 있다. Lee와 Yoon(1989) 또한 난소절제에 의한 체중의 증가는 체 지방의 증가로 보고한 바 있다. 본 실험에서 OVX 암쥐의 경우도 섭취량 증

가에 비해서 증체량이 훨씬 크므로 식이 효율 자체가 증가되어 있음을 고려할 때 hyperphagia 이외에 대사율이나 체지방 이용의 감소가 증체의 원인으로 작용한 것으로 여겨진다. 에스트로젠을 비롯한 gonadal steroids가 직접적으로 식이섭취나 voluntary exercise, thermogenesis에 관여하거나 leptin과의 길항적 관계에서 energy balance나 adiposity를 결정하는 것으로 알려져 있다 (Wade GN 등 1985, Mystkowski P 등 2000).

3.2 혈장 및 간의 콜레스테롤과 중성지방

1) intact 쥐에서의 콜레스테롤 첨가효과

Intact 또는 sham 암·숫쥐에 있어서 기본식이 (control)나 콜레스테롤 첨가식에 의한 혈장과 간의 콜레스테롤 및 중성지방에 대한 암·숫쥐의 비교가 예비실험(Table 2)과 본 실험(Table 4)에 나타나 있다. 기본식으로 사육된 intact 또는 sham 암·수의 비교에서 두 실험 모두 혈장과 간의 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 차이가 없으며, 혈장 HDL-콜레스테롤은 본 실험의 경우, 암쥐가 유의적으로 높다 ($P<0.01$). 콜레스테롤 첨가효과를 비교했을 때, 혈장 총 콜레스테롤은 숫쥐가 1.7배로 증가한데 비해 암쥐는 3.5배의 높은 증가로 식이간 뿐만 아니라 암·수간에도 유의적 차이 ($P<0.05$)를 보였다. LDL-콜레스테롤 역시 총 콜레스테롤의 주 구성 요소로서 같은 추세를 보이고 있다. HDL-콜레스테롤은 콜레스테롤 첨가로 인해 intact 암·숫쥐 모두 감소해서 암쥐의 경우 유의적으로 낮다 ($P<0.01$). 콜레스테롤 첨가로 인한 간의 총 콜레스테롤은 혈중 총 콜레스테롤 보다 더 심각한 증가를 나타냈는데, intact 숫쥐의 경우 4배, intact 암쥐의 경우 6.5배로 증가해 암·수간의 유의적 차이 ($P<0.01$) 나타냈다. 중성지방에 있어서 기본식이의 intact이나 sham 암·수를 비교한 두 실험 모두 유의적이진 않지만 간에서 암쥐가 높고 혈장에서는 숫쥐가 높다. 콜레스테롤 첨가효과를 비교할 때, 간의 중성지방은 암·수 모두 유의성은 없지만 증가한 반면 숫쥐의 혈장 중성지방은 유의적으로 감소했다 ($P<0.01$)(Table 2).

2) 성소 절제된 쥐에서 콜레스테롤 첨가효과

성소절제와 콜레스테롤의 첨가효과를 보기 위한 본 실험의 결과가 (Table 4)에 나타나 있다. 먼저 성소 절제 자체가 콜레스테롤과 중성지방에 미치는 효과를 비교할 때 intact 또는 sham 쥐에 비해 ODX 또는 OVX 쥐의

Table 4. Effects of diets and gonadectomy on plasma and liver cholesterol and triglyceride.

| | Control | | Control | | Cholesterol | |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Intact | Sham | ODX | OVX | ODX | OVX |
| | male | female | male | female | male | female |
| Plasma (mg/dl) | | | | | | |
| Total-cholesterol | 156.1±30.0 ^b | 164.8±34.2 ^{b11} | 175.2±24.7 ^b | 195.7±42.7 ^b | 475.7±92.6 ^a | 491.4±82.9 ^a |
| LDL-cholesterol | 124.9±26.9 ^b | 26.6±31.5 ^b | 141.7±23.9 ^b | 153.7±37.2 ^b | 467.1±92.7 ^a | 479.7±81.2 ^a |
| HDL-cholesterol | 31.3±5.7 ^c | 38.0±7.8 ^b | 33.6±4.0 ^{bc} | 42.0±7.3 ^{ab} | 8.7±0.4 ^d | 11.6±3.7 ^d |
| Triglyceride* | 57.8±18.3 ^a | 54.0±15.8 ^{ab} | 45.9±11.8 ^b | 50.7±9.8 ^{ab} | 38.9±6.9 ^{bc} | 51.6±13.5 ^{ab} |
| Liver (mg/g) | | | | | | |
| Total-cholesterol | 9.2±2.4 ^b | 8.8±3.3 ^b | 10.3±3.5 ^b | 9.6±3.1 ^b | 56.3±9.2 ^a | 54.8±7.5 ^a |
| Triglyceride | 17.7±4.5 ^c | 23.3±7.9 ^{bc} | 20.7±5.3 ^c | 29.5±5.8 ^b | 36.8±2.7 ^a | 38.9±4.8 ^a |

