

절식-재급여가 흰쥐 지방조직의 Lipoprotein Lipase활성과 지방합성 능력에 미치는 영향 : 재급여시 식이섭취 제한효과

이재준 · 정정수* · 김진걸* · 최병대**†

충북대학교 농업과학기술연구소

*충북대학교 축산학과

**경상대학교 해양생물이용학부/해양산업연구소

Effects of Fasting-refeeding on Rat Adipose Tissue Lipoprotein Lipase Activity and Lipogenesis : Influence of Food Restriction during Refeeding

Jae-Joon Lee, Chung-Soo Chung*, Jin-Geol Kim* and Byeong-Dae Choi**†

Agricultural Science & Technology Institute, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

*Dept. of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

**Dept. of Marine Bioscience, Gyeongsang National University/Institute of
Marine Industry, Tongyeong 650-160, Korea

Abstract

The current study was undertaken to determine the prolonged effects of fasting-refeeding on the lipoprotein lipase (LPL) activity and lipogenesis of adipose tissue in male Sprague-Dawley rats and to investigate the effects of various degrees of food restriction during refeeding on the LPL activity and lipogenesis. The control group (n=5) was fed ad libitum and killed in the fed state at the beginning of the experiment. All rats except control group were fasted for 2 days (n=50). Five rats were killed at the end of fasting and others (n=45) were refed either ad libitum (ad libitum group) or mildly restricted (20% food restricted group), or severely restricted diet (40% food restricted group). Rats were killed on the day of 7th, 14th, and 21st of refeeding. Lipogenesis was determined by the amount of glucose converted to the total lipid. Body weight and epididymal adipose tissue weight returned to control states by 5 days in ad libitum group and by 14 days in 20% food restricted group. As expected, in 40% food restriction during refeeding weight and epididymal adipose tissue weight did not return to control states until day 21. On day 21 after refeeding, the serum total cholesterol concentration of ad libitum group was significantly ($p<0.05$) higher than that of control group. The serum HDL-C concentration of 40% food restricted group during refeeding was significantly ($p<0.05$) higher than that of control group. However, there were no significant differences in serum HDL-C/total cholesterol (TC) ratio and triglyceride concentration among the groups. Fasting for 2 days decreased lipogenesis and LPL activity ($p<0.05$). On day 21 after refeeding, the lipogenesis of ad libitum group was significantly ($p<0.05$) lower than that of control group. The lipogenesis of 40% food restricted group during refeeding was significantly ($p<0.05$) higher than that of control group. Ad libitum group and 20% food restricted group during refeeding allowed heparin-releasable (HR) LPL or total extractable (TE) LPL activity to return to control states. 40% food restricted group during refeeding delayed the return of HR-LPL or TE-LPL activity to return to control states until day 21 of refeeding. These results suggest that food restriction during refeeding can partially or completely prevent the overshoot of LPL activity, and this may influence the rate of lipid accumulation in adipose tissue during refeeding.

Key words: fasting-refeeding, food restriction, lipogenesis, lipoprotein lipase

서론

최근 비만(obesity)으로 야기될 수 있는 여러 성인병 때문에 비만을 줄이는 것이 전 세계적으로 인류 보건상

의 중요한 과제가 되었다. 미국의 경우 현재 전체성인 인구의 30%, 소아의 25% 이상이 비만이며, 이들이 체중감량을 위해 사용하는 비용은 1년에 약 30억 달러 이상이다(1). 우리나라에서도 비만 어린이들이 현저히 증가하고

†To whom all correspondence should be addressed

있으며, 서울시내 초·중·고교생들 중 최근 18년간(1979~1996년) 비만이 이환율이 남자의 경우 4.6배, 여자의 경우 3.2배가 증가하였다(2).

비만 발생의 주요 원인은 지방섭취 그 중에서도 동물성 지방 과다섭취로 인한 에너지 과잉섭취 때문에 비만중에 걸릴 확률이 매우 높다는 역학조사(3)가 보고되면서 비만 발생의 요인에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. LPL은 지방세포에서 합성되어 분비되고 모세혈관의 내피세포로 수송되어 여기서 중성지방(triglyceride, TG)이 풍부한 지단백질(chylomicron과 VLDL)을 monoacylglycerol과 유리지방산으로 가수분해하는 주된 효소이다. 사람의 경우 내인성 유리지방산합성이 매우 적으므로 LPL의 작용으로 생성된 유리지방산은 지방조직의 중성지방합성의 주원료로 이용된다(4-10). 이와 관련하여 Eckel(4)은 지방조직내 LPL활성은 식후에 증가하고, LPL이 혈액내에 순환하고 있는 지단백질(lipoprotein)중 VLDL과 chylomicron-TG를 가수분해하여 유리지방산을 생성하며, 이 유리지방산은 다시 LPL에 의해 지방조직내로 유입된 후 reesterification되어 중성지방 형태로 저장된다고 보고했다. Cruz와 Williamson은 흰쥐 지방조직내 LPL활성과 중성지방의 지방조직내로의 유입은 서로 상관관계가 매우 높음을 시사하면서 LPL이 지방조직내 지방축적을 조절하는 인자라고 했다(11).

