

n-6/n-3 지방산 비율이 비만 랫드의 지질대사에 미치는 영향

신종서 · 엄경환 · 박병성[†]

강원대학교 동물생명과학대학
(2018년 7월 21일 접수: 2018년 9월 13일 수정: 2018년 9월 19일 채택)

Effect of n-6/n-3 fatty acid ratio on lipid metabolism in obesity model rats

Jong-Suh Shin · Kyung-Hwan Um · Byung-Sung Park[†]

*College of Animal Life Science, Kangwon National University,
Chuncheon, Gangwondo, 200-701, Republic of Korea*

(Received July 21, 2018; Revised September 13, 2018; Accepted September 19, 2018)

요약 : 본 연구는 비만 모델동물 랫드에서 식이 내 오메가 6와 3 지방산 비율(n-6/n-3 0, 4:1, 15:1, 30:1)이 지질대사의 생화학적 메카니즘을 구명하였다. 혈액 중성지방은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군에서 22.21%, 총콜레스테롤 20.60%, LDL-C 52.96%, 혈당 15.71%, ALT 11.97%, AST 9.13%, 인슐린 37.57%, 렙틴 45.98% 낮아졌으나, HDL-C 28.38%, 인지질 80.39% 증가하였고, 특히 4:1 처리군에서 가장 큰 효과가 나타났다. 간 조직에서 SREPB-1 α , SREPB-2 mRNA는 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 처리군에서 하향조절 하였으나 PPARs 그리고 지방조직의 LPL-mRNA는 상향조절 하였다. 간 조직에서 지방세포의 크기는 n-6/n-3 비율 30:1, 대조군, 15:1, 4:1 순서로 낮아졌고, 지방조직에서 지방세포의 크기는 대조군, 30:1, 15:1, 4:1 순서로 낮았다. 결과는 비만 모델동물 랫드에서 오메가 6와 오메가 3 지방산 비율, 특히 4:1을 함유하는 식이를 급여하면 혈액 유해 지질, 간 기능 효소, 렙틴, 인슐린, 간과 지방조직의 유전자 발현 조절을 통하여 건강을 유지할 수 있다는 새로운 사실을 발견하였다.

주제어 : n-6/n-3, 고지방식이, 항비만, 혈액지질, 인슐린, 렙틴, 조직해부학, 유전자 발현

Abstract : This study was determined the effects of dietary omega-6 and 3 fatty acid ratios (n-6/n-3, 0, 4:1, 15:1, 30:1) on lipid metabolism in obese model animal rats. Blood triacylglycerol, total cholesterol, LDL-C, glucose, ALT, AST, insulin, and leptin concentrations in n-6/n-3 group were decreased by 22.21, 20.60, 52.96, 15.71, 11.97, 9.13, 37.57, 45.98%, respectively, while HDL-C and phospholipid concentrations were increased by 28.38, 80.39% respectively, compared with control group, as especially in 4:1 group showed the greatest effect.

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

SREPB-1 α and SREPB-2 mRNA in liver tissues were down-regulated in n-6/n-3 group, but LPL-mRNA of PPARs in adipose tissue was up-regulated compared with control group. The adipocyte size in liver tissues was decreased in the order of n-6/n-3 ratio of 30:1, control, 15:1 groups, and the adipocyte size in adipose tissues was decreased in the order of n-6/n-3 ratio of control, 30:1, 15:1, 4:1 groups.

Keywords : n-6/n-3, High-fat diet, Anti-obesity, Blood lipids, Insulin, Leptin, Histopathology, Gene expression

1. 서론

오메가 6와 오메가 3 지방산 비율(n-6/n-3)의 균형은 비만예방 및 건강관리에 중요하다. n-6/n-3는 진화과정을 통하여 1:1에서 현재 20:1로 높아졌으며 이러한 변화는 과체중과 비만 유병률의 현저한 증가와 관계가 깊다[1]. 지금까지 전체 칼로리에 대한 총 지방 및 포화지방 섭취량은 서구 식단에서 지속적으로 감소했지만 n-6 지방산의 섭취가 증가하고 n-3 지방산이 감소하여 n-6/n-3가 크게 높아졌다. 필수지방산으로써 n-6/n-3의 중요성은 에이코사노이드 생성, 세포막 인지질로의 통합에 의한 세포막 유동성, 유전자 전사 조절 및 우울증과 관련하고 있음이 알려졌다[2, 3]. n-6의 과잉섭취로 인한 n-3의 감소는 n-6/n-3를 높이며 염증을 비롯한 대사증후군을 일으키는 원인이 되기 때문에 n-6/n-3 균형은 대단히 중요하다[4, 5, 6]. 식품 중 n-6/n-3가 높으면 혈액응고, 종양, 고혈압, 알츠하이머치매, 자가면역질환 및 갱년기 여성의 혈관 질환의 원인이 될 수 있다[7, 8]. n-6/n-3는 비만, 인슐린 저항성, 염증 및 지질 프로파일을 비롯한 대사장애 조절 마커와 관계가 있다[9]. 건강을 위하여 섭취하는 식품 중의 n-6/n-3 균형은 4:1 이하가 최적으로 보고되었다[2, 6, 10]. 비만은 음식의 과잉섭취 및 운동부족으로 인하여 백색지방에 중성지방이 과도하게 축적됨으로써 백색지방의 크기와 숫자를 늘려주는 것이 커다란 원인이다[11, 12]. 식품의 섭취와 에너지 소비 조절은 시상하부 내의 신경신호 전달에 의해 조절되며 이러한 신호 전달의 조절장애는 에너지 불균형과 비만으로 이어진다는 점은 잘 알려졌다[13, 14]. 고지방식이 섭취 랫드와 마우스에서 n-6/n-3가 낮은 식이를 섭취할 경우 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-C를 낮추고 대사성질

환 예방에 도움이 될 수 있음이 보고되었다[15, 16]. 그러나, 특정한 n-6/n-3가 비만을 예방한다는 메카니즘은 명확하게 알려져 있지 않으며 비만 모델동물 랫드에서 n-6/n-3와 혈액 지질대사에 관한 연구가 필요하다. 본 연구는 고지방 식이에 의해서 유도된 비만 모델동물 랫드에서 n-6/n-3가 서로 다른 식이를 급여하였을 때 혈액 지질대사에 미치는 작용 메카니즘을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 실험동물 및 실험설계

