

n-6/n-3 지방산 비율이 차세대 랫드의 지질대사 분할에 미치는 영향

박병성[†]

강원대학교 동물생명과학대학
(2017년 10월 8일 접수: 2017년 10월 30일 수정: 2017년 11월 10일 채택)

Effect of n-6/n-3 fatty acid ratio on hepatic glycerolipid partitioning in second generation rats

Byung-Sung Park[†]

College of Animal Life Science, Kangwon National University,
Chuncheon, Gangwondo, 200-701 Republic of Korea
(Received October 8, 2017; Revised October 30, 2017; Accepted November 10, 2017)

요약 : 본 연구는 차세대 랫드에서 오메가 6(n-6)와 오메가 3(n-3) 지방산 비율이 서로 다른 식이 (0, 1.2:1, 8:1, 19:1)의 섭취가 간에서 새롭게 합성·분비되는 glycerolipid의 대사적 분할에 관한 메커니즘을 구명하였다. 그 방법으로써 경정맥 캐놀라를 부착한 랫드에서 생체모니터링 기법을 이용하였다. glycerolipid 대사에 의한 산화로써 나타난 ¹⁴CO₂ 배출율 범위는 8:1 이하 그룹에서 7.05-20.17%로 나타났다으며 대조구에서 가장 낮았다(p<0.05). 총 glycerolipid는 대조구가 가장 높았으며 19:1, 8:1, 1.2:1 그룹의 순서로 높았다(p<0.05). 중성지방 분비량은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 각각 36.35, 20.93, 13.72% 감소하였다(p<0.05). 총 glycerolipid에 대한 인지질의 분할 비율은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 각각 1.38, 1.29, 1.17배 높았다(p<0.05). 총 glycerolipid에 대한 ¹⁴CO₂ 생성비율은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 각각 1.61, 1.52, 1.29배 높았다(p<0.05).

주제어 : 오메가 6/오메가 3, 차세대 랫드, 경정맥, 캐놀라, 지질

Abstract : The objective of this study was to investigate the effect of diets with different omega-6 (n-6) and omega-3 (n-3) fatty acid ratios (0, 1.2: 1, 8: 1, 19: 1) on mechanisms of partitioning of *in vivo* hepatic glycerolipid metabolism in next generation rats. Biomonitoring techniques were used in rats (jugular vein cannula were attached). The range of ¹⁴CO₂ exhaled by glycerolipid metabolism was 7.05-20.17% in the group having diet with n-6/n-3 ratio less than 8:1. It was the lowest in the control group. Total glycerolipid was the highest in the control

[†]Corresponding author
(E-mail: bspark@kangwon.ac.kr)

group. For groups with different n-6/n-3 ratio, it had the following order: 19:1>8:1>1.2:1. Secreted triglyceride was decreased by 36.35%, 20.93%, and 13.72% in 1.2:1, 8:1, and 19:1 groups, respectively, compared to that in the control group. The ratio of phospholipid to total glycerolipid was 1.38, 1.29, and 1.17 times higher in 1.2:1, 8:1, and 19:1 groups, respectively, compared to that in the control group. The ratio of $^{14}\text{CO}_2$ to total glycerolipid was 1.61, 1.52, and 1.29 times higher in 1.2:1, 8:1, and 19:1 groups, respectively, compared to that in the control group.

Keywords : Omega 6 to omega 3, second generation rat, jugular vein, cannula, lipid

1. 서론

오메가-6(n-6)와 오메가-3(n-3) 불포화지방산은 인간과 기타 포유동물에서 n-3 탈포화를 위한 내재성 효소가 없기 때문에 생체 내 합성이 어려운 필수지방산으로서 식이로부터 공급되어야 한다 [1,2]. 서양인의 식품에는 높은 수준의 n-6가 포함되어 있지만 n-3는 매우 낮기 때문에 n-6/n-3 비율이 20:1로써 건강에 해로운 것으로 알려졌다. 건강을 위하여 n-6/n-3 비율을 낮추는 것이 고려되어야 하며 바람직한 n-6/n-3 비율은 4:1 이하로 알려지고 있다 [3-6]. n-6/n-3의 불균형 한 비율은 n-6에 유리하게 작용하여 혈전 형성 및 염증 반응을 높이기 때문에 죽상동맥경화증, 비만 및 당뇨병의 발병을 초래할 수 있다 [1,7]. 식이 내 n-6/n-3 지방산의 비율을 낮추면 치명적인 심혈관계 질환의 위험이 감소한다 [2,3,8].

n-6/n-3 지방산 비율이 출생한 어린이 성장과 체조성에 영향을 미친다는 연구결과가 보고되었다 [9]. 2016년 n-6/n-3 비율과 우울증 사이의 관련에 관한 리뷰가 있었다. 우울증과 관련하여 염증성 사이토카인의 생성 증가 메커니즘을 제시하였으며 세포막의 n-6/n-3 비율 증가는 우울증을 높여주지만 n-6/n-3 비율 감소는 이를 예방하는데 도움이 될 것으로 검토하였다 [10]. 식이의 지방은 차세대 랫드에서 지질대사에 적응을 촉진할 수 있으며 [11,12], 부모 세대로부터 차세대 랫드에 이르기까지 n-6/n-3 비율이 8:1 이하로 낮아진 식이를 섭취하면 영양소 대사작용 활성화 메커니즘에 의한 혈액 중 유해지질 감소, 간 기능 유지 및 성장을 자극하는 것으로 보고되었다 [13].