이와 같이 LPL이 체내 지방축적 정도를 잘 나타내는 지표라는 사실이 인지되면서 영양상태(식이섭취제한, 에너지제한, 절식, 재급여, 식이급여횟수 및 식이급여형태 등)가 LPL활성에 미치는 영향에 관한 연구가 다양하게 진행되었다(12-15). Benson과 Bensadoun(12)은 흰쥐의 경우 LPL활성은 절식시 저하되었다가, 재급여시 다시 증가되었음을 보고하였다. 아울러 중성지방이 지방조직내로의 유입도 조사하였는데 LPL활성과 마찬가지로 절식시에는 지방조직내로 중성지방의 유입이 저하되었으나, 재급여시 다시 증가됨을 보고하였다. 절식 후 재급여시 식이섭취 제한의 효과에 관하여 Fried 등(13)에 의해 연구되었는데, 절식 후 재급여시 식이섭취량을 제한하였을 경우 지방조직내 LPL활성 및 지방세포 크기가 현저하게 저하되었음을 보고하면서 재급여시 식이섭취 제한이 지방축적 저하를 위해 매우 중요함을 시사하였다. 그러므로 LPL은 지방조직 내 지방축적의 중요한 조절인자로, 식이섭취 후 LPL활성은 증가되고 절식 후 감소된다(14,15). 절식시 LPL활성이 저하될 뿐만 아니라 식이섭취량 및 지방세포의 크기가 저하되고, 체중감소 및 체지방함량이 저하된다. 그러나 절식 후 식이를 재급여시 LPL활성과 체지방함량 및 체중이 다시 증가되므로 절식 후 식이를 재급여할 경우 식이섭취 제한이 무엇보다 매우 중요하다. 아울러 Bertrand 등(16)은 흰쥐의 경우 에너지제한군(자유섭취군의 60%)이 자유섭취군(ad libitum)에 비해 체지방이 감소되었는데, 특히 부고환 및 신장주위 지방 및 평균

지방세포 용적이 적었으며, 지방세포수도 현저히 감소하였음을 보고하였다. 그러므로 식이섭취 혹은 에너지 제한은 체내의 지방축적 감소에 매우 중요한 점으로 일반적으로 인정되고 있다 따라서 비만을 줄이는 가장 확실한 방법이 식이섭취 제한이다

또한 쥐의 부고환 지방조직을 이용한 지방합성의 측정 은 외국에서는 상당히 많이 수행되었는데 국내에서는 매우 적은 편이다. Sun 등(17)이 90 g된 흰쥐에게 에너지섭취량(식이 섭취량)을 제한하고 난 뒤, *in vitro*에서 지방합성을 측정한 결과 대조군에 비해 에너지 제한군의 지방합성량이 더 높았다고 보고하였다. 따라서 쥐 체내에서 일어나는 총체적인 지방축적의 정도를 파악하기 위해서는 LPL의 활성도 함께 측정할 것이 요구된다.

따라서 본 연구는 2일간 절식시킨 후 재급여시 식이섭취량을 제한 급여하였을 경우 흰쥐의 지방조직내 지방축적에 어떻게 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 지방조직내 지방축적 상태를 잘 나타내어 주는 지표인 LPL활성과 지방합성량을 측정하였고, 아울러 혈중 중성지방함량과 lipoprotein pattern도 이들 요인에 의해 어떻게 영향을 받는지를 구명하고자 했다

재료 및 방법

시험동물 및 사육관리

시험동물은 평균체중 311 g Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 55마리를 구입하여 환경에 적응시키기 위해 일반배합사료로 2주간 사육한 후, 체중에 따라 각 실험군 당 5마리씩 11군으로 나누어 완전 임의배치하여 1마리씩 분리 사육하였다. 시험동물 사육실의 환경온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도는 $65 \pm 5\%$ 로 유지하였으며, 명암은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 대조군(control)은 실험 첫째 날 5마리를 식이 섭취상태에서 바로 희생시켰고, 나머지 쥐(50마리)는 2일간 절식시켰다. 절식 후 이 중 5마리의 쥐를 희생하여 절식군(fasted)으로 두었으며 그 외의 나머지 쥐(45마리)는 절식 후 식이를 재급여하였다. 재급여시 식이섭취를 세수준(100%, 80% 및 60%)으로 달리하여 급여하였는데, 무제한급여군인 ad libitum group과 제한급여군인 20% food restricted group과 40% food restricted group으로 나누어 실시하였다. 재급여 후 7일, 14일 및 21일 되는 날 각 처리 당 5마리의 흰쥐를 단두하여 희생하였다 식이섭취 제한군의 식이급여량은 2일 절식 후 재급여 1주 동안은 대조군의 식이섭취량을 근거로 조절하였고, 재급여 2주와 3주 동안은 ad libitum group의 식이섭취량을 근거로 해서 매주 조절하였으나 대조군이나 ad libitum group의 1일 식이섭취량이 거의 같아 22.36 g이었으며, 이것을 근거로 20% food restricted group은 17.89 g, 40% food restricted group은 13.42 g씩 매일 급여

하였다. 시험식은 식이섭취량을 정확히 측정하기 위해 일반배합사료를 곱게 갈아서 사료통에 넣어 급여하였다. 식이섭취 제한군의 식이는 완전히 섭취되었는가를 알아보기 위해서 매일 사료통을 점검하였으며, 체중 및 무제한급여군의 식이섭취량은 매일 정기적으로 측정하였다. 물은 전 시험기간 자유급여하였다.

시료채취

시험동물은 대조군, 절식군 및 재급여 3군(ad libitum group, 20% food restricted group 및 40% food restricted group)으로 시험계획에 따라 실험당일, 2일 절식 후, 재급여하면서 각각 7일, 14일 및 21일째 식이섭취 상태에서 CO₂로 가볍게 마취시킨 다음 단두절단(decapitation)하여 채혈한 다음 즉시 해부하여 부고환 지방조직(epididymal adipose tissue)을 분리하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 분리한 부고환 지방조직은 적출 후 즉시 냉장 생리식염수(0.9% NaCl)로 세척하고, 여과지로 표면의 수분을 제거하여 중량을 측정 한 후, LPL활성 측정을 위해서 약 20~50 mg 정도의 지방의 무게를 측정한다. 다음 효소활성이 떨어지지 않도록 methanol을 함유한 dry ice에 넣어 급속 동결시켜 분석 전까지 혈청과 함께 -80°C에 냉동보관하였다. 분석에 이용하였다. 아울러 부고환 지방조직의 일부는 무게측정 후, 곧바로 적당량의 지방조직(~20 mg)을 떼어 지방합성률 측정을 위하여 사용하였다.