동물실험을 포함한 모든 절차는 EEC Directive (86/609/EEC)에서 제시된 과학적이고 윤리적인 규정을 따랐으며 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어서 진행하였다 (KNU-1708). Sprague-Dawley 랫드 숫컷(체중 180-185 g) 40마리를 대한바이오링크(주)로부터 구입하였다. 일 반식이를 이용하여 1주일의 환경 적응기간을 거친 후, 대조군(20마리, 체중 208 g)과 비만군(20마리, 체중 207 g)으로 구분하여 비만군에 대해서는 우지를 함유한 고지방식이(high fat diet, HFD, D12451, 45 kcal% fat, USA)로써 30일간 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하면서 비만을 유도하였다(Fig. 1). 비만을 유도한 이후 평균 체중에 가깝게 체중에 따라서 4처리구*처리구 당 5반복(반복 케이지 당 1마리씩)으로 완전임의 배치하였다. n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험사료를 각각 60일 동안 각각 급여하면서 성장능력 및 지질대사의 생화학적 메카니즘을 규명하였다. 실험 처리구는 대조군(n-6/n-3 비율 0)과 3개의 처리군(n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1)으로 구분하였다.

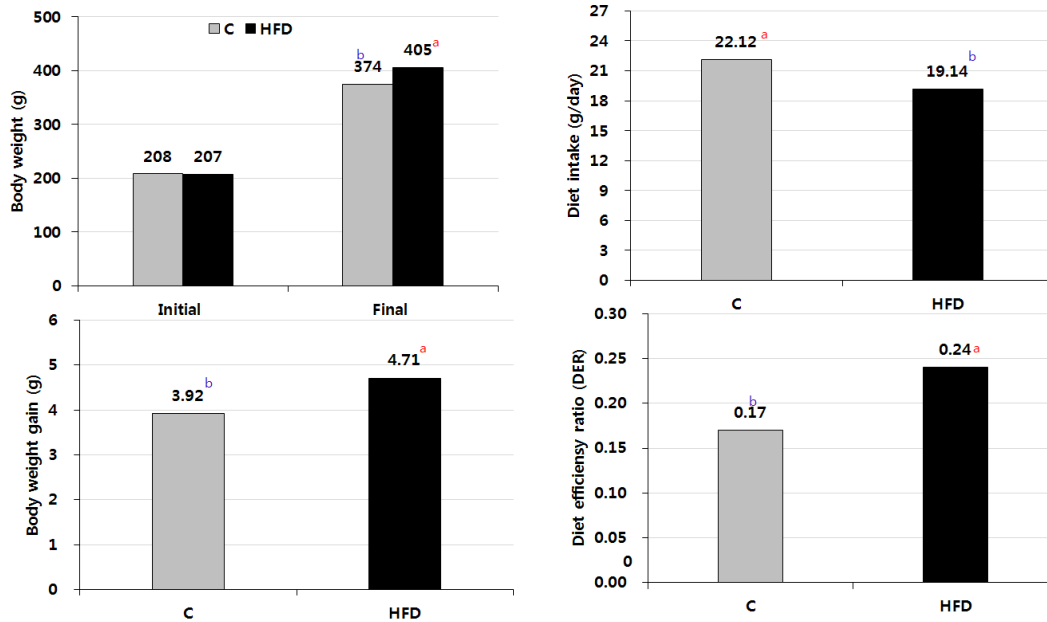


Fig. 1. Body weight, diet intake and diet efficiency ratio in rats fed high fat diet (HFD) for 30 days.

C (control diet), HFD (high fat diet). Values are expressed as mean±standard deviation (n=20). ^{a,b}Values within the same line with different superscript are significantly different (p<0.05).

2.2. 실험식이와 사양관리

실험식은 미국 영양연구소에서 제시한 랫드의 영양소 요구량을 충족 또는 초과할 수 있도록 조절된 정제 펠릿식이(Table 1)를 이용하였다[17, 18]. 정제 펠릿식은 제조 후 70°C 건조오븐에서 24시간 건조하여 수분 12%를 함유하였다. 실험식이 내 n-6/n-3 비율은 대조군(n-6/n-3 비율이 없음)의 경우 돼지기름(pork belly oil, 삼겹살을 불판에 직접 구워서 획득) 7.0%를 첨가하였으며, n-6/n-3 수준은 4:1(옥수수유 82%+들기름 18%), 15:1(옥수수유 96%+들기름 4%), 30:1(옥수수유 82%+대두유 18%)로 각각 조절하였다. 실험에 사용된 기름과 실험식이의 지방산 조성은 Table 2, Table 3과 같다. 동물은 실온 20-24°C, 상대습도 55-58%, 12시간 점등조절로 유지되는 사육실에서 폴리에틸렌 케이지에 넣어 사육하였으며 물과 실험식이를 무제한 급여하였다.

Table 1. Composition of basal purified pellet diet

Ingredients	Amounts (%)
Corn starch	39.75
Casein	20.00
Maltodextrin	13.20
Sucrose	10.00
Fat ¹⁾	7.00
α-Cellulose	5.00
Mineral mix ²⁾	3.50
Vitamin mix ³⁾	1.00
L-cystine	0.30
Choline bitartrate	0.25
t-Butylhydroquinone	0.0014
Total	100

¹⁾Fat was adjusted according to the n-6/n-3 ratio.

²⁾#210025 AIN-93G mineral mix, ³⁾#310025 AIN-93G vitamin mix.

Table 2. Fatty acids composition of dietary oils (%)

Fatty acids	Corn oil	Perilla oil	Pork belly oil	Soybean oil
Octanoic acid (C8:0)	-	-	-	-
Decanoic acid (C10:0)	-	-	0.15	-
Lauric acid (C12:0)	0.13	0.04	0.22	-
Myristic acid (C14:0)	0.07	0.02	2.16	0.09
Palmitic acid (C16:0)	12.40	7.84	25.08	11.53
Palmitoleic acid (C16:1n-9)	0.13	0.27	2.61	0.10
Stearic acid (C18:0)	2.28	3.86	11.91	4.84
Oleic acid (C18:1n-9)	31.22	14.76	40.79	24.36
Linoleic acid (C18:2n-6)	51.21	16.88	16.28	51.28
Arachdic acid (C20:0)	1.03	0.29	0.12	0.76
Linolenic acid (C18:3n-3)	1.12	55.67	-	6.41
Behenic acid (C22:0)	0.19	0.38	-	0.50
Erucic acid (C22:1)	-	-	0.05	-
Lignoceric acid (C24:0)	0.20	-	-	0.14
Total	100	100	100	100

-: not detected, SFA: saturated fatty acids, UFA: unsaturated fatty acids.

