

흰쥐에서 식이지방에 첨가한 Conjugated Linoleic Acid가 지방 축적과 분해에 미치는 영향*

강금지·박현서**[‡]

덕성여자대학교 사회과학대학 아동·가족학과, 경희대학교 생활과학대학 식품영양학과**

Effects of Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Fat Accumulation and Degradation in Rats*

Kang, Keum-Jee · Park, Hyun-Suh**[‡]

Department of Human Development and Family Studies, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
Department of Food and Nutrition, ** KyungHee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid(CLA) is a naturally occurring group of dienoic derivatives of linoleic acid found in beef and dairy products. CLA has reported to reduce body fat. This study was designed to observe the effect of CLA supplementation on fat accumulation and degradation in male Sprague Dawley rats. Seventy two rats, weighing 150 - 180g, were divided into 2 groups according to the types of dietary fat(beef tallow or fish oil) and then each group was divided into 2 groups depending on CLA supplementation, i.e., BT, BT-CLA, FO, FO-CLA. All rats were fed experimental diet containing total fat at 12%(w/w) including CLA at 1% for 30 weeks. At 30 weeks, rats were sacrificed to measure TG, free fatty acid level in plasma, TG, lipogenic enzymes in liver and fat cell size, LPL and HSL activities in epididymal fat pad. Fish oil supplemented with CLA diet showed significant reduction in the food efficiency and weight in 30 weeks-fed rats. CLA supplement did not effect on plasma TG, hepatic TG levels and lipogenic enzymes activities in rats, but, fish oil significantly reduced, The LPL and HSL activities did not affected by CLA supplement and n-3 fatty acid rich fish oil. In conclusion, the results suggest that CLA supplement was not a proper way to reduce the fat accumulation in Sprague Dawley rats. Fish oil supplemented with CLA might better way to reduce the body fatness than fish oil itself. Therefore, It is recommended that further study be performed related to physiological and biochemical effects of CLA supplementation and n-3 fatty acid in rats for the reduction of body fatness. (*Korean J Nutrition* 34(4) : 367~374, 2001)

KEY WORDS: conjugated linoleic acid, lipoprotein lipase, hormone sensitive lipase, fat cell size, hepatic lipogenic enzymes.

서론

Linoleate(cis, 9-cis, 12-octadecadienonate)의 위치(C₈, C₁₀; C₉,C₁₁; C₁₀,C₁₂; C₁₁,C₁₃) 및 기하학적(cis, trans) 이성체를 총칭하여 conjugated linoleic acid(CLA)라 한다. CLA는 반추위동물에서 유래한 고기(쇠고기 등)와 낙농제품(예: 우유와 치즈)에 많이 함유되어 있다.¹⁾ 최근에 CLA는 쥐의 지방암, 피부암, 대장암 등에 강한 항암효과가 있다고 보고되었고,^{2,3)} 면역기능을 높여 주고,⁴⁾ 또한 LDL-Chol을 낮추

접수일 : 2001년 2월 16일

채택일 : 2001년 6월 1일

*This work was supported by grant No. KRF 1998-D00948 from the Korea Research Foundation.

[‡]To whom correspondence should be addressed.

어 항동맥경화인자로 작용한다고 보고하였다.^{6,7)} 특히 CLA를 임신중인 쥐와 수유중인 쥐에게 먹었을 때 성장이 급속도로 이루어지는 것이 보고되었다.⁸⁾

생쥐에게 CLA를 먹었을 때 lean body mass는 증가되고 체지방과 체중이 감소됨이 보고되었다.¹⁰⁻¹⁶⁾ 이에 대한 기전은 여러 가지로 설명되고 있는데 Park 등¹¹⁾은 CLA투여 시 지방산 β-산화 과정의 rate limiting 역할을 하는 carnitine palmitoyl transferase 활성도가 지방조직과 골격근에서 증가되어 혈청 중성지방이 감소된다고 하였다. 또한 이 연구에서는 in vitro 실험인 조직배양을 통하여 지방조직에 지방을 축적하는 LPL(Lipoprotein lipase)활성이 감소됨을 관찰하였다. 또 다른 보고에서는 CLA가 지방조직에서 HSL(Hormone sensitive lipase)활성을 증가시켰고 norepinephrine에 의하여 유도된 지방분해 과정을