생체모니터링 기법을 이용하면 간에서 새롭게 합성, 분비되는 glycerolipid의 대사적 분할기작을 명확하게 구명할 수 있다 [14,15]. 랫드에서 지질 대사의 분할 메커니즘을 구명하는데 있어서 간에서 분비되는 콜레스테롤 대사와 중성지방 및 인지질 생합성, 분비와 관련한 glycerolipid의 대사적 분할에 관한 생체모니터링은 매우 중요하다 [16,17]. 선행연구에서 서로 다른 지방을 함유하는 식이를 섭취한 랫드에서 지질대사의 생체모니터링 결과, 랫드의 간에서 산화 또는 glycerolipid 합성을 위한 지방산 활용에 포함된 3개의 분지에서 acyl moieties 유입, 분할의 정량화는 어유를 섭취한 처리구가 삼겹살기름, 옥수수기름 및 홍화씨기름에 비교하여 인지질 합성 쪽으로 분할비율을 높여서 혈액 내 중성지방과 콜레스테롤을 낮추어 뇌혈관 및 심장혈관질환의 위험을 낮출 수 있음을 보고하였다 [18]. 소화관에서 chylomicron의 분비로 인한 혈장 중 트리글리세라이드가 풍부한 지단백질 입자와 그 잔여물의 식후 축적은 지단백질 리파아제 작용에 대해 경쟁하기 때문에 간에서 초저밀도지단백질-트리아실글리세롤 (very low density lipoprotein-triacylglycerol, VLDL-TAG)을 계속 분비함으로써 건강이 더욱 악화될 수 있다 [14]. 그러나 식이 내 n-6/n-3 비율과 관련하여 차세대 랫드에서 진행된 직접적인 새로운 결과는 보고되지 않았다.

본 연구의 목적은 n-6/n-3 지방산 비율이 서로 다른 식이의 섭취가 랫드의 간에서 새롭게 합성분비되는 glycerolipid의 대사적 분할에 관한 메커니즘을 규명하는 것이었고 그 방법으로써 경정맥 캐놀라를 부착한 랫드에서 생체모니터링 기법을 이용하였다.

2. 실험

2.1. 실험설계

본 연구는 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 2016-0017)을 얻어서 진행하였다. Sprague-Dawley 계통 랫드 암수(평균 체중, 암컷 318 g, 수컷 236 g) 각각 12마리씩을 대한바이오텍(주)로부터 구입하여 4처리구 3반복(반복 케이지 당 3마리씩)으로 완전임의 배치하였다. n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험사료를 처리구별로 30일 동안 각각 급여하였다. 동일한 실험사료를 섭취한 암수끼리 교미하여 임신기간을 거치고 분만, 이유, 성장(평균 체중 313 g) 기간까지 동일한 실험사료를 급여하였다. 실험 처리구는 대조군(n-6/n-3 비율이 없음)과 3개의 처리군(n-6/n-3 수준 1.2:1, 8:1, 19:1)으로 구분하였다. 흰쥐는 평판 플라스틱 케이지 내에서 사육하였으며 사육실의 온도와 습도는 각각 20°C와 50%를 유지하였고 12시간(08:00-20:00) 점등을 실시하였다. 물과 실험사료를 자유섭취도록 하였다. n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험사료를 섭취한 차세대 랫드(부모 시기부터 동일한 실험사료를 섭취 후 출생, 이유, 성장한 차세대 랫 총 24 마리, 처리구 당 6마리씩 완전임의배치)에서 생화학적 지질대사에 관한 분할 메카니즘을 규명하였다.

2.2. 실험사료

실험사료는 미국영양연구소에서 제시된 실험동물 랫드의 영양소요구량 [19] 수준을 충족 또는 초과할 수 있도록 조절된 정제고형사료를 배합하였다(Table 1). 사료 내 n-6/n-3 비율은 대조군의 경우 코코넛유 7.0%를 첨가하였으며, n-6/n-3 수준은 1.2:1(아마씨유 3.50+옥수수유 3.50%), 8:1(아마씨유 0.46+옥수수유 6.54%), 19:1(대두유 1.68+옥수수유 5.32%)로 각각 조절하였다. 실험사료를 제조한 후 펠렛 가공하였고 20°C 송풍건조기에서 수분 함량이 10% 될 때까지 건조하였으며 저온실에서 보관하면서 실험동물에게 급여해 주었다. 지방 급원의 지방산 조성은 Table 2에 제시하였으며 사료 지방산 조성은 Table 3과 같다. n-3 지방산은 코코넛유 0%, 아마씨유 52.08%, 옥수수유 0.40%, 대두유 6.80%로 나타났으며 n-6 지방산은 각각 1.03, 16.96, 49.08, 51.19%로써 코코넛유는 93.12%가 포화지방산으로 구성되었음을 확인하였다.

Table 1. Composition of basal purified pellet diet

Ingredients	Amounts (%)
Corn starch	39.75
Casein	20.00
Sucrose	10.00
Dextrose	13.20
Fat	7.00
α -Cellulose	5.00
Mineral mix ¹⁾	3.50
Vitamin mix ²⁾	1.00
L-cystine	0.30
Choline bitartrate	0.25
Tert-butylhydroquinone	
Total	100

¹⁾AIN'93-mineral mixture(mg/kg) : calcium 5,000; phosphorus 1,561; potassium 3,600; sulfur 300; sodium 1,019; chloride 1,571; magnesium 507; iron; 35; zinc 30; manganese 10; copper 6; iodine 0.2; molybdenum 0.15; selenium 0.15.

²⁾AIN '93-vitamin mixture(u/kg) : nicotinic acid 30 mg; pantothenate 15 mg; pyridoxine 6 mg; thiamin 5 mg; riboflavin 6 mg; folic acid 2 mg; vitamin K 750 ug; D-biotin 200 ug; vitamin B₁₂ 25 ug; vitamin A 4,000 IU; vitamin D₃ 1,000 IU; vitamin E 75 IU.

2.3. 생체모니터링

차세대 랫드에서 사양실험이 종료된 후 각 처리구별로 3마리씩 선정, 완전임의배치(총 12마리: 4처리구, 처리구 당 3반복)하여 경정맥 캐놀라를 설치한 후 지질대사 분할에 관한 생체 모니터링 기법을 이용하였다 [15, 20].

지질단백질 공여 동물 : 체중 460g의 Sprague-Dawley 계통 수컷 쥐를 (주)대한바이오텍으로부터 구입하여 간에서 새롭게 합성된 VLDL-TAG의 분비를 가속화하기 위하여 혈액 채취 48시간 전에 10% fructose 용액을 음수로써 공급하였다. 48시간 후 지질단백질 공여동물을 희생하여 복대동맥으로부터 혈액 10 mL를 채취하여 혈장을 분리한 다음 지질단백질 동위원소 라벨에 사용하였다.