Table 3. Fatty acids composition of experimental diet

Fatty acids	(% of total fatty acids)			
	0	Dietary 4:1	n-6/n-3 15:1	30:1
Octanoic acid (C8:0)	10.12	-	-	-
Decanoic acid (C10:0)	6.61	-	-	-
Lauric acid (C12:0)	46.25	-	-	-
Myristic acid (C14:0)	19.92	-	-	-
Palmitic acid (C16:0)	8.54	11.68	12.63	12.84
Palmitoleic acid (C16:1n-9)	-	-	-	-
Stearic acid (C18:0)	3.66	2.60	2.40	2.70
Oleic acid (C18:1n-9)	3.52	28.23	30.91	31.07
Linoleic acid (C18:2n-6)	1.39	45.89	50.69	51.70
Arachdic acid (C20:0)	-	-	-	-
Linolenic acid (C18:3n-3)	-	11.60	3.36	1.69
Behenic acid (C22:0)	-	-	-	-
Erucic acid (C22:1)	-	-	-	-
Lignoceric acid (C24:0)	-	-	-	-
Total	100	100	100	100
SFA	95.10	14.28	15.03	15.54
UFA	4.90	85.72	84.97	84.46
n-6/n-3	-	3.96	15.08	30.59
UFA/SFA	0.05	6.00	5.65	5.43

2.3. 혈액 지질, 혈당 및 간 기능 효소의

생화학적 분석

혈액 지질 프로파일 분석을 위하여 실험 종료 7시간 전에 식이를 철회하여 절식을 시킨 후 흰 쥐를 에틸에테르로써 가볍게 마취시킨 다음 복부를 절개하여 헤파린 처리된 튜브(Franklin lakes, NJ07417, USA) 속으로 25개이지 주사기를 이용하여서 복대동맥으로부터 1.5 mL의 혈액을 채취하였다. 혈액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 얻었다. 액체 질소가스(-196°C)에 급속 동결 처리한 다음 생화학적 분석을 위해 -20°C에서 냉동 보관하였다. 혈액 내 중성지방(TAG, triacylglycerol), 총콜레스테롤(TC, total cholesterol), 고밀도지질단백질 콜레스테롤(HDL-C, high density lipoprotein cholesterol), 저밀도지질단백질 콜레스테롤(LDL-C, low density lipoprotein cholesterol) 및 인지질(phospholipid)은 Diagnostic kit (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, USA)를 이용하여 자동분석장치 (Hitachi 917, Japan)로써 측정하였다. 혈당은 Beckman glucose analyzer (Beckman instrument Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 간 기능효소 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)는 혈액 생화학적 자동분석기 (Fuji Dri-Chem 3500, Japan)로써 측정하였다.

2.4. 혈액 인슐린

상기 4항에서 기술한 바와 같은 방법으로 복대동맥으로부터 plain처리된 튜브(VACUETTE® Z Serum Sep Clot Activator tubes) 속으로 1.5 mL의 혈액을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청(serum)을 얻은 후 인슐린 ELISA kit (Shibayagi, Gunma, Japan)를 이용하여 측정하였다. 혈청은 ELISA kit의 각 well 에 25 μ L씩 넣고, 100 μ L의 enzyme conjugate solution을 첨가하여 plate shaker에서 1시간 동안 방치하여 항원-항체반응을 유도하였다. 1시간 후 상층액을 제거하고 wash buffer (350 μ L)를 이용하여 비특이적으로 결합된 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 세척하였다. 200 μ L의 substrate을 첨가하여 실온에서 15분 동안 효소반응을 유도한 뒤 50 μ L의 stop solution을 첨가하여 반응을 종결 후 microplate reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)에 의하여 450 nm에서 측정하였다.

2.5. 혈액 랩틴

지방세포로부터 분비된 혈청 랩틴의 농도는 항체에 효소를 결합시켜 항원-항체반응을 확인하는 96 well ELISA kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

2.6. 생체 유전자발현

비만 유도 랫드의 간에서 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 대한 sterol regulatory element binding proteins (SREPB-1 α , SREPB-2), peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α) 및 지방조직에서 β -actin에 대한 lipoprotein lipase (LPL) mRNA transcripts의 상대적인 수준을 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의해서 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 비만 유도 랫드의 간, 지방조직을 채취 후 액체질소에 급속 동결해서 -80°C 보관하였다. 30 mg의 간, 지방조직에 Xprep tissue RNA mini Kit (Philekorea Technology, PKT)의 lysis buffer를 사용하여 총 RNA를 추출 하였다. RNA 농도는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (USA)를 사용하여 260 nm에서 흡광도에 의해서 측정하였으며 추출된 RNA 300-500 ng/ μ L를 얻었다. 추출된 1 μ g RNA를 cDNA synthesis kit (PKT)를 이용하여 1st strand cDNA를 합성하였다. cDNA는 70°C 5분, 42°C 30분, 85°C 5분 배양하여 증폭하였다. 최종적으로, cDNA는 RT-PCR에 의해서 주형(template)으로써 사용되고 reference gene인 GAPDH에 대한 각 목표 유전자의 mRNA 전사에 관한 상대적인 농도를 확인하였다. RT-PCR은 Quantimix SYBR Kit (PKT)를 이용하였으며 cDNA를 증류수로써 1/5로 희석한 후 각 유전자 프라이머 (forward 및 reverse)를 혼합하여 수행하였다. 유전자 발현은 Eco Real-Time PCR (Illumina Inc.)에서 제시한 프로토콜의 메뉴얼에 따라서 실행하였다. GAPDH와 β -actin은 house keeping gene으로써 mRNA 의 농도 조절로써 사용하였다. specific oligonucleotide primer (Table 3)는 미국의 NCBI로부터 검색하여 전문회사에 제작의뢰해서 사용하였다[19].