지방합성률 측정

흰쥐의 지방조직내 지방합성률은 두 수준의 인슐린농도(0 혹은 10 ng/mL)에서 측정하였는데, Krebs-Ringer Bicarbonate(KRB) buffer에서 배양하는 동안 ¹⁴C-glucose가 ¹⁴C-lipid로 전환되는 양으로 Chung(18)의 방법에 의하여 측정하였다.

배양

지방조직을 떼어내어 약 20 mg의 크기로 작게 자른 후 이 지방조직편을 배양액이 들어 있는 vial에 넣고 95% O₂와 5% CO₂를 함유한 공기를 주입한 다음 뚜껑을 꼭 닫고 shaking water bath 37°C에서 2시간 동안 배양시켰다. 2시간이 지난 후 지방조직이 든 vial을 얼음속에 넣어 배양을 중단시킨 다음 1시간 후에 수분을 제거하고 각 지방조직의 무게를 측정하였다.

지방추출 및 지방합성률 계산

무게 측정이 끝난 후 지방조직편을 5 mL Dole's solution(isopropanol : 40, n-heptane : 10, 1 N H₂SO₄ : 1) 이 든 vial에 넣은 후 ultrasonic water bath에서 30분간 지방을 추출하였다. 이 vial에 3 mL hexane과 3 mL dH₂O를 넣은 후 지방이 포함된 상층 유기용매를 scintillation

vials에 넣고 추가로 1.5 mL의 hexane으로 행구었다. 유기용매를 dry-bath에서 증발시키고 난 뒤 5 mL scintillation cocktail을 넣고 liquid scintillation counter (LS 100C, Beckman Co., USA)로 ¹⁴C lipid의 activity를 측정했다. 지방합성은 포도당이 지방으로 전환된 양으로 측정했는데 KRB buffer에 함유된 labelling되지 않은 총 포도당양(5 mM, 3 mL에는 15 μmole)에, incubation vial에 포함된 총 ¹⁴C activity중 추출된 지방중에 포함된 것의 비율을 곱해서 구했다.

$$\text{Amount of lipogenesis} = 15 \mu\text{mole glucose}$$

$$\times \frac{\text{CPM in lipid}}{\text{total CPM}} \div \text{tissue weight}$$

※ CPM = count per minute

중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 총 콜레스테롤함량 분석

혈청의 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량 분석은 Ectachem analyzer(DT60 II, Johnson & Johnson Co., USA)를 사용하여 분석하였고, LDL-콜레스테롤함량은 Friedewald 등(19)의 방정식에 의거하여 구하였다.

$$\text{LDL-콜레스테롤함량} = \text{총 콜레스테롤} - \text{HDL-콜레스테롤} - \text{TG}/5$$

LPL활성 측정

LPL은 지방조직의 세포내액 및 세포외액 모두에 존재한다. 따라서 지방조직 부위별 LPL활성 및 LPL이 지방조직내 어떻게 분포되어 있는지를 알아보기 위하여 다음과 같은 2가지 방법에 의하여 측정했다.

Heparin-releasable LPL(HR-LPL) 활성 측정

Extracellular fraction에 존재하는 LPL을 Nilsson-Ehle과 Schotz방법(20)을 응용한 Fried와 Zechner방법(21)에 의하여 측정했다.

지방조직(약 20~40 mg)은 1% bovine serum albumin(BSA)와 heparin(10 U/mL)을 함유한 0.5 mL MI99(Hanks salts)에 넣은 후 shaking water bath 24°C에서 45분간 배양하여 효소분석용 시료를 만들었다. 효소활성을 위한 기질은 ³H-triolein에 phosphatidylcholine과 triolein을 넣고 냄새가 없어질 때까지 질소가스를 용액표면에 쪼여준 후, glyccrol을 첨가하여 6분 정도 sonication시켜 제조했다. 효소반응은 배양시킨 효소분석용 시료 150 μL와 ³H-triolein emulsion을 기초로 만든 기질 150 μL를 함께 넣은 다음 37°C에서 1시간 동안 배양시켜 수행하였고 이때 생성되는 free fatty acid의 radioactivity를 측정하여 HR-LPL활성을 계산하였다.

Total Extractable LPL(TE-LPL) 활성 측정

이 분석방법은 extracellular fraction 뿐만 아니라 intracellular fraction까지 즉 microsome안에 있는 잠재적인 LPL활성까지도 포함된 지방조직내 총체적인 LPL활성을 측정하는 방법이다. TE-LPL활성 측정은 Iverius와 Brunzell의 방법(22)으로 측정하였는데 먼저 detergent인 deoxycholate로 LPL을 추출한 다음 LPL활성을 측정했다. 지방조직(약 50 mg)은 0.5% deoxycholate을 함유한 ice-cold buffer(0.5% deoxycholate, 0.2 M tris, 0.25 M sucrose, 1% BSA, 10 U/mL heparin, 0.02% nonidet P40, pH 8.3) 0.2~0.3 mL를 첨가하여 glass homogenizer로 균질화한 후, 6초 동안 짧게 sonication시켰다.

Eppendorf microcentrifuge에서 시료는 12,000 rpm에서 15분간(4°C) 원심분리시킨 후, LPL활성을 측정하기 위하여 fat cake 아랫부분인 하층액을 취했다. 이 하층액과 deoxycholate를 함유하지 않은 ice-cold buffer와 1:5로 희석시킨 다음 희석액 150 µL에 효소활성을 위해 제조한 기질 150 µL를 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 후 HR-LPL활성 측정방법과 동일한 방법에 의해 radioactivity를 측정하여 계산하였다.