촉진시켰다고 하였다. 또한 West 등¹²⁾은 생쥐에게 고지방 식이와 저지방식이에 CLA를 첨가하여 6주동안 투여했을 때 CLA첨가시에 식이섭취율, 체중, 지방조직의 무게는 유의적으로 감소하였고, 체지방량은 감소되고 단백질량이 증가되었으며 식이섭취량이 감소되었음에도 에너지 소모가 계속 증가하는 것은 CLA가 지방분해를 촉진시키고 LPL의 활성을 감소시켰기 때문이라고 하였다. Delany 등¹⁴⁾의 보고에서는 수컷 생쥐에 1% 수준으로 CLA를 먹었을 때 체중과 체지방량이 유의하게 낮아졌으며 동시에 leptin 농도도 낮았다고 하였다. 그러나 쥐에게 CLA를 먹었을 때에는 체중의 변화가 없음이 관찰되기도 하였다.^{17,18)} Sisk 등의 보고에서는 Sprague Dawley 종 암컷 쥐에게 CLA를 0.5% 먹었을 때 식이섭취와 성장률에는 영향을 미치지 않았다. 이와 같이 CLA가 체지방량을 줄여준다는 연구 결과는 논란이 많이 있고 이에 대한 생화학적인 기전에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 CLA를 지방원을 달리한 식이에 첨가하여 CLA가 지방의 축적과 분해에 미치는 영향을 살펴보고자 하여 혈장과 간의 TG, 간의 cytosol의 lipogenic enzymes의 활성과 부고환지방조직의 LPL과 HSL의 활성을 측정하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험계획 및 식이

생후 6주된 Sprague Dawley종 수컷 72마리(약 155g 정도)를 1주간 chow diet로 적응시키고 체중에 따라 난괴법에 의해 4군으로 분류하여 30주간 사육하였다.

실험군은 식이지방의 급원에 따라서 쇠기름(beef tallow: BT)과 어유(fish oil: FO) 2군으로 나누고, 각 군을 다시 CLA의 첨가 유무에 따라서 2군으로 나누어 총 4군으로 분류하여 30주간 실험식을 섭취하였다.

실험식은 총열량 중 단백질이 약 20.9%, 당질이 약 53.5%, 지방이 25.6%(12%, w/w)가 되도록 구성하였으며, 다른 성분의 양은 동일하게 구성하였다(Table 1). 사용된 식이지방의 급원으로는 포화지방산이 주로 함유된 BT와 n-3계 지방산인 docosahexaenoic acid(DHA)가 주로 함유된 어유를 이용하였으며, CLA첨가군에는 총식이무게의 1%(w/w) 수준으로 safflower oil로부터 화학적으로 합성한 CLA를 첨가하였다(경상대학교 농화학과 연구실에서 제조). CLA의 순도는 80%였고 cis-9, trans-11 CLA와 trans-10, cis 12 CLA의 조성은 총 CLA의 각각 50%였다. 쇠기름과 어유에는 필수지방산이 부족하므로 필수지방

Table 1. Diet composition of experimental groups

Ingredients	Dietary groups			
	BT	BTC	FO	FOC
	g/100g diet			
Corn Starch	56.50	56.50	56.50	56.50
Casein	22.00	22.00	22.00	22.00
L-methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
Cellulose	4.00	4.00	4.00	4.00
Fat or Oil				
Beef tallow	9.64	8.39	0.00	0.00
Corn oil	2.36	2.36	2.61	2.61
Fish oil	0.00	0.00	9.39	8.14
CLA ¹⁾ -rich oil	0.00	1.25	0.00	1.25
Mineral mix ²⁾	4.00	4.00	4.00	4.00
Vitamin mix ³⁾	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline bitartrate	0.20	0.20	0.20	0.20
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

1) CLA rich oil contained 80% of total conjugated linoleic acid (50% c9t11, 50% t10c12)

2) AIN 76 Mineral mixture

3) AIN 76 Vitamin mixture

산을 충분히 공급하기 위하여 n-6 linoleic acid가 다량 함유된 옥수수 기름을 첨가하였으며 어유섭취군에는 산패를 예방하기 위하여 불포화정도를 고려하여 di- α -tocopherol(145.6mg/100g oil)을 첨가하였다. 실험동물은 12시간 dark-light cycle로 조절되었고 물과 식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 공급하였으며 체중은 일주일에 한번 같은 시간에 측정하였다.