ODX : Orchidectomized, OVX : Ovariectomized

LDL-cholesterol calculated as follow :LDL-cholesterol = T-cholesterol - (HDL-cholesterol + TG/5)

Values are means ± SD of 9 rats

Values in the same row not sharing the same superscripts differ significantly (P<0.01)

*Values in the same row not sharing the same superscripts differ significantly (P<0.05)

혈장 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 뿐만 아니라 간의 총 콜레스테롤도 유의적이진 않지만 증가했다. 성소 절제로 인해 혈장 중성지방은 암·수 모두 감소한 반면 간의 중성지방은 약간 증가했다. 성소 절제된 쥐에서 콜레스테롤 첨가효과를 비교할 때 콜레스테롤 식이의 ODX 숫쥐도 OVX 암쥐수준으로 증가되어 혈장 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤에 있어서 기본식으로 사육된 ODX 숫쥐 또는 OVX 암쥐 비해 현저하게 증가되었다 (P<0.01). HDL-콜레스테롤은 기본식으로 사육된 성소 절제된 쥐에 비해 암·수 모두 25% 수준으로 비슷하게 감소했다. 간의 총 콜레스테롤은 암·수 모두 5배 정도의 높은 증가를 나타냈다. 간의 중성지방은 콜레스테롤 식이의 OVX 암쥐와 ODX 숫쥐 모두 유의적으로 증가했는데 (P<0.01), ODX 숫쥐의 경우 OVX 암쥐보다 그 증가폭이 큰데 비해 혈장 중성지방은 상대적으로 감소했다.

본 연구를 비롯한 여러 연구 결과에서 콜레스테롤이 첨가되지 않은 기본식으로 사육된 intact 암·수 동물의 혈중 콜레스테롤은 사실상 차이가 없으나, 콜레스테롤 첨가 식이에 대한 반응은 동물에 따라 매우 다르다. 200~250mg/2000Cal에 해당하는 0.04-0.05% 콜레스테롤 첨가 식이에 대한 혈중 총콜레스테롤은 hamster 경우 male이

높은 반면(Wilson TA 등 1999), guinea pig 경우 female 이 높는데(Roy S 등 2000), 이러한 female guinea pig의 고콜레스테롤혈증 반응은 콜레스테롤 첨가량이 많을수록 훨씬 높아진다(Fernandez ML 등 1995). Hanke 등(1996)의 연구에서 female rabbit의 고콜레스테롤혈증 반응은 난소 절제에 의해 감소된 반면 숫쥐는 정소절제에 의해 더욱 증가되었는데, Hussein 등(1999)의 연구에서는 콜레스테롤 섭취와는 무관하게 정소절제 자체가 토끼에 있어서 혈중 콜레스테롤과 중성지방을 증가시켰다. 본 연구에서 콜레스테롤식이의 intact 암쥐는 intact 숫쥐의 비해 혈중 콜레스테롤이 유의적으로 증가되었는데 (P<0.05), 암쥐의 이러한 고콜레스테롤혈증 반응이 정소 절제된 숫쥐에게 나타나, OVX숫쥐의 혈중 콜레스테롤이 암쥐수준으로 증가됨은 보고된 결과와 일치한다. Hanke 등(1996) 외에도 식이 콜레스테롤에 대한 OVX female의 혈중 콜레스테롤이 intact에 비해 상대적으로 낮은 연구보고(Roy S 등 2000, Starzec JJ 등 1986)가 있는데, 이것은 본 연구에서 콜레스테롤-free의 intact과 OVX 암쥐를 비교할 때 OVX 암쥐의 혈중 콜레스테롤이 더 높은 것과 차이가 있으나 콜레스테롤 첨가식으로 사육될 때 이러한 결과는 달라질 수 있지 않을까 생각된다. 자연 폐경이나 난소절제술을 받은 경우 같은 연령층의 여성보다 총콜레스테롤

과 LDL-콜레스테롤이 증가된 보고(Kannel WB 등 1976, Fukami K 등 1995, Pasquali R 등 1997)가 많으나 난소 절제나 폐경이 콜레스테롤대사에 미치는 영향에 대해서 명확하게 밝혀진 것은 없다.