통계처리

본 시험에서 얻어진 결과는 SAS(Statistical Analysis System) package를 이용해서 통계분석하였다(23). 모든 실험 결과들은 평균과 표준오차로 나타내었고, 통계처리는 처리군간에 student t-test로 유의성을 검증하였다(24)

결과 및 고찰

체중 및 지방조직무게

절식 후 재급여시 식이섭취 제한이 체중 및 지방조직무게에 미치는 영향은 Table 1과 같다. 2일간 절식시킨 절식군의 체중은 개시체중(대조군)에 비해 약 37 g 정도 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$). 절식 후 재급여시 대조군 수준으로 도달하는데 ad libitum group은 Table에는 나타내지 않았지만 5일 정도, 20% food restricted group은 14일 정도 소요되었다. 재급여시 ad libitum group은 대조군 혹은 절식군과 비교하였을 때 재급여 전기간 동안 체중이 유의성 있게 증가했다($p < 0.05$). 절식 후 재급여시 20% food restricted group의 체중은 절식 후 7일째까지는 급격히 증가하였지만, 그 이후부터 시험이 종료될 때까지 체중이 거의 비슷하였다. 그러나 40% food restricted group은 절식 후 식이를 재급여하여도 계속적으로 체중이 저하되어 절식 전 수준(대조군)으로 도달하지 못하였으며, 절식군보다도 체중이 유의성 있게 낮았다($p < 0.05$).

부고환지방조직의 무게는 Table 1과 같이 절식군이 대조군의 지방조직무게보다 11% 정도 감소하였으나 유의

Table 1 Effects of fasting and food restriction during refeeding on rat body weight, body weight gain and epididymal fat pad weights

Group	Body weight (g)	Epididymal fat pads (g)
Control ¹⁾	310.89 ± 2.58 ⁵⁾	2.00 ± 0.14
Fasted (2 days)	274.44 ± 2.46 ^a	1.79 ± 0.12
Ad libitum group ²⁾		
7 days	320.13 ± 6.06 ^b	2.47 ± 0.14 ^{ab}
14 days	340.60 ± 5.15 ^{ab}	2.97 ± 0.15 ^{ab}
21 days	352.40 ± 1.66 ^b	3.18 ± 0.26 ^{ab}
20% food restricted group ³⁾		
7 days	292.20 ± 3.48 ^{ab}	1.95 ± 0.13
14 days	298.40 ± 3.59 ^b	1.83 ± 0.09
21 days	303.80 ± 1.66 ^b	2.04 ± 0.14
40% food restricted group ¹⁾		
7 days	262.27 ± 3.99 ^{ab}	1.19 ± 0.05 ^{ab}
14 days	259.20 ± 4.14 ^{ab}	1.27 ± 0.12 ^{ab}
21 days	242.80 ± 4.80 ^{ab}	0.82 ± 0.12 ^{ab}

¹⁾The rats in the control group were killed at the beginning of the experiment.

²⁾Ad libitum (100%, 22.36 g). ³⁾Mildly restricted diet (80%, 17.89 g/day), ⁴⁾Severely restricted (60%, 13.42 g/day) designated period.

⁵⁾Values are mean ± SE

^{a)}Significantly different from control group ($p < 0.05$)

^{b)}Significantly different from fasted group ($p < 0.05$)

차는 보이지 않았다. 2일간 절식시켰을 경우 체중감소의 주요인은 주로 glycogen이었고 이는 물과 함께 빠지므로 체중은 유의적으로 감소하지만 체지방함량의 감소는 그다지 크지 않은 것으로 여겨진다. 재급여시 ad libitum group의 지방조직무게는 재급여 후 7일째부터 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$). 20% food restricted group의 지방조직무게는 재급여 후 7일째 대조군 수준에 도달하였으며, 체중과 마찬가지로 재급여 전 기간 동안 대조군과 거의 비슷한 수준이었다. 40% food restricted group의 지방조직무게는 재급여 전 기간동안 대조군 뿐만 아니라 절식군에 비해서도 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$).

이와 같이 절식 후 재급여 기간 동안 식이섭취를 제한한군의 체중저하 및 지방조직의 무게 감소는 식이섭취량의 차이에서 기인된 결과로 사료된다. Krotkiewski 등(25)은 절식 후 재급여시 식이섭취 무제한군은 대사적응으로 인해 체지방 부위가 급속히 일어나지만, 식이섭취를 제한한군은 대사적응 및 체지방 부위가 제한되거나 혹은 예방하는 것으로 보고했다.

혈청 콜레스테롤 분포 및 중성지방함량

Table 2에서 보듯이 혈청 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 중성지방함량은 절식군과 대조군간에 유의차는 보이지 않았으나, 혈청 HDL-콜레스테롤함량은 절식군이 대조군에 비해 유의성 있게 높았다($p < 0.05$). 절식 후 재급여시 ad libitum group의 혈청내 HDL-콜레스테롤,

Table 2. Effects of fasting and food restriction during refeeding on serum total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-C/TC and triglyceride concentrations in rats