Table 4. Lists of primers used in this study

GAPDH	forward	5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
	reverse	5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'
SREPB-1 α	forward	5'-ATGGACGAGCTGCCCTTCGGTGAGGCGGCT-3'
	reverse	5'-CCTGGCGATGGCTGTGTGCTG-3'
SREPB-2	forward	5'-TTTGTGTCAGCAATCAAGTGGGAGAGTTC-3'
	reverse	5'-GCTGCGTTCTGGTATATCAAAGGCTGC-3'
PPAR α	forward	5'-CCCTCTCTCCAGCTTCCAGCCC-3'
	reverse	5'-CCACAAGCGTCTTCTCAGCCATG-3'
β -actin	forward	5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3'
	reverse	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
LPL	forward	5'-CAGCTGGGCCTAACTTTGAG-3'
	reverse	5'-AATGGCTTCTCCAATGTTGC-3'

2.7. 임상병리학적 소견

비만 유도 랫드의 간, 복부지방 조직을 획득하여 3분 이내에 1 mm³로 자른 다음 0.1M cacodylate buffer, pH 7.4로 완충시킨 후 4% glutaraldehyde로써 전 고정 및 수세하였다. 2% osmium tetroxide (OsO₄, 2%)로 후 고정, 완충용액으로 세척하였고 에탄올로써 탈수하였다. Propylene oxide로 치환, EPON resin으로 조직 내의 탈수용매를 대체하고 채워주었다. 60°C에서 포매, 중합하고 ultramicrotome로 300 nm 두께의 절편을 제작하여 toluidine blue로 염색하였다. 에너지 여과 투과전자현미경(EF-TEM, Leo 912AB, Carl Zeiss Inc., Germany)으로 간, 지방세포를 관찰하였다.

2.8. 통계분석

얻어진 모든 자료에 대한 통계적 분석은 SPSS statistical software program (version 20.0, IBM Inc., Armonk, NY, USA)을 이용하였다. one-way analysis of variance과 Duncan's multiple range test에 의해서 각 처리구의 평균 값에 대한 통계적인 유의차 ($p < 0.05$)를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 고지방식이에 의한 비만 유도 랫드의 성장 능력

고지방식은 일반식을 섭취한 랫드와 비교

할 때 체중의 유의한 증가에 의해 입증된 바와 같이 효율적으로 비만을 유도하였다(Fig. 1). 비만 유도실험 종료 시에 고지방식이 섭취군에서 평균 체중(405 ± 6.2 g)은 일반식이 섭취군(374 ± 5.72 g)에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$). 일일 식이섭취량은 일반식이 섭취군(22.12 ± 2.07 g) 비교할 때 고지방식이 섭취군(19.14 ± 2.22 g)에서 낮았으나 식이효율은 유의하게 높았다($p < 0.05$). 이러한 결과는 고지방식으로부터 높은 열량을 섭취한 점에 기인하였을 것으로 판단된다.

3.2. 혈액 지질, 혈당, 간 기능효소

HFD를 급여하여 유도된 비만 모델 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험식이를 급여 후 조사한 혈액 지질, 혈당과 간 기능관련 효소의 변화는 Table 5, Fig. 2와 같다. 혈액 HDL-C, 인지질을 제외한 지질 프로파일, 혈당 및 간 기능 효소 ALT, AST 수준은 n-6/n-3 비율 0인 대조군과 비교할 때 4:1, 15:1, 30:1 처리군에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 혈액 중성지방은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군에서 각각 22.21, 9.30, 11.21%, 총 콜레스테롤 20.60, 14.07, 9.58%, LDL-C 52.96, 43.29, 12.23%, 혈당 15.71, 10.54, 6.18%, ALT 11.97, 5.62, 6.81%, AST 9.13, 8.11, 0.27% 낮아졌으며 특히, 4:1 처리군에서 가장 높은 감소가 나타났다($p < 0.05$). 이와 반대로, HDL-C 28.38, 20.20, 9.45%, 인지질 80.39, 73.83, 57.26% 각각 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 결과는 비만 랫드에서 n-6/n-3 비율 4:1의 식이를

Table 5. Levels of plasma lipid profiles, glucose, AST and ALT of obesity rats fed high-fat diet (mg/100 mL)

Item	Dietary		n-6/n-3	
	0	4:1	15:1	30:1
Triacylglycerol	140.9±7.15 ^{1)a}	109.6±3.38 ^c	127.8±6.49 ^b	125.1±5.75 ^b
Total cholesterol	102.2±3.06 ^a	81.15±2.65 ^d	87.82±4.01 ^c	92.41±5.05 ^{bc}
HDL-C	33.76±1.05 ^c	43.34±2.18 ^a	40.58±2.02 ^a	36.95±1.66 ^b
LDL-C	34.74±1.74 ^a	16.34±0.73 ^d	19.70±1.08 ^c	30.49±0.97 ^b
Glucose	218.3±10.95 ^a	184.0±4.72 ^c	195.3±5.58 ^b	204.8±10.24 ^{ab}
Phospholipid	62.17±2.67 ^c	112.15±5.67 ^a	108.07±5.20 ^{ab}	97.77±4.49 ^b
ALT (U/L)	60.9±3.05 ^a	53.61±2.03 ^c	57.48±1.07 ^b	56.75±2.82 ^b
AST (U/L)	91.57±4.46 ^a	83.21±3.16 ^b	84.14±4.20 ^b	91.32±3.66 ^a

¹⁾Values are expressed as mean±standard deviation (n=10).

^{a,b,c,d}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=5, p<0.05).

섭취가 혈액 중 유해 지질과 간 기능을 나타내는 효소의 수준을 낮춘다는 점을 보여준다. Lee 등은 n-6/n-3가 서로 다른 식이를 부모 세대부터 계속하여 섭취 후 성장한 차세대 랫드에서 1:1, 8:1 처리구가 대조구 및 19:1 처리구와 비교할 때 혈액 중 유해한 지질과 간 기능효소 수준이 낮아졌으며 본 결과를 뒷받침해주고 있다[20]. n-6/n-3가 낮은 식이의 섭취는 간으로부터 새롭게 합성, 분비되는 LDL을 낮추고 동시에 간에서 영양소의 대사작용을 촉진하여 줌으로써 ALT, AST 수준을 낮추는 것으로 본다[20, 21]. 간에서 유리지방산의 유입 양이 높아지면 중성지방이 증가하여 비만으로 인한 혈액 지질의 나쁜 변화가 나타날 수 있다[22].