Table 2. Fatty acids composition of oils (%)

Fatty acids	Coconut oil	Linseed oil	Corn oil	Soybean oil
Octanoic acid	8.46	–	–	–
Decanoic acid	7.06	–	–	–
Lauric acid	46.04	–	–	–
Myristic acid	18.53	–	–	–
Palmitic acid	9.18	5.22	12.56	11.76
Palmitoleic acid	–	–	–	0.12
Stearic acid	3.86	3.86	2.65	5.43
Oleic acid	5.85	21.88	34.00	24.08
Linoleic acid	1.03	16.96	49.08	51.19
Arachdic acid	–	–	0.69	–
Linolenic acid	–	52.08	0.40	6.80
Behenic acid	–	–	0.26	0.62
Erucic acid	–	–	–	–
Lignoceric acid	–	–	0.36	–
Total	100	100	100	100
SFA	93.12	9.08	16.52	17.81
UFA	6.88	90.92	83.48	82.19
n-6/n-3	–	0.33	121.45	7.53
UFA/SFA	0.07	10.01	5.05	4.61

–: not detected, SFA: saturated fatty acids, UFA: unsaturated fatty acids

Table 3. Fatty acids composition of experimental diet¹⁾ (%)

Fatty acids	n-6/n-3 ratio			
	0	1,2:1	8:1	19:1
Octanoic acid	5.92	0.15	0.13	0.17
Decanoic acid	6.01	0.09	0.04	0.06
Lauric acid	42.56	0.63	0.17	0.28
Myristic acid	18.28	0.33	0.15	0.22
Palmitic acid	10.49	8.90	12.01	12.46
Palmitoleic acid	0.35	0.16	0.18	0.16
Stearic acid	4.31	3.62	2.92	3.41
Oleic acid	8.19	26.95	32.11	31.84
Linoleic acid	3.72	31.55	45.32	47.69
Arachdic acid	0.15	0.39	0.90	0.74
Linolenic acid	–	26.99	5.70	2.55
Behenic acid	–	0.08	0.24	0.35
Erucic acid	–	0.04	–	–
Lignoceric acid	–	0.12	0.12	0.07
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
SFA	87.73	14.31	16.69	17.75
UFA	12.27	85.69	83.31	82.25
n-6/n-3	–	1.17	7.95	18.69
UFA/SFA	0.14	5.99	4.99	4.63

생체 캐놀레이션 : 저자가 취득한 유럽 실험동물 취급면허(영국 특허장법인, SCT-W94058)에 의하여 생체 캐놀레이션을 실시하였다. 케타민(50 mg/mL)과 럼폰 혼합액(3:1)을 흰쥐 체중 100 g 당 0.15 mL 복강주사하여 마취시키고 항생제 0.4 mL (amoxycillin 0.6 g을 citric saline 2 mL 에 용해)를 복강주사하였다. 오른쪽 경정맥을 노출시켜 소독된 폴리에틸렌 캐놀라(ID 0.63 mm, OD 1.19 mm; Silastic tubing, VWR-Dow Corning No. 508-003, Midland, ML, USA)를 주입시켰다. 수술부위에 acramide를 뿌려주어 껴 맨 다음 카테타 주사기를 이용하여 캐놀라를 머리 쪽으로 이동시켜 완전히 껴냈다. citric saline 0.3 mL를 1일 3회 캐놀라 속으로 주입하여서 혈액의 흐름을 확인하고 5일간의 회복기를 두었다 [20].

혈액으로부터 지질단백질 분리 : 공여동물로부터 얻어진 혈액의 초저밀도 지질단백질의 잔유물(very low density lipoprotein, VLDL remnants) 분해를 가속화하기 위하여 헤파린을 첨가 후 반응시약과 함께 37°C에서 30분간 배양하였다. 5,000 xg에서 15분간 원심분리한 혈장을 분리하고 다시 VLDL remnants 분리가 가능한 혈장의 밀도($d=1,017$ g/mL)를 유지해 주기 위해서 NaCl/KBr ($d=1,346$ g/mL)용액을 혈장과 동일한 량을 시험관 기벽을 통하여 서서히 주입한 다음, VLDL remnants 분리를 위하여 12°C가 유지되는 Sorvall centrifuge (RC 6 Plus, Thermo Fisher Scientific Inc, UK)에서 29,000 xg로 20시간 동안 진공고속원심분리 하였다.

지질단백질의 동위원소 라벨링 : 20시간 원심분리가 끝난 후 약 2 mL정도의 VLDL remnants 함유물질을 분리하여 size-exclusion chromatography (Sephadex G25)를 통과시켜서 KBr을 제거한 다음 분획을 모아서 VLDL remnants를 분리하고 lipopolysaccharide (LPS)를 조제하였다. 한 개의 Quick fit small tube에 [3 H]cholesteryl oleoyl ether 9 μ L와 cholesteryl[14 C]oleate 7.5 μ L를 취하여 질소가스 하에서 건조시키고, 다시 여기에 acetone 약 1 mL를 첨가한 다음 아주 서서히 혼합하였다. 사용할 [3 H]와 [14 C]의 Radiochemicals은 영국의 Amersham International (Amersham, Bucks., U.K.)으로부터 구입하였다. 앞의 시험관에 CETP

(cholesterol ester transfer protein) 1.5 mL를 넣고 혼합한 후 질소가스를 이용하여 15분간 기포화 혼합하였다. 이렇게 하여 조제된 LPS 3.6 mL에 반응시약을 각각 첨가하고 이것을 다시 CETP-isotope 혼합물을 만든 후 15분간 질소가스 하에서 기포화 혼합된 튜브에 넣었다. 37°C로 유지되는 가열시스템 (DB-3, technique, UK)에서 3시간 배양하여 지질단백질을 표식한 후 배양서 3시간 배양하여 지질단백질을 표식한 후 배양이 끝나면 재차 NaCl/KBr ($b=1.346$ g/mL)용액을 시험관 상부기벽을 통하여 서서히 주입, 앞의 과정을 반복함으로써 VLDL remnants를 분리하고 VLDL remnants로부터 최종적으로 분리하여 조제된 LPS를 사용직전에 0.45 μ m filter pore size를 통과하여 여과시켰다.