Group	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	HDL-C/TC ²⁾	Triglyceride (mg/dL)
Control	77.8 ± 1.9 ¹⁾	47.4 ± 2.2	16.08 ± 1.83	0.61 ± 0.02	71.6 ± 9.0
Fasted (2 days)	80.4 ± 1.1	55.2 ± 2.6 ^a	13.72 ± 2.66	0.69 ± 0.03	57.4 ± 2.2
Ad libitum group					
7 days	83.4 ± 3.8	49.8 ± 2.3	22.68 ± 2.59 ^b	0.60 ± 0.03	54.6 ± 5.4
14 days	80.2 ± 4.0	51.6 ± 2.2	16.28 ± 3.77	0.70 ± 0.03	61.6 ± 1.0
21 days	90.0 ± 4.8 ^a	50.4 ± 2.4	17.52 ± 5.07	0.66 ± 0.06	69.4 ± 11.3
20% food restricted group					
7 days	68.4 ± 3.8	47.0 ± 3.1	10.64 ± 3.37	0.69 ± 0.05	53.8 ± 4.4
14 days	79.2 ± 5.7	49.2 ± 2.9	18.28 ± 3.58	0.62 ± 0.02	58.6 ± 2.7
21 days	88.0 ± 11.5	52.8 ± 2.3	21.16 ± 8.51	0.63 ± 0.06	70.2 ± 11.5
40% food restricted group					
7 days	75.2 ± 3.5	56.8 ± 2.5 ^a	7.00 ± 0.95 ^a	0.76 ± 0.01	57.0 ± 3.6
14 days	83.4 ± 4.6	55.6 ± 1.1 ^a	16.52 ± 3.74	0.67 ± 0.04	56.4 ± 4.6
21 days	74.4 ± 4.4	58.6 ± 5.2 ^a	11.04 ± 2.84	0.68 ± 0.02	64.8 ± 5.9

¹⁾Values are mean ± SE.

²⁾HDL-C/TC = high density lipoprotein-cholesterol / total cholesterol

^aSignificantly different from control group (p<0.05)

^bSignificantly different from fasted group (p<0.05).

LDL-콜레스테롤 및 중성지방함량은 대조군 혹은 절식군과 비교하였을 때 유의차가 없었으나, 재급여 후 21일째 총 콜레스테롤함량은 대조군에 비해 유의성 있게 높았다(p<0.05).

20% food restricted group은 재급여 전 기간 동안 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 중성지방함량이 점차적으로 증가하였으나 대조군 혹은 절식군과 비교하였을 때 유의차는 없었다. 40% food restricted group의 경우는 재급여 후 21일째에 절식군 혹은 대조군에 비해서 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 중성지방함량이 유의차는 없었으나 다소 낮은 경향이었던 동맥경화 지수로 이용되고 있는 HDL-C/TC비율은 절식 후 재급여시 식이섭취 수준과 더불어 장기간 동안의 효과를 보았을 때 40% food restricted group에서 가장 높은 경향을 보였으며, 심혈관계 질병 예방 효과와 높은 상관관계를 갖고 있는 HDL-콜레스테롤함량도 40% food restricted group이 대조군에 비해 유의성 있게 높았다(p<0.05).

지방조직의 지방합성량

2일 절식 후 재급여시 식이섭취 제한이 흰쥐 지방조직의 지방합성량이 미치는 결과를 요약하면 Table 3에 나타난 바와 같다.

인슐린이 지방합성을 촉진하는 것으로 보고되었기에 (18) 지방합성량 측정시 두 수준(0 및 10 ng/mL)의 인슐린농도에서 측정하였는데, 예상했던 대로 인슐린을 무첨가(0 ng/mL)하였을 때보다 첨가(10 ng/mL)하였 때 지방합성량이 증가했는데, 이러한 사실은 쥐의 부고환지방 조직에는 인슐린 receptor를 가지고 있어 인슐린과 반응

한다는 것을 의미한다 그리고 2일간 절식시킨 절식군이 대조군보다 배양액에 인슐린 존재 유무에 상관없이 지방합성량이 현저히 감소되었다(p<0.05).

인슐린을 첨가하지 않았을 경우 절식 후 재급여 전 기간동안 ad libitum group의 지방합성량은 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다(p<0.05). 재급여시 20% food restricted group의 지방합성량은 대조군에 비해 유의차는 보이지 않았지만 다소 감소되었다. 그러나 40% food restricted group의 지방조직의 지방합성량은 재급여 후 7일째 대조군 수준에 도달하였으며, 시혈종료 직전(21일째)에는 대조군보다 유의성 있게 증가하였으며(p<0.05), 절식군보다도 유의성 있게 높았다(p<0.05).

인슐린을 첨가하여 지방조직내 지방합성량을 측정하였을 때 재급여 후 7일째는 모든 처리군(ad libitum group, 20% food restricted group 및 40% food restricted group)의 지방합성량이 대조군보다 유의성 있게 높았다(p<0.05). 재급여 후 14일째에 ad libitum group과 20% food restricted group의 지방합성량은 대조군과 거의 비슷한 수준이었다. 그러나 40% food restricted group는 재급여 전 기간동안 지방조직의 지방합성량이 인슐린을 첨가하지 않았을 때와 마찬가지로 대조군보다 유의성 있게 높았다(p<0.05) 이와 같이 인슐린을 첨가했을 때 식이섭취 제한 급여시 지방합성이 더욱 증가한 이유는 인슐린은 receptor수를 down-regulation하는 호르몬으로 무제한 급여할 경우 혈당을 내리기 위해서 인슐린 분비가 제한급여군에 비해 많아지고, 이와 함께 receptor수는 적어질 수 있다. 바꾸어 말하면 제한급여군이 무제한급여군에 비해 receptor수가 많고 따라서 인슐린에 대한 표적기관의 민감도가 올라간다. 그래서 식이섭취를 제한 급여 받은 쥐의 지방조직이 무제한급여군에 비해 지방합성이 현저히

Table 3. Effects of fasting and food restriction during refeeding on lipogenesis in epididymal adipose tissue of rats¹⁾

Group	Insulin (ng/mL)	
	0	10
Control	1136.24 ± 98.30 ²⁾	1609.68 ± 218.94
Fasted (2 days)	642.68 ± 121.07 ^a	1064.11 ± 106.07
Ad libitum group		
7 days	729.57 ± 134.70 ^b	3583.66 ± 741.68 ^{ab}
14 days	700.87 ± 61.64 ^a	1594.22 ± 307.84
21 days	617.29 ± 59.78 ^d	1047.76 ± 90.64 ^c
20% food restricted group		
7 days	1005.94 ± 106.24	3778.27 ± 979.20 ^{ab}
14 days	886.16 ± 120.48	1428.01 ± 297.43
21 days	955.76 ± 152.29	2082.50 ± 371.97 ^b
40% food restricted group		
7 days	1192.54 ± 158.77 ^b	3372.61 ± 189.57 ^{ab}
14 days	1288.18 ± 204.54 ^b	3941.13 ± 769.37 ^{ab}
21 days	1592.58 ± 151.99 ^{ab}	3730.31 ± 603.60 ^{ab}

¹⁾pmole glucose converted into lipids/mg tissue/2 hr.