3.3. 혈액 인슐린과 렙틴

비만 모델 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험식이를 급여 후 조사한 혈액 인슐린과 렙틴의 변화는 Table 6, Fig. 3과 같다. 인슐린과 렙틴은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 처리군에서 유의하게 낮았으며 특히, 4:1 처리군이 가장 낮게 나타났다(p<0.05). 인슐린은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군에서 각각 37.57, 29.59, 15.73%, 렙틴은 각각 45.98, 41.10, 8.90% 유의하게 낮아졌으며 특히,

4:1 처리군에서 가장 높은 감소가 있었다 (p<0.05). 본 결과로부터 n-6/n-3 비율 4:1 이하의 식이를 섭취한 비만 랫드에서 혈액 인슐린과 렙틴의 수준을 낮추어 줌으로써 항비만 효과를 갖는다는 사실을 확인할 수 있었다. 고지방식은 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐는 물론 갈색 지방조직을 제거한 후 정상 및 형질전환 마우스 모델에서 혈장 렙틴 수치와 체지방량을 증가시켰다[23]. 설치류 임신에서 인슐린 저항성은 포화지방이 많은 고지방식에 의해 쉽게 유도되며 과식증, 체중증가 및 비만, 인슐린 민감성 감소, 혈액 지질대사 이상 및 혈압상승을 갖는 렙틴의 자손 표현형으로 이어진다[24]. 그러나 혈장 렙틴과 인슐린에 대한 식이 n-6/n-3 비율의 영향은 알려져 있지 않다.

3.4. 지방대사 관련 유전자 발현

비만 모델 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험식이를 급여 후 조사한 지방대사 관련한 생체 유전자 발현은 Fig. 4와 같다. 간 조직에서 지방합성에 관여하는 SREPB-1 α , SREPB-2 mRNA는 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 처리군에서 하향조절 하였으며 특히, 4:1 처리군이 가장 낮았고 각 처리군 사이의 유의적인 차이가 나타났다(p<0.05). 지방분해에 관여하는 간 조직

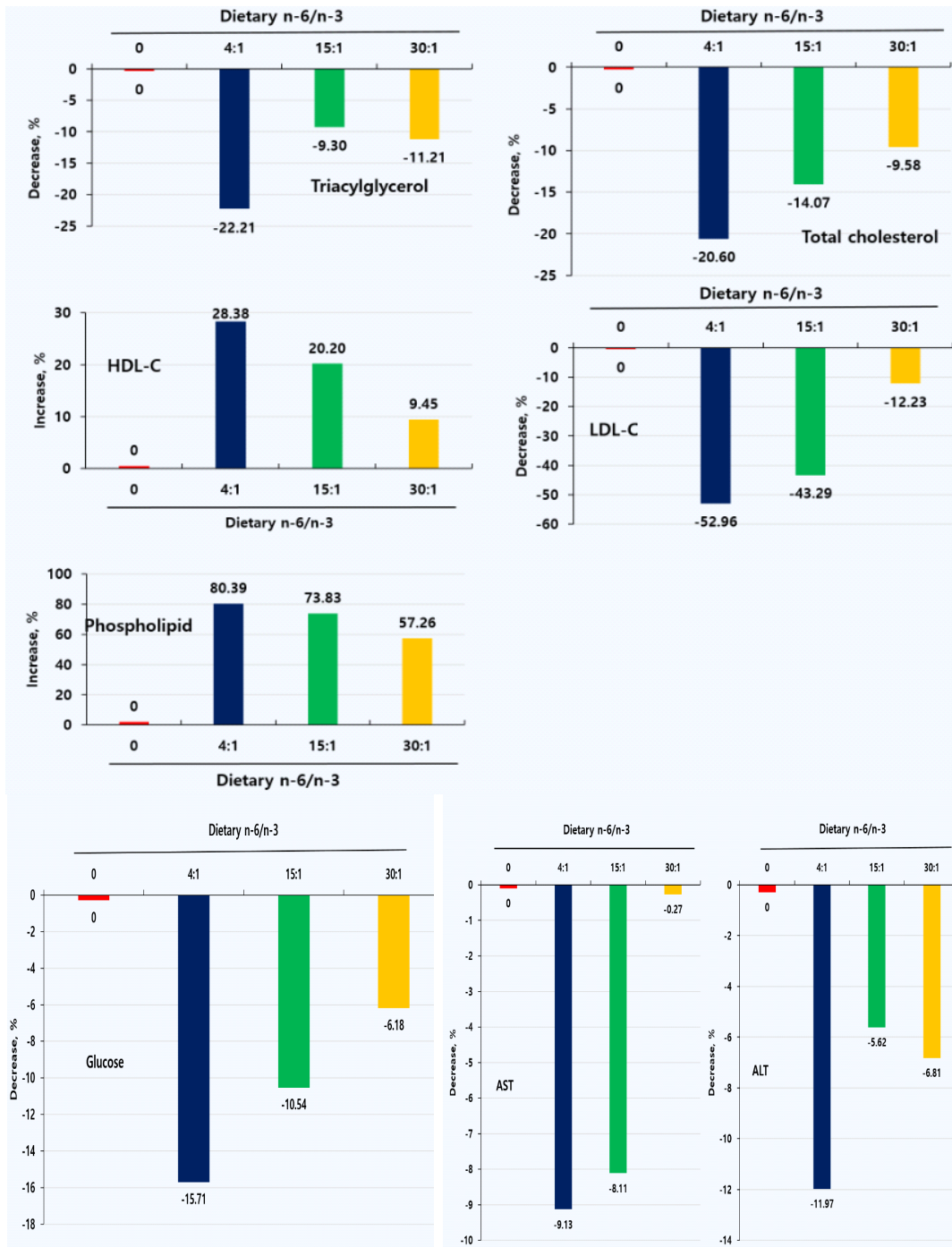


Fig. 2. Changes in plasma lipid profiles, glucose, AST and ALT of obesity rats fed high-fat diet.