2.4. 생체주입 및 호흡대사 시험

상기 제조하여 동위원소가 표지된 VLDL remnants를 Scintillation counter (Packard 1600TR, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)에서 측정된 후 동물에게 주입할 양을 [14 C] 300,000 dpm, [3 H] 300,000 dpm으로 조절하였다. VLDL remnants를 60분 동안 경정맥 캐놀라를 통하여 주입한 다음 공기 (air 5/min rate)가 공급되는 호흡챔버(desiccator chamber: pump by Masterflex model 7524-50; Cole-Parmer Instrument Co. Ltd. breath-sampling bag by Laboratory for Expiration Biochemistry Nourishment Metabolism Co., Ltd.)에 넣고 호흡대사 시험을 진행하였다 [21]. VLDL remnants를 주입 15분 후 캐놀라를 통하여 식염수 내 10% Triton WR 1339 용액 1.0 mL를 주입하여 순환에서 분비된 VLDL-TAG의 가수분해를 최소화시켰다. 호흡대사 시험이 종료된 후 pentobarbitone (50 mg/kg)을 복강주사하여 마취시켰다. 간 및 혈액 샘플을 채취하고 지질을 추출하여 간 및 분비된 트리 아실 글리세롤 및 인지질과 관련된 14 C 표지를 측정하였다. 이 과정을 통해, 배출된 이산화탄소는 호흡챔버를 통해 공기의 흐름 (10 L/min)을 유지함으로써 에탄올아민과 에틸렌글리콜 모노메틸에테르 (1:2, v/v)의 혼합액 100 mL에 포집하였다 [20].

2.5. 시료채취 및 TLC분석

상기의 방법으로 마취 후 적외선 등을 이용하여 랫드의 체온을 유지하면서 복강을 절개하여

펼친 다음 동맥으로부터 3 mL의 혈액을 신속하게 채취하였다. 간의 경우 왼쪽 간엽을 저자가 고안한 급속동결 시료채취법(cold clamping technique)에 의해서 취했으며 이때 스테인레스를 이용하여 삼각형 모양으로 제작된 clamp를 이용하였다. 간의 나머지 부분, 뒷다리 근육 및 지방 조직은 액체질소가스에서 급속냉동 후 분석 시까지 보관하였다. 각 조직에서 지질을 추출하여 Thin Layer Chromatography (TLC, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 의해 각 지질 분획을 분리하였다. 본 연구는 연구특성 상 실험 동물에게 수술에 의한 경정맥 캐놀라를 부착하고 일정기간 회복기를 둔 다음 일회에 많은 동물을 이용하여 실험을 진행할 수 없기 때문에 수차례에 걸친 반복실험을 실시하였다.

2.6. 통계분석

얻어진 모든 자료의 통계처리는 SAS program을 이용하였으며 각 처리구 그룹의 평균과 표준편차를 구하고 분산분석을 실시한 다음 Duncan's multiple range test에 의하여 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험사료를 섭취한 차세대 랫드(부모 시기부터 동일한 실험사료를 섭취 후 출생, 이주시킨 성장기까지의 차세대 랫

드 총 12마리, 처리구 당 3마리씩 완전임의배치)에서 경정맥 캐놀라를 설치 후 조사한 혈액과 간의 총지질 분획에서 glycerolipid 속으로 ^{14}C 표지된 지질(이하 표지물로 표기함)의 합병율 및 $^{14}\text{CO}_2$ 배출율은 Table 4와 같다. ^3H 표지물의 간에서 합병율은 ^{14}C 표지물의 간과 혈액에서 합병율에 비하여 높게 나타났다. ^3H 표지물의 간내 합병율은 90.21–90.57%로서 높았으나 혈액 속으로 합병율은 1.10–1.20%로서 매우 낮았으며 ^3H 표지물의 간과 혈액 속으로 합병율은 각 처리구 사이의 차이가 없었다. 간 지방산의 분할기전 연구에 있어서 ^3H 와 ^{14}C 를 동시에 사용하는 이유는 다음과 같다. [^3H]-cholesteryl oleoyl ether를 사용하는 이유는 ^{14}C 표지물의 주입 시 일어나는 지질대사 즉 간에서 합성 분비되는 VLDL-TAG의 대사율을 보정해주기 위함으로써 이 경우 지질의 생체대사가 진행될 경우 ^3H 표지물의 간 합병율은 ^{14}C 표지물의 간 합병율에 비하여 월등히 높은 결과를 나타낸다. 그러나 혈액 속으로 ^3H 합병율은 아주 낮거나 또는 거의 없다 [20,22]. [^3H]-cholesteryl oleoyl ether는 cholesteryl[^{14}C]oleate와 달리 간에서 위와 같은 대사경로를 거치지 않으며 90% 이상이 그대로 간에 남게 되므로 이 두 가지 동위원소 표지물질을 이용하게 되면 보다 정확하게 간에서의 glycerolipid 분할기전을 측정하는 것이 가능하다 [20,22]. ^{14}C 표지물의 간에서 합병율은 대조구, 19:1, 8:1, 1.2:1 그룹의 순서로 높았으며 합병율 범위는 28.77–36.11%로서 혈액의 합병율에 비해

Table 4. $^{14}\text{CO}_2$ production and incorporation of [^3H], [^{14}C] label into liver and plasma at 60 min after injection of LPS(d<1.019) labelled with cholesteryl[^{14}C]oleate in second generation male rats (from weanling to adult) fed experimental diets

n-6/n-3 ratio	Incorporation of [^3H], [^{14}C] label(% of injected dose)				$^{14}\text{CO}_2$ production
	Plasma		Liver		
	[^3H]	[^{14}C]	[^3H]	[^{14}C]	
0	1.20	25.15 ^a	90.57	36.16 ^a	7.05 ^d
1.2:1	1.12	16.20 ^d	90.44	28.77 ^d	20.17 ^a
8:1	1.10	17.57 ^c	90.49	33.16 ^c	18.44 ^b
19:1	1.11	22.16 ^b	90.21	35.72 ^b	10.36 ^c
PSE	0.0189	2.0141	0.3351	2.0121	2.0117
P-value	0.9028	0.0001	0.8209	0.0001	0.0001

PSE: pooled standard error of mean values. ^{a,b,c}Values within the same column with different superscript are significantly different (n=3, p<0.05).