고 콜레스테롤식이로 인한 간의 중성지방 축적은 여러 연구에서 나타나 있다(Kushwaha RS 등 1978, Liu CH 등 1995). 이는 간에서 중성지방의 de novo 합성이 증가되거나 합성된 중성지방이 혈장으로 분비되지 않기 때문에 나타난 지방간 형태로서 대부분의 경우 혈장 중성지방 수준은 정상보다 낮다. 본 연구에서 암쥐는 간에서의 높은 중성지방 함량과 함께 혈장 수준도 정상쥐나 그 이상의 수준으로 증가되어 있는데, 혈장의 중성지방에 있어서 이러한 암·수 차이는 간의 지방대사에 있어서 암·수간의 차이를 나타내는 것으로 각종 관련질환의 이환율에 있어서 남·녀의 차이를 나타내는 요인으로 작용하지 않나 생각된다.

3.3 Hematocrit 수치와 혈소판 응집

예비실험 (Table 2)에서 콜레스테롤식이의 암·수 모두 hematocrit 수치가 감소되어 암쥐의 경우 다른 비교군보다 유의적으로 낮았다 ($P<0.05$). 본 실험 (Table 5)에서 hematocrit 수치는 우선 암쥐의 경우 OVX 쥐가 intact 쥐보다 상당히 증가되어 있는데 비해 콜레스테롤 식이의 OVX쥐는 감소되어 두군 간에 유의성을 보였다 ($P<0.05$). 숫쥐의 경우 성소 절제에 의한 차이가 없으나 콜레스테롤식이의 ODX 쥐는 약간 감소했다. 본 연구에서 예비실험이나 본 실험에서 콜레스테롤식이로 인해

hematocrit이 다소 감소하는 경향을 보였는데 이에 대한 조사된 문헌은 없다. 또한 폐경 이후에 헤모글로빈 수치의 급격한 증가는 보고된 바 있으나(Kannel WB 등 1976) 난소절제나 폐경이후의 hematocrit 변화에 대한 보고는 없다. 혈소판 응집성에 있어서 암·수를 비교해 볼 때 sham 암쥐가 intact 숫쥐에 비해 유의적으로 낮으나 ($P<0.05$) 이러한 차이는 성소절제에 의해 없어진다. 콜레스테롤식이에 의해 최대응집치에 있어 암·수 모두 상당히 증가되었다 (Table 5). Torres Duarte 등(1989)에 의하면 male mouse의 경우 female에 비해 ADP와 아라키돈산에 의한 혈소판 응집성이 훨씬 높았다. Winocour 등(Winocour PD 등 1989)에 의하면 콜레스테롤식이로 인한 고콜레스테롤혈증의 쥐에서 혈소판 응집성은 증가되거나 platelet survival은 감소했다. Platelet survival은 최대응집 이후 응집된 혈소판이 개체의 혈소판으로 분리됨으로 해석할 수 있는데 이는 혈전이나 thrombus 생성 정도와 관련이 있다. 본 연구를 비롯한 Kang 등(2001)의 연구에서 콜레스테롤식이로 인한 고콜레스테롤혈증 상태의 HDL-콜레스테롤은 상대적으로 감소되는데, Naqvi 등(1999)에 의하면 HDL-콜레스테롤 자체가 혈소판 응집성에 독립적인 상관지표로 작용했다.