Table 6. Levels of serum insulin and leptin of obesity rats fed high-fat diet

Item	Dietary			
	0	4:1	15:1	30:1
Insulin (ng/mL)	35.72±2.44 ^{1)a}	22.30±2.51 ^d	25.15±2.68 ^c	30.10±2.70 ^b
Leptin (pg/L)	4.72±0.25 ^a	2.55±0.27 ^b	2.78±0.33 ^b	3.78±0.35 ^{ab}

¹⁾Values are expressed as mean±standard deviation (n=10).

^{a,b,c,d}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=5, p<0.05).

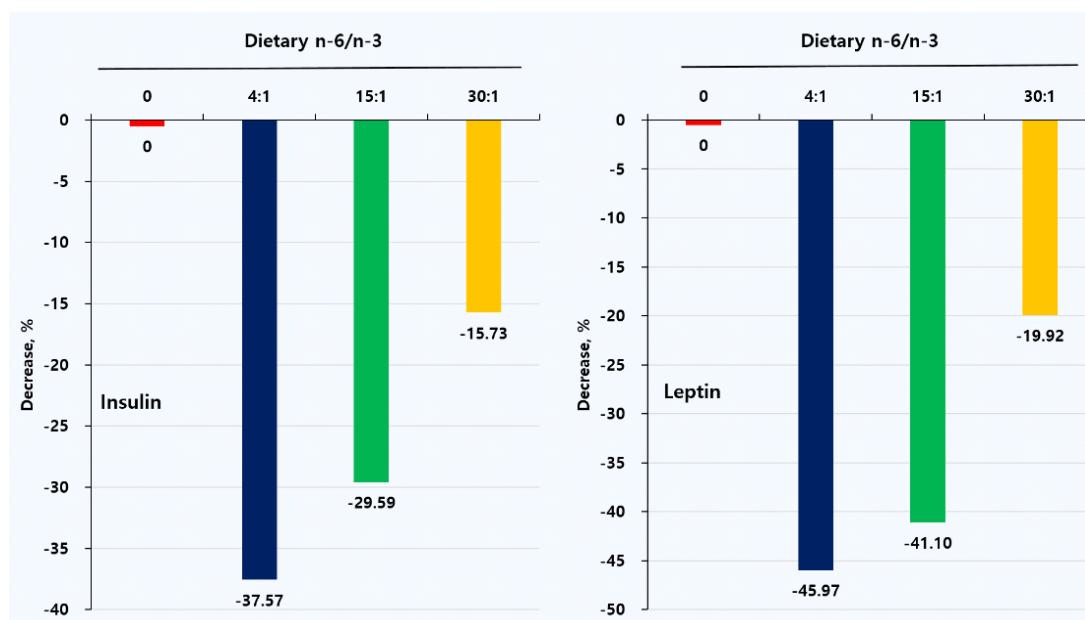


Fig. 3. Changes in levels of serum insulin (A) and leptin (B) of obesity rats fed high-fat diet.

의 PPARs, 지방조직의 LPL-mRNA는 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 처리군에서 상향조절하였으며 특히, 4:1 처리군이 가장 높았고 각 처리군 사이의 통계적인 유의차가 있었다(p<0.05). 혈액 중 유해한 지질 LDL-C와 중성지방은 유전인자 및 식이에 의해 조절할 수 있다[25]. 지질대사에 포함된 여러 가지 목표 유전자 가운데 SREPBs (SREPB-1 α , SREPB-1c, SREPB-2)는 콜레스테롤, 지방산, 중성지방 및 인지질의 합성 및 획득에 포함된 30개 이상의 유전자발현을 직접적으로 활성화하는 중요한 전사활성 유전자이다[26]. SREPB-1 α 는 콜레스테롤과 지방산 생합성 효소와 LDL 수용체 전사유전자의 발현을 촉진 조절하지만, SREPB-1c는 중성지방과지방산의

합성에 포함된 유전자를 선택적으로 활성화하는 한편 SREPB-2는 HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase, LDL 수용체 전사유전자의 발현을 촉진조절해서 콜레스테롤 항상성 유지에 중요한 유전자를 조절한다[27]. PPARs는 유전자발현을 조절하는 전사인자로서 핵수용체 단백질이다. PPAR- α 는 간에서 지질대사의 주요 조절자로서 PPAR- α 의 활성화는 지방산 수송 그리고 퍼옥시좀과 미토콘드리아에서 지방산의 베타 산화에 포함된 유전자의 촉진 조절에 의한 지방산의 획득, 이용 및 분해를 높여준다[28]. 결과는 비만 랫드에서 n-6/n-3 비율 4:1 식이의 섭취기간, 지방조직의 콜레스테롤 대사를 조절하는 SREPB-1 α , SREPB-2, PPAR α , LPL-mRNA