높았다($p < 0.05$). 혈액 속으로 합병율은 대조구, 19:1, 8:1 그룹의 순서로 높았고 1.2:1 그룹이 가장 낮았으며 ($p < 0.05$) 혈액 속으로 합병율 범위는 16.20-25.15%로서 간에서 합병율에 비해 낮게 나타났다. 간에서 cholesteryl¹⁴C]oleate는 ¹⁴C]oleic acid와 cholesterol로 대사되며 결국 oleic acid는 산화와 에스터화 과정을 거치면서 새롭게 VLDL-TAG의 합성에 이용되고 새로 합성된 VLDL은 30분 후 혈액으로 이동된다. 따라서 cholesteryl¹⁴C]oleate를 사용하면 간에서 새롭게 합병된 VLDL-TAG의 혈액 분비량을 측정하는 것이 가능하다 [20-23]. glycerolipid 대사에 의한 ¹⁴CO₂ 배출율은 1.2:1 그룹이 높았고 대조구에서 가장 낮았으며 처리군 사이의 차이가 인정되었다($p < 0.05$). ¹⁴CO₂ 배출율 범위는 7.05-20.17%로 나타나서 n-6/n-3 비율 함유 식이를 섭취한 동물 특히 n-6/n-3 비율 8:1 이하의 그룹에서 glycerolipid 대사가 빠르게 진행되는 것으로 나타났다. 간 지방산의 대사에 관한 생체모니터링 연구에서 ¹⁴CO₂의 배출동력학은 약간의 차이를 보이는데 그 이유는 간에서 ¹⁴CO₂의 직접적인 생성 및 상피조직에서 ¹⁴C 케톤체의 산화를 들 수가 있다 [20]. 이론적으로는 ¹⁴C 케톤체가 지방합성 조직 내 ¹⁴C-TAG속으로 합병될 수 있음을 추정할 수 있으나 그 양은 ¹⁴C 표지물을 주입 1시간 후 약 2% 미만의 아주 적은 양으로 보고되었기 때문에 생체모니터링 연구에서는 ¹⁴C 케톤체 산화보다도 ¹⁴CO₂ 배출량에 더욱 중요성을 두고 있다 [20, 23-24]. 결과는 새롭게 주입된 ¹⁴C 표지물로부터 간과 혈액 속으로

glycerolipid 합병율은 n-6/n-3 비율을 갖지 않았던 대조구가 가장 높았고 n-6/n-3 비율 8:1 이하 식이를 섭취한 동물에서 낮았으나 ¹⁴CO₂ 배출율은 그 반대로 나타남을 보여준다. 따라서 동물의 식이 내 n-6/n-3 비율 8:1 이하로 유지해 주면 glycerolipid 대사가 활성화된다는 사실을 새롭게 확인하였다.

n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험사료를 섭취한 차세대 랫드에서 경정맥 캐놀라를 설치 후 조사된 ¹⁴CO₂ 배출율, 조직 내 ¹⁴C가 표지된 지질(이하 표지물)의 축적율은 Table 5와 같다. ¹⁴C 표지물의 흡수율과 ¹⁴CO₂ 배출율은 모든 처리군에서 유의적인 차이를 나타냈다($p < 0.05$). Cruz와 Williamson (1992)은 ¹⁴CO₂ 배출율은 절식 후 사료를 급여한 이후 처음 1시간 동안에 직선적으로 증가했으며 정상식이 섭취군에서 유의적으로 낮아졌다고 보고했다. 그리고 이후 5시간 동안 ¹⁴C 표지물의 흡수율은 무제한 급여구의 쥐에서 높아졌다고 했다 [25]. 따라서 이러한 차이를 보정해주고 보다 정확한 자료를 제시하기 위해서는 ¹⁴CO₂ 배출율과 조직 ¹⁴C 표지물의 축적율에 대한 자료를 Table 5와 같이 흡수된 양의 %로 표기하는 것이 바람직하다 [14,20]. ¹⁴C 표지물의 조직 내 축적율은 대조구가 처리군에 비해서 유의하게 높았고 간에서 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 낮았다($p < 0.05$). ¹⁴CO₂ 배출율은 1.2:1 그룹이 가장 높았고 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹은 각각 2.02, 1.91, 1.17배 높아졌다. 이는 대조구에서 생체 지질 축적율 증가에 의해서 이루어졌을 것으로 보이는데 산화(간, 근

Table 5. ¹⁴CO₂ production and tissue accumulation of [¹⁴C] lipid in next generation male rats (from weanling to adult) fed experimental diets¹⁾

n-6/n-3 ratio	Absorption of [¹⁴ C]lipid (%)	¹⁴ CO ₂ production (% of absorbed dose)	Tissue [¹⁴ C] lipid accumulation (% of absorbed dose/g of tissue)		
			Adipose tissue	Liver	Muscle (hind leg)
0	66.52 ^a	23.08 ^d	1.65 ^a	1.57 ^a	0.79 ^a
1.2:1	55.75 ^d	33.81 ^a	0.56 ^d	0.22 ^d	0.15 ^d
8:1	59.12 ^c	30.01 ^b	0.87 ^c	0.61 ^c	0.38 ^c
19:1	63.02 ^b	27.11 ^c	1.16 ^b	1.02 ^b	0.51 ^b
PSE	1.3656	1.2678	0.1031	0.1018	0.0087
P-value	0.0150	0.0220	0.0230	0.0117	0.0101

^{a,b,c,d}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=3, $p < 0.05$).