²⁾Values are mean ± SE

^{a)}Significantly different from control group (p<0.05)

^{b)}Significantly different from fasted group (p<0.05).

증가한 것으로 사료된다.

식이섭취량 감소에 의한 에너지제한은 지방축적 예방을 위해서 흔히 사용하는 방법인데, 본 연구의 경우 무제한급여군(ad libitum group)에 비해 식이섭취량을 20% 혹은 40%를 제한한군의 지방합성량 감소가 예측되었는데 Table 3에서 보는 대로 ad libitum group보다 식이섭취를 제한한군이 오히려 지방합성량이 높았다. 이와 관련하여 Cruz와 Williamson(11)은 에너지 섭취제한, 즉 식이섭취를 제한하였을 때가 자유급여했을 때보다 지방합성량이 증가되었는데, 이는 아마도 식이 섭취량의 제한이 식이급여형태 혹은 식이급여 횟수 등과 같은 다른 어떤 요인들보다 지방조직내 지방대사의 변화에 제일 중요한 인자라고 제안하였으며 본 연구 결과와도 일치하였다. 또한 식이 섭취량 제한(에너지 섭취제한)시 오히려 지방합성이 증가되는 요인은 활동량과 유지요구량이 감소되면서 전체적으로 에너지효율이 증가되는 등 대사적 적응으로 인해서(26) 혹은 HMPS(pentose monophosphate pathway)의 경로를 촉진시키는 효소인 pyruvate carboxylase, malic enzyme 및 pyruvate dehydrogenase의 활성을 증대시켜 탄수화물로부터의 지방합성을 촉진시킨다는 보고도 있다(12). 그러나 본 연구에서는 지방합성과 더불어 이러한 효소들의 활성을 동시에 측정하지 않았기 때문에 이들 상호간의 관계에 대해 설명할 수가 없었다. 그로 인해 추후에 절식 후 재급여시 식이섭취 제한이 지방조직내 지방합성 관련효소들에 미치는 영향에 관한 연구도 계속적으로 수행할 예정이다.

지방조직의 LPL활성

Table 4는 2일간 절식 후 식이섭취 수준을 달리하여 재급여하였을 때 부고환 지방조직의 LPL활성에 미치는

Table 4 Effects of fasting and food restriction during refeeding on total extractable (TE) and heparin-releasable (HR) lipoprotein lipase (LPL) activity in adipose tissue of rats

Group	LPL activity	
	TE-LPLA ¹⁾ (U/g)	HR-LPLA ²⁾ (U/g)
Control	26.58 ± 2.54 ³⁾	3.26 ± 0.41
Fasted (2 days)	8.66 ± 1.05 ^a	1.41 ± 0.16 ^a
Ad libitum group		
7 days	24.22 ± 1.44 ^b	3.53 ± 0.76 ^b
14 days	30.89 ± 6.32 ^b	4.08 ± 0.65 ^b
21 days	33.58 ± 4.24 ^a	4.20 ± 0.50 ^b
20% food restricted group		
7 days	21.81 ± 3.82 ^b	2.78 ± 0.76
14 days	24.14 ± 3.06 ^b	2.99 ± 0.46 ^b
21 days	19.27 ± 3.14 ^b	3.66 ± 0.55 ^b
40% food restricted group		
7 days	10.85 ± 1.66 ^a	1.81 ± 0.47 ^a
14 days	9.75 ± 2.45 ^a	1.87 ± 0.17 ^a
21 days	18.67 ± 2.42 ^{ab}	1.86 ± 0.33 ^a

¹⁾Total extractable (TE) LPL activity was measured in deoxycholate extracts of epididymal adipose tissue

²⁾Heparin-releasable (HR) LPL activity was measured in media samples after incubation of tissue fragments with 5 × 10³ units/L heparin for 45 min at 24°C

³⁾Values are mean ± SE.

^{a)}Significantly different from control group (p<0.05).

^{b)}Significantly different from fasted group (p<0.05)

영향에 관한 것이다. 예상했던 대로 2일 절식 후 지방조직의 HR-LPL활성과 TE-LPL활성은 각각 대조군에 비해 57%와 67%정도로 유의성 있게 감소하였다(p<0.05). 식이 재급여 후 ad libitum group의 지방조직내 HR-LPL활성은 7일만에 대조군 수준으로 도달하였으며, 재급여 후 14일과 21일은 각각 대조군에 비해 125%와 129%로 활성이 증가되었으나 유의적인 차이는 없었다. TE-LPL