3.4 간조직 검사

육안으로 관찰된 간은 sham 또는 intact 암·수나 성소 절제된 암·수 모두 기본식이로 사육되는 경우 건강하게 보여 사실상 차이가 없었으나 콜레스테롤식이의 intact 암·수나 본 실험의 OVX 암쥐와 ODX 숫쥐 모두

Table 5. Effects of diets and gonadectomy on hematocrit and platelet aggregation

| | Control | | Control | | Cholesterol | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Intact | Sham | ODX | OVX | ODX | OVX |
| | male | female | male | female | male | female |
| Hematocrit(%) | 46.0 ± 2.8 ^{ab} | 46.5 ± 3.8 ^{ab} | 46.5 ± 1.2 ^{ab} | 49.0 ± 2.4 ^a | 44.1 ± 3.7 ^b | 44.5 ± 2.9 ^b |
| Aggregation | | | | | | |
| Maximum(Ω) ¹⁾ | 18.2 ± 2.7 ^a | 13.9 ± 3.3 ^b | 16.8 ± 2.4 ^{ab} | 15.7 ± 3.0 ^{ab} | 18.6 ± 3.1 ^a | 18.1 ± 4.5 ^a |
| Initial slope(Ω /min) ²⁾ | 16.2 ± 2.4 ^{ab} | 13.3 ± 3.5 ^b | 15.4 ± 2.8 ^{ab} | 14.6 ± 2.5 ^{ab} | 17.6 ± 2.1 ^a | 15.6 ± 3.8 ^{ab} |

ODX : Orchidectomized, OVX : Ovariectomized

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

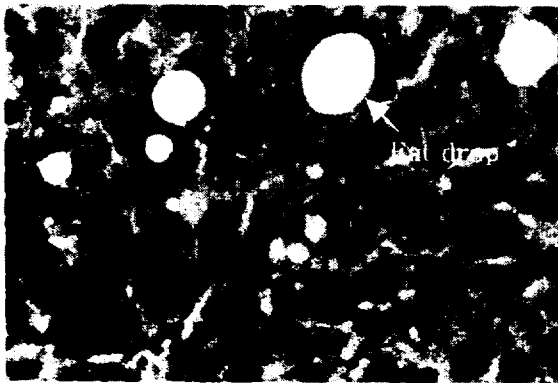
²⁾ Initial slope is ohm change for the first one minute

Values are means ± SD of 9 rats

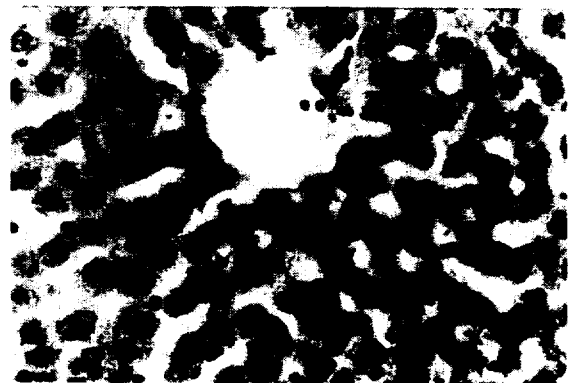
Values in the same row not sharing the same superscripts differ significantly ($P<0.05$)

간엽 마다 부어 있고 간의 비대 (hypertropic)와 저색소 (hypochromic) 현상을 나타냈다. Figure 1의 간 조직의 사진은 각 군당 2 마리의 간 sample로부터 4전본을 만들어 광학 현미경을 통해 관찰한 소견을 근거로 나타낸 것인데, 기본식이의 경우 intact 숫쥐에서만 약간의 지방구가 발견된 데 비해, 콜레스테롤식이의 OVX암쥐와 ODX 숫쥐는 상당량과 크기의 지방구(fat drop)가 발견되었다.

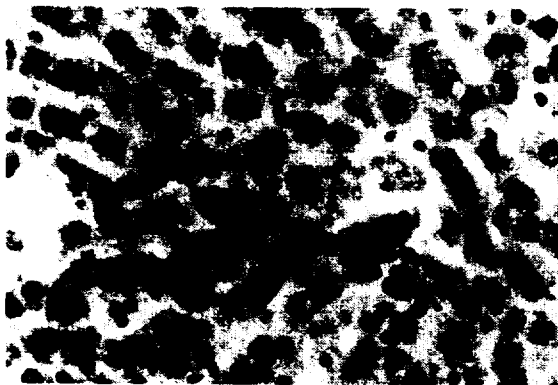
이렇게 콜레스테롤식이에 의한 지방구의 형성이나 간의 비대현상은 기본식이의 쥐에 비해 높은 간/체중비나 간에서의 높은 중성지방과 콜레스테롤수준과 좋은 상관관계를 나타내고 있다. 기본식이의 sham 이나 intact 암·수 또는 성소 절제된 암·수를 비교할 때, 간의 중성지방이 가장 낮은 intact 숫쥐에서 지방구가 나타난 것은 해석하기 어려울 뿐만 아니라, 지방구의 형성에 있어 암·