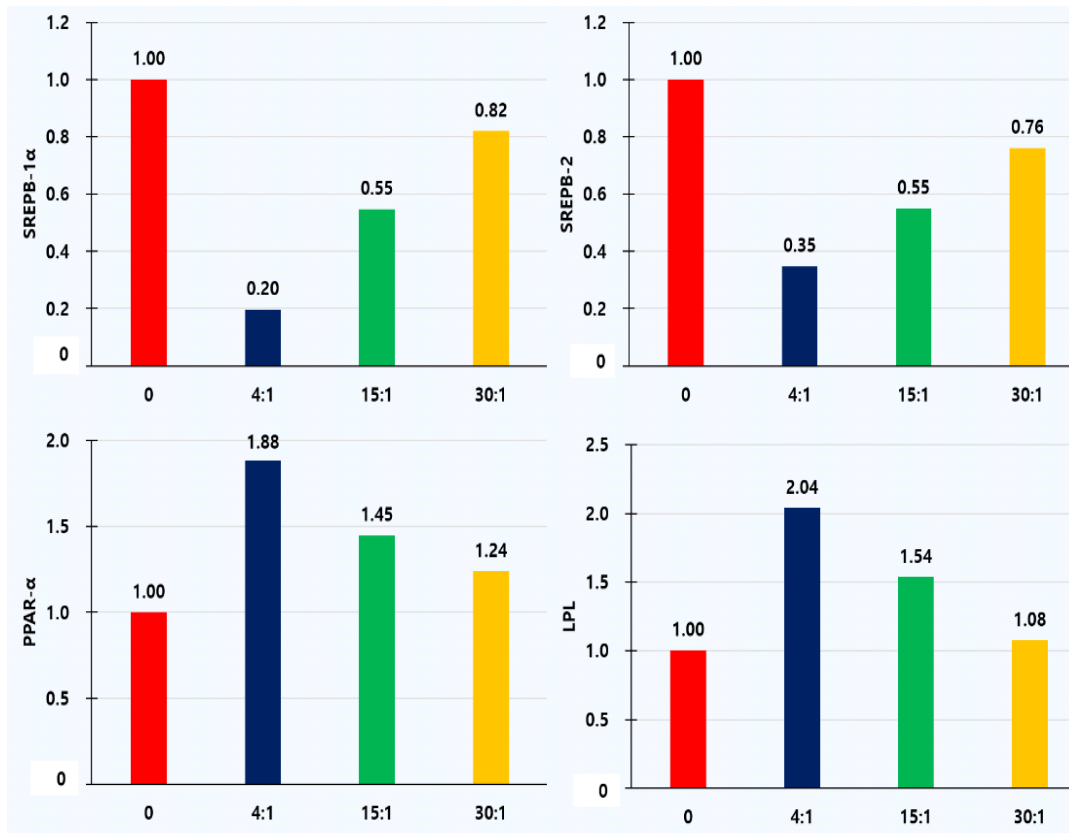


Fig. 4. Gene expression of obesity rats fed high-fat diet.

수준을 조절하여 줌으로써 혈액 지질을 낮춘다는 새로운 사실을 확인하였다.

3.5. 간, 지방조직의 지방세포 크기 및 임상병리학적 소견

비만 모델 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험식을 급여 후 조사한 간, 지방조직 내 지방세포의 크기(Fig. 5) 및 병리학적 소견(광학 현미경 관찰, Fig. 6)은 다음과 같다. 간 조직에서 지방세포의 크기(m^2)는 n-6/n-3 비율 30:1(7197), 대조군(7049), 15:1(6989), 4:1(6615) 순서로 낮았으며, 지방조직에서 조사한 지방세포의 크기(m^2)는 대조군(10510), 30:1(10087), 15:1(9914), 4:1(9074) 순서로 낮았다. 간 조직에서 중심정맥을 위주로 분포한 간 세포의 형태는 4:1 처리군이 가장 우수하게 나타났으나 15:1, 30:1, 대조군 순서로 간 세포의 형태가 틀어짐을 보이면서 간 조직 내 지방과립이

축적되는 것을 알 수 있었다. 특히, 대조군에서 간 조직 내 지방세포가 침착되고 있음을 확인하였다. 지방조직에서 조사한 지방세포의 크기는 대조군에서 가장 크게 나타났으며 30:1, 15:1, 4:1 순서로 작아졌다. 비만은 간, 지방조직 내 지방과립의 축적을 유도함으로써 비정상적인 혈액 지질 대사 및 고지혈증, 고혈압, 동맥경화증 및 암을 포함하는 많은 만성질환과 깊은 관련이 있다[29].

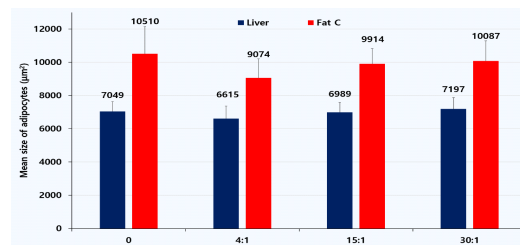


Fig. 5. Mean size of adipocyte and liver cell of obesity rats fed high-fat diet.

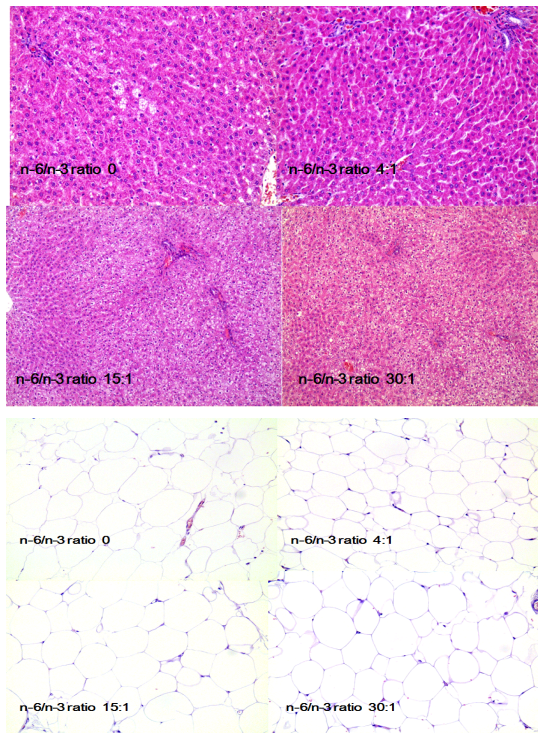


Fig. 6. Histopathology of the liver (up) and fat tissue (down) of obesity rats fed high-fat diet. Note accumulation of lipid droplets in the cytoplasm of hepatocytes of rat fed diets containing different n-6/n-3 fatty acid ratio. Compare them with the normal feature in C. H&E. Mag.=X200

4. 결론

본 연구는 고지방식이로 유도한 비만 모델동물에서 n-6/n-3 비율이 혈액 지질대사의 생화학적 메커니즘을 조사하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 실험 처리구는 대조군(n-6/n-3 비율 없음)과 3개의 처리군(n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1)으로 구분하였다. 혈액 HDL-C, 인지질을 제외한 지질 프로파일, 혈당, ALT, AST, 혈액 인슐린과 렙틴의 농도는 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 지방산 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리구가 낮았다. 간 조직에서 SREPB-1 α , SREPB-2 mRNA는 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 지방산 비율 처리구에서 하향조절 하였으며, 간 조직의

PPARs, 지방조직의 LPL-mRNA는 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 지방산 비율 처리구에서 상향 조절 하였다. 지방세포의 크기는 간 조직에서 n-6/n-3 지방산 비율 30:1, 대조군, 15:1, 4:1 순서로 낮아졌으며, 지방조직은 대조군, 30:1, 15:1, 4:1 순서로 낮았다.