활성도 ad libitum group은 재급여 후 7일째 대조군의 91%수준이었으며, 14일째는 대조군의 116%, 21일째는 126%로 활성이 증가하였으나 유의차는 보이지 않았다. 그러나 ad libitum group의 HR-LPL 및 TE-LPL활성은 절식군에 비해 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$). 이는 절식 후 식이를 재급여할 때 식이를 무제한 급여하면 빠른 시일 내에 LPL활성이 대조군 수준에 도달한다는 것을 의미하며, 대사적응이 매우 빠르게 일어남을 알 수 있다(27,28). 이와 관련하여 Schwartz와 Brunzell은 식사제한 후 40% 이상의 에너지를 과잉 섭취하면 LPL활성이 증가되는데 LPL은 지방대사에 관여하여 과잉의 에너지를 지방조직에 중성지방의 형태로 저장하게 된다고 보고했다(29). 절식기간 중 혈장내 인슐린농도는 저하되고, 인슐린과 반대작용을 하는 호르몬(epinephrine)의 농도가 증가되어 지방조직내 저장되어 있던 중성지방의 분해가 촉진된다고 한다(30). 아울러 이러한 변화는 지방조직내 LPL활성 저하를 수반한다고 했으며 절식시 지방조직내 LPL활성 저하는 cyclic AMP수준이 증가되었기 때문이라고 한다(31-33).

식이 재급여시 20% food restricted group은 재급여 전 기간 동안 지방조직의 HR-LPL활성이 급격히 증가되는 것을 예방하는 것으로 보여지나 재급여 후 21일째에 HR-LPL활성은 대조군 수준으로 도달하였다. 그러나 TE-LPL활성은 재급여 전기간 동안 대조군에 비해 유의차는 보이지 않았으나 다소 감소된 경향을 보였으며, 재급여 후 21일이 지났어도 대조군의 73% 수준이었다. 재급여시 40% food restricted group의 지방조직내 HR-LPL활성은 재급여 전 기간동안 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며($p < 0.05$), 재급여 후 21일이 지난 다음에도 HR-LPL활성 및 TE-LPL활성이 대조군의 43% 및 30% 수준으로 각각 감소했다. 즉 절식 후 식이를 재급여할 때 식이섭취 제한이 LPL활성 저하를 가져와 이로 인해 지방축적 억제 효과를 나타냄을 시사한다. 특히 절식 후 저하된 체중과 지방조직 무게는 재급여시 식이섭취를 제한하지 않았을 경우 지방축적 인자로 알려진 LPL활성의 급속한 증가 등 대사적응이 빠르게 일어나 정상수준에 도달하지만, 식이섭취를 제한하였을 경우 대사적응이 천천히 일어나든지 혹은 예방효과가 있어 지방축적 억제 효과를 가져오는 것 같다. 그러므로 절식한 다음 식이를 재급여할 때 식이섭취 제한이 지방축적 저하를 위해 매우 중요함을 시사한다.

요 약

본 연구는 절식 및 재급여가 Sprague-Dawley계통 수컷 흰쥐(55마리)의 지방조직내 LPL활성과 지방합성량에 미치는 영향을 구명하였다. 아울러 재급여하는 동안 다양한 식이섭취 제한이 LPL활성과 지방합성에 어떻게 영향을 미치는 지도 조사하였다. 대조군(5마리)은 무제한 식이를 급여하였으며 실험 첫날 식이섭취 상태에서 바로 희

생시켰으며, 그 외의 모든 쥐는 2일간 절식시켰다. 2일 절식 후 그중 5마리의 쥐를 희생하여 절식군으로 두었으며, 나머지 쥐(45마리)는 절식 후 식이를 재급여하였는데, 이때 재급여하는 동안 식이섭취 제한 효과를 보기 위해 ad libitum group, 20% food restricted group(ad libitum group의 80%) 및 40% food restricted group(ad libitum group의 60%)로 나누어 실시하였다. 재급여 후 7일, 14일 및 21일째 되는 날 각각 희생하였다. 지방조직의 지방합성은 포도당이 총 지방으로 변환 양으로 측정하였다. 체중과 지방조직의 무게는 재급여 후 ad libitum group은 5일만에, 20% food restricted group은 14일만에 대조군 수준에 도달하였다. 재급여시 40% food restricted group의 체중과 지방조직의 무게는 재급여 후 21일째가 되도록 대조군 수준에 도달하지 못했다. 식이 재급여 후 21일째 ad libitum group의 혈청 총 콜레스테롤합량은 대조군에 비해 높았다($p < 0.05$). HDL-콜레스테롤합량은 재급여시 40% food restricted group가 대조군에 비해 높았다 ($p < 0.05$). 그러나 HDL-C/TC비율과 중성지방합량은 처리군 간에 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 절식 후 지방조직내 지방합성량과 LPL(HR-LPL과 TE-LPL)활성은 대조군에 비해 현저히 저하되었다($p < 0.05$). 재급여 후 21일째 ad libitum group의 지방합성량은 대조군에 비해 낮았다($p < 0.05$). 그러나 40% food.restricted group의 지방합성량은 대조군에 비해 높았다($p < 0.05$). HR-LPL과 TE-LPL활성은 재급여시 ad libitum group과 20% food restricted group은 대조군 수준에 도달하였으나, 40% food restricted group은 재급여 후 21일째가 되도록 대조군 수준에 도달하지 못했다. 이러한 결과를 통해 절식 후 식이를 재급여할 경우 식이섭취 제한은 LPL활성이 증가되는 것을 부분적으로 혹은 완전히 예방할 수 있으며, 지방조직내 지방축적에 영향을 미친다는 것을 말해 준다.