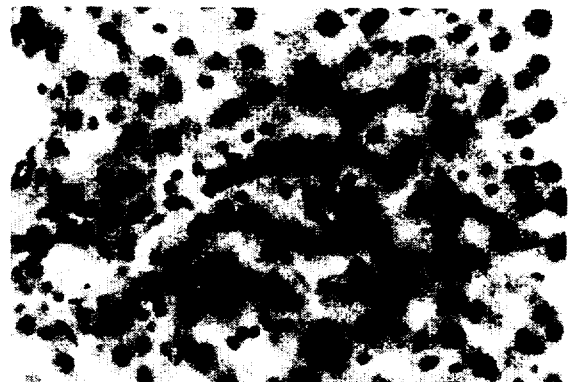
(a) Intact-control(♂)



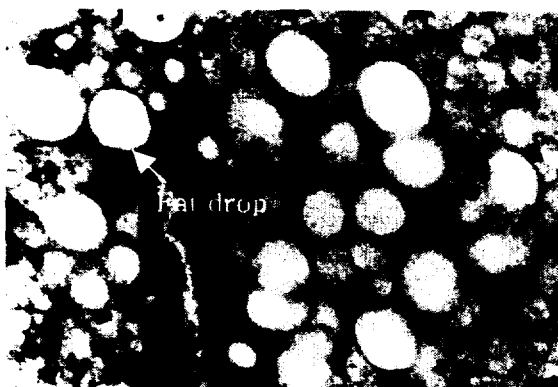
(b) Sham-control(♀)



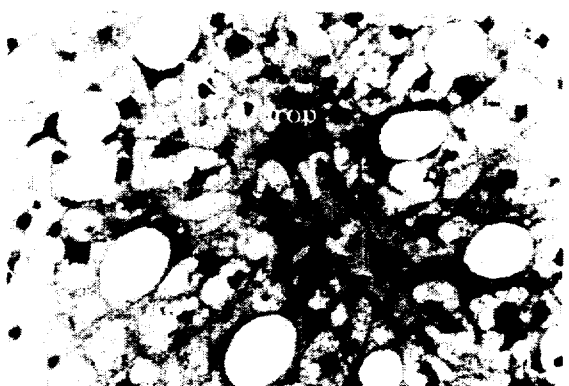
(c) ODX-control(♂)



(d) OVX-control(♀)



(e) ODX-cholesterol(♂)



(f) OVX-cholesterol(♀)

Figure 1. Microscopic appearance of liver tissue. (×400)

수차이나 성소절제에 의한 효과를 단정하기에는 sample 수가 충분하지 않다. 또한 단시간에 효과를 볼 수 있는 식이적인 요인과는 달리, gonadal 효과를 보기에는 10주령의 쥐가 어리고 성소절제후의 실험기간이 짧지 않나 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서 기본식이의 암·숫쥐는 혈중 콜레스테롤이나 중성지방에 있어서 차이가 없었으나, 2000-2500mg/2000kcal 정도에 해당하는 0.5% 콜레스테롤 식이에 대해 암쥐가 숫쥐에 비해 간과 혈중 콜레스테롤에 있어 높은 반응을 나타냈는데 이러한 암쥐의 고콜레스테롤혈증 반응이 난소절제로 인해 다소 감소된 것은 폐경이나 난소 절제후 혈중 콜레스테롤과 중성지방이 증가한다는 역학조사나 임상연구의 보고 내용과는 다르다. Intact숫쥐는 암쥐에 비해 콜레스테롤식이에 대한 반응이 비교적 안정적이었는데 정소절제로 인해 암쥐와 같은 수준의 고콜레스테롤혈증 반응을 보인 점은 사람과 다소 차이가 있다. 혈중 콜레스테롤이나 중성지방, 기타 심장순환기질환 관련 요인에 있어서 남성의 경우 여성에 비해 나이가 들수록 gonadal steroids의 영향을 덜 받는 것으로 알려져 있다. 동물을 모델로 한 식이 콜레스테롤이 체 콜레스테롤에 미치는 효과는 같은 rodent에서도 hamster와 guinea pig이 다를 뿐 아니라 식이 콜레스테롤의 함량에 따라 암·수의 반응이 다르게 보고되고 있다. Gonadal steroids는 콜레스테롤과 마찬가지로 sterol 구조로서 콜레스테롤 대사에 상당한 영향을 미치고 이러한 콜레스테롤-steroid hormone의 상호 작용과 조절 체계의 복잡함을 감안한다면 동물실험을 통해 사람과 비교하여 해석하기는 어렵다.