육, 갈색지방) 보다는 오히려 지방조직 내 지질 축적을 위한 새롭게 주입된 ^{14}C 표지물의 새로운 흐름을 나타내는 것으로 추정할 수 있다 [16,18]. 대조구의 지방조직에서 ^{14}C 표지물의 축적율이 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹에 비하여 각각 2.94배, 1.90배, 1.42배 높았던 점은 이를 잘 반영해 주고 있다. 근육은 산화를 위한 순환 중성지방의 중요한 제거 부위로 알려져 있는 바 [16,20,22] 본 연구에서는 뒷다리 골격근육 내 ^{14}C 표지물의 축적율이 가장 높았던 대조구가 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹에 비해서 각각 5.26, 2.08, 1.55 배 유의하게 높은 경향을 나타냈다($p < 0.05$). 따라서 동물에서 n-6/n-3 비율 19:1 이하를 함유하는 식이의 섭취가 지질의 흡수를 억제함과 동시에 산화를 가속화하여 줌으로써 생체조직 내 지질축적을 낮추는 것으로 판단된다.

n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험사료를 섭취한 차세대 랫드에서 경정맥 캐놀라를 설치 후 조사된 혈액과 간 에스테르화 생성물에서 회수된 간에서 대사된 cholesteryl ester의 비율은 Table 6 과 같다. Table 5에 제시된 값은 지질대사에 따른 서로 다른 측정값의 차이를 보정해 주기 위해서 ^3H 회수율(Table 4)을 기준으로 한 대사된 양의 %농도로서 나타낸 수치이다. 총 glycerolipids (간에서 대사된 cholesteryl [^{14}C]oleate %)는 대조구가 가장 높았으며 19:1, 8:1, 1.2:1 그룹의 순서로 높았으나($p < 0.05$) 1.2:1, 8:1 그룹 사이의 차이는 없었다. 인지질 분비량은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 1.88, 1.73,

1.33배 각각 높게 나타났다($p < 0.05$). 중성지방 분비량은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 36.35, 20.93, 13.72% 각각 감소하였다($p < 0.05$). 총 glycerolipid에 대한 인지질의 분할 비율은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 높았으며 각각 1.38, 1.29, 1.17배 높았다($p < 0.05$). ^{14}C 으로 표지된 총 glycerolipid에 대한 $^{14}\text{CO}_2$ 생성비율은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 각각 1.61, 1.52, 1.29배 높았다($p < 0.05$). 이러한 결과는 n-6/n-3 비율 특히 8:1 이하의 식이섭취가 차세대 랫드에서 지방산의 산화율을 가속화시켜 준다는 점을 나타낸다. 일반적으로 간에 의한 지방산의 에스테르화율이 낮아졌을 때 대부분의 인지질은 간에서 그대로 유지되어 적절한 간장 세포막 구조를 유지해주는 한편, 인지질 합성을 위해 쓰이는 에너지를 절약해준다 [20,22]. 이상에서 새롭게 주입된 ^{14}C 표지물로부터 간에서 혈액 속으로 분비된 glycerolipid 분할율은 중성지방의 경우 식이 내 n-6/n-3 비율을 조절해준 처리구가 낮았으나 인지질 분비율과 $^{14}\text{CO}_2$ 생성율은 그 반대로 나타남을 알 수 있었다. 본 연구에서 밝혀낸 새로운 사실은 n-6/n-3 비율이 8:1 이하로 낮아질수록 간에서 새롭게 합성된 glycerolipid 분할에서 중성지방 분비를 낮출과 동시에 인지질 분비를 증가시키고 $^{14}\text{CO}_2$ 배출을 증가시켜서 혈액 중 유해한 지질을 낮출 수 있다는 점이었다.

n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험사료를 섭취한 차세대 랫드에서 경정맥 캐놀라를 설치 후 조사

Table 6. Glycerolipid partitioning in liver of next generation male rats fed experimental diets form weanling to adult

n-6/n-3 ratio	Total glycerolipids (% of cholesterol [^{14}C]-oleate metabolized in liver)	% Secreted		Phospholipid/total glycerolipid (%)	$^{14}\text{CO}_2$ /[^{14}C] total glycerolipid (%)
		Phospholipid (% of total glycerolipid labelled)	TG (% of total triacylglycerol labelled)		
0	82.09 ^a	16.74 ^c	58.15 ^a	30.95 ^d	25.70 ^d
1.2:1	73.19 ^c	31.47 ^a	37.09 ^d	42.86 ^a	41.46 ^a
8:1	74.09 ^c	29.02 ^a	45.98 ^c	40.01 ^b	39.17 ^b
19:1	77.41 ^b	22.33 ^b	50.17 ^b	36.31 ^c	33.17 ^c
PSE	2.0621	1.3602	2.7060	2.0307	2.1072
P-value	0.0405	0.0157	0.0129	0.0182	0.0180

^{a,b,c,d}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=3, $p < 0.05$).