문 헌

1. Dietz, W.H. : *Nutrition and obesity*. Butterworth Publishers, Stoneham (1987)
2. Kang, Y.J., Hong, C.H. and Hong, Y.J. : The prevalence of childhood and adolescent obesity over the last 18 years in Seoul area. *Korean J. Nutr.*, **30**, 832-839 (1997)
3. National Advisory Committee on Nutrition Education : *Proposals for nutritional guideless for health education in Britain*. The Health Education Council, London, UK (1983)
4. Eckel, R.H. : Lipoprotein lipase : A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *New Eng. J. Med.*, **320**, 1060-1067 (1989)
5. Enerback, S. and Gimble, J.M. : Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem. Biophys. Acta*, **1169**, 107-125 (1993)
6. Fried, S.K. and Kral, J.G. : Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity

- in morbidity obese patients. *Int. J. Obes.*, **11**, 129-140 (1989)
7. Fried, S.K., Velazquez, N. and Nobel, J. : Nutrition-induced variations in responsiveness to insulin effects on lipoprotein lipase activity in isolated rat fat cells. *J. Nutr.*, **120**, 1087-1095 (1990)
 8. Kern, P.A., Ong, J.M., Saffari, B. and Curty, J. : The effects of weight loss on the activity and expression of adipose tissue lipoprotein lipase in very obese humans. *New Engl. J. Med.*, **322**, 1053-1059 (1990)
 9. Maggio, C.A. and Greenwood, M.R.C. : Adipose tissue lipoprotein lipase (LPL) and triglyceride uptake in Zucker rats. *Physiol. Behav.*, **29**, 1147-1152 (1982)
 10. Sugden, M., Holness, M.J. and Howard, R.M. : Changes in lipoprotein lipase activities in adipose tissue, heart and skeletal muscle during continuous or interrupted feeding. *Biochem. J.*, **292**, 113-119 (1993)
 11. Cruz, M.L. and Williamson, D.H. : Refeeding meal-fed rats increase lipoprotein lipase activity and deposition of dietary [¹⁴C] lipid in white adipose tissue and decrease oxidation to ¹¹CO₂. *Biochem. J.*, **285**, 773-778 (1992)
 12. Benson, J.D. and Bensadoun, A. : Response of adipose tissue lipoprotein lipase to fasting in the chicken and the rat—a specific difference. *J. Nutr.*, **107**, 990-997 (1977)
 13. Fried, S.K., Hill, J.O., Nickel, M. and DiGirolamo, M. : Prolonged effects of fasting-refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase activity. Influence of calorie restriction during refeeding. *J. Nutr.*, **113**, 1861-1869 (1983)
 14. Ong, J.M. and Kern, P.A. : Effects of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, **84**, 305-311 (1989)
 15. Lee, J.J., Smith, P.J. and Fried, S.K. : Mechanisms of decreased lipoprotein lipase activity in adipocytes of starved rats depend on duration of starvation. *J. Nutr.*, **128**, 940-946 (1998)
 16. Bertrand, H.A., Anderson, W.R. and Masoro, E.J. : Action of food restriction on age-changes in adipocyte lipolysis. *J. Gerontol.*, **42**, 666-671 (1987)
 17. Sun, Y.S., Chung, C.S. and Chang, Y.K. : Effect of the changes in the ratio of dietary fat to carbohydrate and energy restriction on insulin sensitivity. *Korean J. Nutr.*, **22**, 266-274 (1989)
 18. Chung, C.S. : Effects of recombinant porcine growth hormone on lipogenesis of cultured porcine adipose tissue explants. *Kor. J. Anim. Sci.*, **36**, 391-396 (1994)
 19. Friedewald, W.T., Ley, R.I. and Fredrickson, D.S. : Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.*, **18**, 499-502 (1972)
 20. Nilsson-Ehle, P. and Schotz, M.C. : A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.*, **17**, 536-541 (1976)
 21. Fried, S.K. and Zechner, R. : Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J. Lipid Res.*, **30**, 1917-1923 (1989)
 22. Iverius, P.H. and Brunzell, J.D. : Human adipose tissue lipoprotein lipase : changes with feeding and relation to postheparin plasma enzyme. *Am. J. Physiol.*, **249**, E107-E114 (1985)
 23. SAS : *SAS User's Guide*. Statistical Analysis Systems Institute, Inc. NC (1985)
 24. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. : *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill Book Company, NY, p 481 (1960)
 25. Krotkiewski, M., Sjoström, L., Bjorntop, P., Carlgren, G., Garellick, G. and Smith, U. : Adipose tissue cellularity in relation to prognosis for weight reduction. *Int. J. Obesity*, **1**, 395-416 (1977)
 26. Leveille, G.A. and O'Hea, E.K. : Influence of periodicity eating on adipose tissue metabolism in the rat. *J. Physiol. Pharmacol.*, **43**, 541-549 (1967)
 27. Owens, J.L., Thompson, D., Shah, N. and DiGirolamo, M. : Effects fasting and refeeding in the rat adipocyte metabolic function and response to insulin. *J. Nutr.*, **109**, 1584-1591 (1970)
 28. Timmers, K. and Knittle, J. : Effects of undernutrition and refeeding on enzyme activities and rates of glucose catabolism in rat epididymal adipose tissue. *J. Nutr.*, **110**, 1176-1184 (1980)
 29. Schwartz, R.S. and Brunzell, J.D. : Increase of adipose tissue lipoprotein lipase activity after weight loss. *J. Clin. Invest.*, **67**, 1425-1430 (1981)
 30. Chajek-Shaul, T., Friedman, G., Etienne, J. and Stein, Y. : Endogenous plasma lipoprotein lipase activity in fed and fasting rats may reflect the functional pool of endothelial lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **837**, 271-278 (1985)
 31. Cryer, A., Rley, S.E., Williams, E.R. and Robinson, D.S. : Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities : their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat-cells and to plasma insulin concentration. *Clin. Sci.*, **50**, 213-221 (1976)
 32. Lithell, H., Boberg, J., Hellings, K., Lundquist, G. and Vessby, B. : Lipoprotein-lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis*, **30**, 89-94 (1978)
 33. Patten, R.L. : The reciprocal regulation of lipoprotein lipase activity and hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **245**, 5577-5584 (1970)

(2000년 2월 16일 접수)