성소 절제에 의한 체중의 증가나 식이효율 측면에서의 반응은 종(species)에 따라 다른데 본 실험에서 난소 절제된 암쥐는 높은 증체율과 함께 높은 식이효율을 나타냈다. 식이효율의 증가는 섭취량 증가에 비해서 증체량이 훨씬 큰 것으로 대사량의 감소나 체지방 이용의 감소 등을 이유로 생각할 수 있는데, 이렇게 난소절제로 인한 암쥐의 증체율이 식이효율 측면에서 숫쥐 수준으로 향상되었다고 해석할 수 있으나 증체된 부분이 fat mass 라면 축산 분야에서도 그렇게 바람직하지는 않을 뿐만

아니라 난소절제 수술을 받거나 폐경 이후 여성의 비만을 생각할 때 심각한 문제이다. 동물을 모델로 한 본 연구 결과를 사람과 직접연결시켜 해석하기 어렵고, 보다 정확한 결론을 얻기 위해 많은 임상연구가 필요하리라 생각된다.

5. References

- Beitz DC, Knight TJ. Fats and cholesterol, role in human nutrition. *Encyclopedia of Agricultural Sci* 2:139-153, 1994
- Ericsson S, Berglund L, Frostegard J, Angelin B. The influence of age on low density lipoprotein metabolism: effects of cholestyramine treatment in young and old healthy male subject. *J Intern Med* 242(4):329-337, 1997
- Bonora E, Targher G, Branzi P, Zenere M, Cigolini M. Cardiovascular risk profile in 38-year and 18-year old men. Contribution of body fat content and regional fat distribution. *Int J Obes Relat Met Disord* 20(1):28-36, 1996
- Weggemans RM, Zock PL, Urgert R, Katan MB. Differences between men and women in the response of serum cholesterol to dietary changes. *Eur J Clin Invest* 29(10):827-834, 1999
- Kovar J, Poledne R. Sex differences in response of postprandial lipemia to change from a low fat low-cholesterol diet to a high-fat high cholesterol diet. *Physiol Res* 49(2):233-239, 2000
- McNamara DJ. Cholesterol intake and plasma cholesterol: an update. *J. Am Coll Nutr* 16(6):530-534, 1997
- Castelli WP, Anderson K. A population at risk. Prevalence of high cholesterol levels in hypertensive patients in the Framingham study. *Am J Med* 14:80(2A):23-32, 1986
- Kannel WB. Range of serum cholesterol values in the population developing coronary artery disease. *Am J Cardiol* 28:76(9):69C-77C, 1995
- Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the