감사의 글

“이 논문은 본 연구는 교육부 한국연구재단 2018년도 기본연구지원사업 (C1012520-01-01) 및 2017년도 강원대학교 대학회계의 지원을 받아 수행한 연구임”

References

1. A. P. Simopoulos, “An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio Increases the risk for obesity”, *Nutrients*, Vol.8, PP. 128-135, (2016).
2. G. Schmitz, J. Ecker, “The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids”, *Prog. Lipid Res*, Vol.47, pp. 147-155, (2008).
3. 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).
4. A. M. El-Badry, R. Graf, P. A. Clavien, “Omega 3-Omega 6: What is right for the liver?”, *J. Hepatol*, Vol.47, pp. 718-725, (2007).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
 9. H. Q. Liu, Y. Qiu, Y. Mu, X. J. Zhang, L. Liu, X. H. Hou, L. Zhang, X. N. Xu, A. L. Ji, R. Cao, R. H. Yang, F. Wang, “A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats”, *Nutr. Res*, Vol.**33**, pp. 849-858, (2013).
 10. A. P. Simopoulos, “The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids”, *Biomed. Pharmacother*, Vol.**56**, pp. 365-379, (2002).
 11. M. C. Rudolph, B. E. Young, D. J. Lemas, C. E. Palmer, T. L. Hernandez, L. A. Barbour, J. E. Friedman, N. F. Krebs, P. S. MacLean, “Early infant adipose deposition is positively associated with the n-6 to n-3 fatty acid ratio in human milk independent of maternal BMI”, *Int. J. Obes*, Vol.**41**, pp. 510-517, (2017).
 12. B. M. Spiegelman, J. S. Flier, “Obesity and the regulation of energy balance”, *Cell*, Vol.**104**, pp. 531-543, (2001).
 13. J.M. Friedman, “Modern science versus the stigma of obesity”, *Nat. Med*, Vol.**10**, pp. 563-569, (2004).
 14. S. M. Sternson, B. J. Nicholas, Z. F. Cao, “Neural circuits and motivational processes for hunger”, *Curr. Opin. Neurobiol*, Vol.**23**, pp. 353-360, (2013).
 15. L. I. Yang, Z. X. Song, W. Cao, Y. Y. Wang, H. X. Lu, F. Guo, H. Yang, J. Chen, S. K. Wang, G. J. Sun, “Effects of diets with different omega-6/omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in mice fed high-fat diets”, *Wei Sheng Yan Jiu*, Vol.**45**, pp. 436-441, (2016).
 16. L. I. Yang, Z. X. Song, H. Yin, Y. Y. Wang, G. F. Shu, H. X. Lu, S. K. Wang, G. J. Sun, “Low omega-6/omega-3 PUFA ratio improves lipid metabolism, inflammation, oxidative stress and endothelial function in rats using plant oils as omega 3 fatty acid source”, *Lipids*, Vol.**51**, pp. 49-59, (2016).
 17. J. Hwangbo, S. O. Park, B. S. Park, “Lipid lowering mechanism of sulfur-fed grain larvae extract in high-fat induced obesity rats”, *J. Korean Oil Chem*, Vol.**31**, pp. 572-583, (2014).
 18. J. Bajerska, S. Mildner-Szkudlarz, E. Pruszyńska-Oszmalek, “May rye bread enriched with green tea extract be useful in the prevention of obesity in rats?”, *Acta Alimentaria*, Vol.**42**, pp. 69-78, (2013).
 19. B. S. Park, S. O. Park, “Extracts of housefly maggot reduces blood cholesterol in hypercholesterolemic rats”, *J. Korean Oil Chem*, Vol.**31**, pp. 101-112, (2014).
 20. S. Lee, J. S. Kim, 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”, *J. Korean Oil Chem*, Vol.**34**, pp. 315-326, (2017).
 21. O. V. Ketsa, M. M. Marchenko, “The effect of diet ratio polyunsaturated fatty acids of omega-3 and omega-6 families on activity of aminotransferases and gamma-glutamyltransferase in rat blood serum”, *Vopr. Pitan*, Vol.**83**, pp. 27-32, (2014).
 22. S. M. Grundy, “Obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease”, *J. Clin. Endo. Metab*, Vol.**89**, pp. 2595-2600, (2004).
 23. P. C. Elodie, T. Mariano, G. M. Michèle, V. Annie, P. Nathalie, S. Gérard, W. R. Salwa, “Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids up-regulate plasma leptin in insulin-resistant rats”, *J. Nutr*, Vol.**132**, pp. 2235-2240, (2002).
 24. B. B. Albert, M. H. Vickers, C. M.

- Reynolds, S. A. Segovia, J. G. B. Derraik, M. L. Garg, D. Cameron-Smith, P. L. Hofman, W. S. Cutfield, "Fish oil supplementation to rats fed high-fat diet during pregnancy prevents development of impaired insulin sensitivity in male adult offspring", *Sci. Rep.*, Vol.7, pp. 5595-5676, (2017).
25. X. Liu, A. Zeng, T. Song, L. Li, F. Yang, Q. Wang, B. Wu, Y. Liu, X. Zhi, "Hypocholesterolemic effects of n-[(2-hydroxy-3-n,n-dimethylhexa decyl ammonium) propyl] chitosan chloride in high-fat-diet-induced rats", *J. Biomaterials Sci.*, Vol.23, pp. 1107-1114, (2012).
26. L. N. Rodríguez, J. A. Gutiérrez, J. Arriola, D. D. La, R. I. Garza, J. W. Fahey, S. O. Serna-Saldivar, "Broccoli (*Brassica oleraceavar. italica*) sprouts and extracts rich in glucosinolates and isothiocyanates affect cholesterol metabolism and genes involved in lipid homeostasis in hamsters", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.59, pp. 1095-1103, (2011).
27. N. Rotllan, C. Fernández, "MicroRNA regulation of cholesterol metabolism", *Cholesterol*, Vol.2012, pp. 8-15, (2012).
28. A. C. Frazier, J. M. Ordovas, R. J. Straka, J. E. Hixson, I. B. Borecki, H. K. Tiwari, D. K. Arnett, "The PPAR alpha gene is associated with triglyceride, low-density cholesterol and inflammation marker response to fenofibrate intervention: the GOLDN study", *The Pharmacogenomics J.*, Vol.12, pp. 93-95, (2012).
29. P. G. Kopelman, "Obesity as a medical problem", *Nature*, Vol.404, pp. 635-643, (2000).