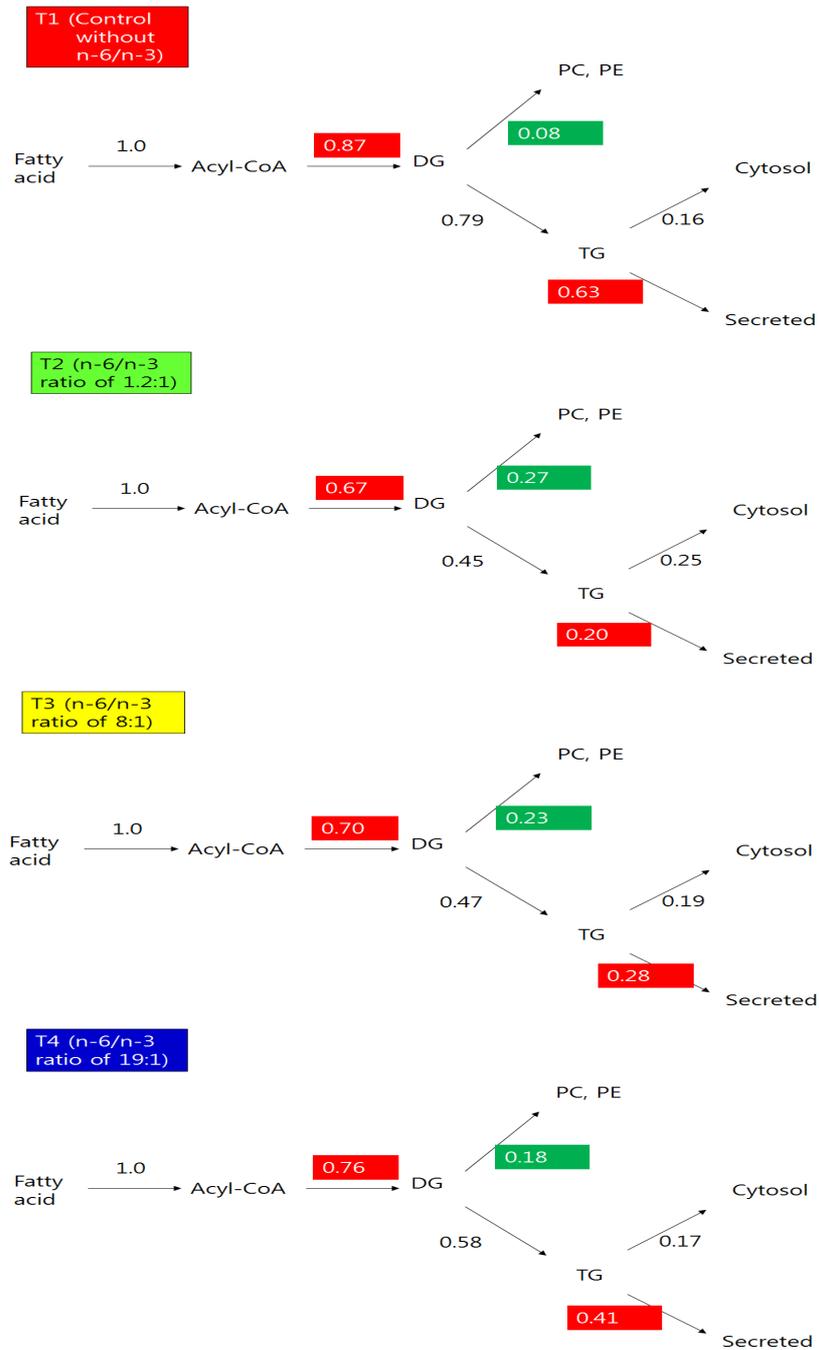


Fig. 1. Quantification of the partitioning of flux of acyl moieties at the major branch points for oxidation and glycerolipid synthesis in male rat liver fed experimental diet from weanling to adult (n=3). DG, diacylglyceride; TG, triacylglyceride; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine.

된 지질합성에 관한 각 대사적 분기점 내 기여도를 Fig. 1과 같이 정량화하였다. 간으로부터 ^{14}C 으로 표지된 중성지방 분비율에서 대조구 72.41, 1.2:1 그룹 29.85, 8:1 그룹 40.00, 19:1 그룹 53.95%로 나타나서 n-6/n-3 비율이 19:1에서 1.2:1로 낮아질수록 중성지방 분할이 감소한다는 점을 알 수 있었다. 인지질 분할에서 대조구 9.20, 1.2:1 그룹 40.30, 8:1 그룹 32.86, 19:1 그룹 23.68%로 나타났으며 n-6/n-3 비율이 19:1에서 1.2:1로 낮아질수록 인지질 분할이 증가한다는 사실을 확인하였다. n-6/n-3 비율을 갖지 않았던 대조구와 비교할 때 n-6/n-3 비율이 낮아질수록 생체 유해지질이 감소한 점은 acyl-CoA, diacylglycerol, 인지질 및 중성지방 분할경로로 이어지는 acyl moiety의 분할 방향에서 다중적인 감소효과에 의해서 나타난 것으로 볼 수 있다 [20,22]. 그러므로 산화하는 방향으로 acyl-CoA의 증가 및 분비에 기인한 중성지방의 세포 내 축적증가는 일반적으로 동일한 기여도를 만든다. glycerolipid 합성은 쥐의 간에서 지방산 대사의 주요한 루트이며 조직은 아주 적은 양이지만 새롭게 합성된 지방산을 활용하여 일부 glycerol의 에스터화를 피한다 [23-25]. 지방산화를 위한 아실카르니틴 형성과 지방합성을 위한 에스테르화 사이의 간 지방산 분할은 지방산의 산화율을 결정하므로 산화와 에스테르화 사이의 간 지방산 분할은 매우 중요하다. 사료를 섭취한 쥐에서 지방산의 대사는 중성지방과 인지질 합성 쪽으로 진행되며 간에서 합성되어 혈액 속으로 분비된 중성지방을 함유하는 초저밀도지질단백질은 동물의 지방조직 내 지질단백질 분해효소 lipoprotein lipase의 기질로써 사용된다 [20-25]. 본 연구결과 밝혀진 새로운 사실은 n-6/n-3 비율이 19:1에서 1.2:1로 낮아질수록 간에서 합성 분비되는 중성지방과 인지질의 대사적 분할능력을 조절하는 메카니즘에 의해 혈액 지질을 낮춘다는 점이었다.

4. 결론

본 연구는 오메가 6와 오메가 3 비율이 서로 다른 식이(0, 1.2:1, 8:1, 19:1)의 섭취가 차세대 랫드에서 glycerolipid의 대사적 분할에 관한 메카니즘을 구명하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 지방산의 산화율로써 나타낸 $^{14}\text{CO}_2$ 배

출율은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹에서 각각 2.02, 1.91, 1.17배 높아졌다. 총 glycerolipid에 대한 인지질의 분할 비율은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 각각 1.38, 1.29, 1.17배 높았다. 총 glycerolipid에 대한 $^{14}\text{CO}_2$ 생성비율은 대조구와 비교할 때 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹의 순서로 각각 1.61, 1.52, 1.29배 높았다. 간으로부터 ^{14}C 표지된 중성지방 분비율은 대조구, 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹에서 각각 72.41, 29.85, 40.00, 53.95%로 나타났다. 인지질 분비율은 대조구, 1.2:1, 8:1, 19:1 그룹에서 각각 9.20, 40.30, 32.86, 23.68%로 나타났다. 결론적으로 n-6/n-3 비율이 8:1 이하로 낮아질수록 간에서 합성, 분비되는 중성지방과 인지질의 대사적 분할능력을 조절하는 메카니즘에 의해 혈액 지질을 낮춘다는 새로운 사실을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 교육부 한국연구재단 2015년도 기본연구지원사업 (C1012520-01-01) 및 2016년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