- Framingham study. *JAMA* 24:257(16):2176-80, 1987
- Capurso A. Lipid metabolism and cardiovascular risk: should hypercholesterolemia be treated in the elderly? *J Hypertens* 10(2):S65-68, 1992
- Kronmal RA, Cain KC, YE Z, Omenn GS. Total serum cholesterol levels and mortality risk as a function of age. A report based on the Framingham data. *Arch Intern Med* 10:153(9): 1065-1073, 1993
- Kauma H, Savolainen MJ, Heikkila R, Reunanen A. sex difference in the regulation of plasma high density lipoprotein cholesterol by genetic and environmental factors. *Human Genetic* 97:156-162, 1996
- Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM, Castelli WP, Wilson PW. Factor associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-1 levels in the Framingham offspring study. *J Lipid Res* 35(5):871-882, 1994
- Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 85(4):447-452, 1976
- Fukami K., Koike K, Hirota K, Yoshikawa H, Miyake A. Perimenopausal changes in serum lipids and lipoproteins: a 7-year longitudinal study. *Maturitas* 22(3):193-197, 1995
- Pasquali R, Casimirri. F, Pascal G, Vincennati V, Gaddi A. Influence of menopause on blood cholesterol levels in women: the role of body composition, fat distribution and hormonal milieu. *J Internal Med* 241(3):195-203, 1997
- Hanke H, Hanke S, Finking G, Muhic-Lohrer A, Hombach V. Different effects of estrogen and progesterone on experimental atherosclerosis in female versus male rabbits. *Circulation* 94:175-181, 1996
- Wilson TA, Nicolosi RJ, Lawton CW, Babiak J. Gender differences in response to a hypercholesterolemic diet in hamsters: effects on plasma lipoprotein cholesterol concentrations and early aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 146:83-91, 1999
- Fernandez ML, Wilson TA, Conde K, Vergara-Jimenez M, Nicolosi RJ. Hamster and guinea pigs in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber or cholesterol content. *J Nutrition* 129:1323-1332, 1999
- Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol distribution: The lipid research clinics program prevalence study. *Circulation* 61:302-315, 1980
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957
- Fettman MJ, Stanton CA, Banks LL, Hamar DW, Hagstad RL, Johnston S. Effects of neutering on body weight, metabolic rate and glucose tolerance of domestic cats. *Res Vet Sci* 62(2):131-136, 1997
- Thys E, Hardouin J, Verhulst A. Influence of partial and total castration on the growth and feed conversion performances of Poulfouli rams of the Far North Cameroon. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 42(2):267-274, 1989
- Shimizu H, Ohtani KI, Uehara Y, Takahashi H, Tsuchiya T, Mori M. Orchidectomy and response to testosterone in the development obesity in young OLETF rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(5pt2):R1366-1373, 1999
- Flynn MF, Hardie EM, Armstron PJ. Effect of ovariectomy on maintenance energy requirement in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1:209(9):1572-1581, 1996
- Chu SC, Chou YC, Liu JY, Shyu JC, Chou FP. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 64(24):2299-2306, 1999
- Chen Y, Heiman ML. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(2):E315-E322, 2001

- Lee SS, Yoon JH. Long-term effect of ovariectomy on body composition. *Korean J Nutrition* 22(2):102-107, 1989
- Wade GN, Gray JM, Bartness TJ. Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes* 9(suppl 1):83-92, 1985
- Mystkowski P, Schwartz MW. Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era. *Nutrition* 16(10):937-946, 2000
- Roy S, Vega-Lopez S, Fernandez ML. Gender and hormonal status affects the hyperlipidemic mechanisms of dietary soluble fiber in guinea pigs. *J Nutrition* 130:600-607, 2000
- Fernandez ML, Vergara-Jimenez M, Erickson SK, McNamara DJ. Gender differences in response to dietary soluble fiber in guinea pig: effects of pectin, guar gum and psyllium. *J Lipid Res* 36(10):2191-202, 1995
- Hussein SA, Azab ME, Abdel-Maksoud H. Metabolic changes concerning the effect of castration on some blood constituents in male rabbits. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* 106(3):113-118, 1999
- Starzec JJ, Berger DF. Effects of stress and ovariectomy on the plasma cholesterol, serum triglyceride and aortic cholesterol levels of female rats. *Physiol Behav* 37(1):99-104, 1986
- Kushwaha RS, Hazzard WR, Harker LA, Engblom J. Lipoprotein metabolism in baboons: Effect of feeding cholesterol rich diet. *Atherosclerosis* 31:65-76, 1978
- Liu CH, Huang MT, Huang PC. Source of triacylglycerol accumulation in livers of rats fed a cholesterol-supplemented diet. *Lipids* 30:527-531, 1995
- Torres Duarte AP, Ramwell P, Myers A. Sex differences in mouse platelet aggregation. *Thromb Res* 1:43(1):33-39, 1986
- Winocour PD, Rand ML, Richardson M, Mustard JF. Platelet function and survival in rats with genetically determined hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 76(1):63-70, 1989
- Kang MS, Kang JS. Hypocholesterolemic effect of tangerine pulp, sea tangle or prickly pear cactus on lipid level, intestinal cholesterol absorption, platelet aggregation and liver tissue in hypercholesterolemic rats. *Korean J Nutrition* 34(2):141-149, 2001
- Naqvi TZ, Shan PK, Ivey PA, Molloy MD, Ahmed A, Kaul S. Evidence that high density lipoprotein cholesterol independent predictor of acute platelet dependent thrombus formation. *Am J Cardiol* 1:84(9):1011-1017, 1999