References

1. U. Gogus, C. Smith, "Omega 3 fatty acids: a review of current knowledge", *Int. J. Food Sci. Tech.*, Vol. 45, pp. 417-436, (2010).
2. A.P. Simopoulos, "An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity", *Nutrients*, Vol. 8, pp. 128-144, (2016).
3. A.P. Simopoulos, "The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases", *Exp. Biol. Med.*, Vol. 233, pp. 674-688, (2008).
4. C. Gómez-Candela, L.M. Bermejo López, V. Loria-Kohen, "Importance of a balanced omega-6/omega-3 ratio for the maintenance of health", *Nutritional Recommendations, Nutr. Hosp.*, Vol. 26,

- pp. 323-329, (2011).
5. A.P. Simopoulos, "Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects", *World Rev. Nutr. Diet*, Vol. 92, pp. 1-22, (2003).
 6. P.R. Burghardt, E. S. Kemmerer, B.J. Buck, A.J.C. Yan, S.J. Evans, "Dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratios differently influence hormonal signature in a rodent model of metabolic syndrome relative to healthy controls", *Nutrition and Metabolism*, Vol. 7, pp. 53-62, (2010).
 7. K. Bhardwaj, N. Verma, R. K. Trivedi, S. Bhardwaj, N. Shukla, "Significance of ratio of omega-3 and omega-6 in human health with special reference to flaxseed oil", *Int. J. Biol. Chem*, Vol. 10, pp. 1-6, (2016).
 8. H.C. Bucher, P. Hengstler, C. Schindler, G. Meier, "n3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials", *Am. J. Med*, Vol. 112, pp. 298-304, (2002).
 9. D. Much, S. Brunner, C. Vollhardt, D. Schmid, E.M. Sedlmeier, M. Brüderl, E. Heimberg, N. Bartke, G. Boehm, B.L. Bader, U. Amann-Gassner, H. Hauner, "Effect of dietary intervention to reduce the n-6/n-3 fatty acid ratio on maternal and fetal fatty acid profile and its relation to offspring growth and body composition at 1 year of age", *Eur. J. Clin. Nutr*, Vol. 67, pp. 282-288, (2013).
 10. K.S. Husted, E.V. Bouzinova, "The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder", *Medicina*, Vol. 52, pp. 139-147, (2016).
 11. S. Halfen, C.B. Jacometo, P. Mattei, S.R. Fensterseifer, L.F.M. Pfeifer, F.A.B.D. Pino, M.A.Z. Santos, C.M.P.D. Pereira, E. Schmitt, M.N. Corrêa, "Diets rich in polyunsaturated fatty acids with different omega-6/omega-3 ratio decrease liver content of saturated fatty acids across generations of Wistar rats", *Braz. Arch. Biol. Technol*, Vol. 59, pp. 1678-4324, (2016).
 12. T.J.G. Chambers, M.D. Morgan, A.H. Heger, R.M. Sharpe, A.J. Drake, "High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent of origin specific manner", *Scientific Reports*, Vol. 6, pp. 31857-31868, (2016).
 13. J.S. Shin, S.H. Lee, D.H. Choi, C.R. Kim, K.H. Um, B.S. Park, "Biochemical mechanism of the ratio of omega 6 to 3 fatty acid on blood lipid reduction in rats", *The Oil Chem. Soc*, Vol. 34, pp. 315-326, (2017).
 14. V.A. Zammit, "Role of insuline in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts, Review article", *Biochem. J*, Vol. 314, pp. 1-14, (1996).
 15. B.S. Park, "Method of biological monitoring related to lipid metabolism", *Korean Patent*, No, 10-1633979, (2016).
 16. B.S. Park, Y.C. Lee, "Studies on the partitioning of glycerolipid metabolism in pregnant and lactating rats", *Kor. J. Anim. Sci*, Vol. 39, pp. 705-714, (1995).
 17. S.M. Rennie, B.S. Park, V.A. Zammit, "A switch in the direction of the effect of insulin on the partitioning of hepatic fatty acids for the formation of secreted triacylglycerol occurs in vivo, as predicted from studies with perfused livers", *Eur. J. Biochem*, Vol. 267, pp. 935-941, (2000).
 18. A.M. Moir, B.S. Park, V.A. Zammit, "Quantification in vivo of the effects of different types of dietary fat on the loci of control involved in hepatic triacylglycerol secretion", *Biochem. J*, Vol. 308, pp. 537-542, (1995).
 19. P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C.Jr. Fahey, "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet", *J. Nutr*, Vol. 123, pp. 1939-1951, (1993).
 20. A.M.B. Moir, V.A. Zammit, "Monitoring

- of changes in hepatic fatty acid and glycerolipid metabolism during the starved-to-fed transition in vivo, studies on awake, unrestrained rats", *Biochem. J.*, Vol. 289, pp. 49-55, (1993).
21. K. Ebihara, M. Tachibe, N. Natsumi, T. Kishida, "Hydroxypropylation of high-amylose maize starch changes digestion and fermentation-dependent parameters in rats", *J. Nutr. Sci.*, Vol. 2, pp. 1-10, (2013).
22. V.A. Zammit, A.M Moir, "Monitoring the partitioning of hepatic fatty acids in vivo: keeping track of control", *Trends Biochem. Sci.*, Vol. 19, pp. 313-317, (1994).
23. V.A. Zammit, D.J. Lankester, A.M. Brown, B.S. Park, "Insulin stimulates triacylglycerol secretion by perfused livers from fed rats but inhibits it in livers from fasted or insulin-deficient rats implications for the relationship between hyperinsulinaemia and hypertriglyceridaemia", *Eur. J. Biochem.*, Vol. 263, pp. 859-864, (1999).
24. L. Hodson, K.N. Frayn, "Hepatic fatty acid partitioning", *Curr. Opin. Lipidol.*, Vol. 22, pp. 216-224, (2011).
25. M.L. Cruz, D.H. Williamson, "Refeeding meal-fed rats increases lipoprotein lipase activity and deposition of dietary[14C] lipid in white adipose and decreases oxidation to $^{14}\text{CO}_2$ ", *Biochem. J.*, Vol. 285, pp. 773-778, (1992).