2. 시료준비

30주간의 실험기간이 끝나는 날 12시간 공복시킨 쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후 복부 대정맥에서 혈액을 채취하여 heparin으로 처리된 시험관에 넣어 원심분리(800g × g, 15min, 4°C)하여 상층액인 혈장을 -70°C에 보관하였다. 간을 떼어내어 0.9% NaCl로 씻은 후 물기를 제거하고 총무게를 측정하였다. Lipogenic enzyme활성을 측정하기 위해 간 1g을 채취하여 phosphate buffer(pH7.4)로 10% 균질액을 만든 후 원심분리(500 × g, 15min, 4°C)하였다. 상층액을 취한 다음 초고속 원심분리를(105,000 × g, 1hr, 4°C)하여 상층의 cytosol층과 하층의 microsome 층을 취하여 즉시 -70°C에서 보관하였다. 사육군의 양쪽의 부고환지방(Epididymal fat pads)을 취하여 0.9% NaCl로 씻은 후 물기를 제거하고 총무게를 단 다음 1g은 지방세포의 크기를 측정하기 위하여 4% formalin 용액에 담가두고, 사육군의 나머지 부고환지방은 LPL과 HSL을 측정하기 위하여 -70°C에 보관하였다.

3. 생화학적 분석

1) 혈 장

(1) 중성지방 과 유리지방산

중성지방농도는 효소방법을 이용한 kit(영동제약)로 측정하였고, 유리 지방산농도는 유리지방산측정 kit(NEFA 유리지방산, 영연화학, 일본)를 이용하여 spectrophotometer로 측정하였다.

2) 간

(1) 중성지방 과 Lipogenic enzymes 활성

간조직의 중성지방함량은 Folch법¹⁹⁾에 의해 지질을 추출하여 효소방법을 이용한 kit(영동제약)로 측정하였다. Lipogenic enzymes의 활성은 간의 cytosol 층에서 측정하였다. Malic enzyme(ME)의 활성은 Ochoa²⁰⁾의 방법에 의해서 측정하였고, enzyme unit는 1분 동안 0.01의 absorbance의 증가를 일으키는 효소량으로 결정하였으며 specific activity는 cytosol에 함유되어 있는 단백질 1mg에 해당하는 enzyme unit로 나타내었다. 6-phosphogluconate-dehydrogenase(6PGDH)와 glucose 6-phosphate-dehydrogenase(G6PDH)의 활성은 Glock와 Mclean²¹⁾의 방법에 의해서 측정하였고, enzyme unit는 1분 동안 0.01 μ mole의 NADPH를 생성하는 효소양이며 specific activity는 단백질 1mg에 해당하는 enzyme unit로 나타냈다. Cytosol의 단백질 농도는 Biuret법²²⁾에 의하여 측정하였다.

3) 부고환지방조직

(1) 지방세포의 크기와 LPL과 HSL활성

부고환지방조직을 일반적인 HE염색을 하여 image analyzer(Bioquant, RND, Nashville, TN)을 사용하여 지방세포 크기를 측정하였다.

Glycerol trioleate-1-¹⁴C(Sigma Co.)를 이용하여 박²³⁾의 방법으로 LPL과 HSL활성을 측정하였다. LPL활성을 측정하기 위하여 유리교반기에 부고환지방조직 1g과 0.1M ethylene glycol을 함유한 0.05M Tri-HCl buffer(pH8.0) 2.5ml를 가하고 냉장조에 넣은 상태에서 30~40초 동안 중간속도로 균질화시켰다. 균질액은 2,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 지방의 덩어리를 제거하고 상층액을 15,000rpm에서 30분간 다시 원심분리하여 얻은 맑은액을 효소원으로 사용하였다. LPL의 활성도의 측정은 총활성도에서 NaCl-resistance activity를 뺀 값이다. LPL활성도는 효소원에 lysolecithin과 활성화시킨 rat serum.으로 안정화된 triolein(¹⁴C)을 넣고 반응하여 방출된 labeled oleic

acid로 계산하였다. Bovine serum albumin은 지방산 수용체로 작용하였다. 효소원의 반은 동량의 extraction buffer로 미리 반응시키고, 반은 NaCl로 미리 반응시켰다. NaCl이 첨가된 것과 첨가되지 않은 효소원물 각각 0.1ml에 0.1ml triolein기질을 넣고 37 $^{\circ}$ C의 항온조에서 20분 동안 교반하며 반응시켰다. Blank는 0.1ml extraction buffer를 넣었다. 이에 3.25ml chloroform : methanol : heptane(1.25 : 1.41 : 1.00)을 넣었다. 1.05ml boric-potassium carbonate buffer(0.1M, pH 10.5)을 넣고 15초 동안 강하게 진탕한 다음 2000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 1ml를 따서 counting vial에 넣고 10ml scintillation cocktail을 첨가하고 liquid scintillation counter에서 읽었다.

HSL활성을 측정하기 위해 유리 교반기에 부고환지방조직 1g과 1mM EDTA와 10mM Tris를 함유한 0.25M sucrose buffer(pH 7.4) 2.5ml를 넣고 냉수조에 넣은 상태에서 30~40초 동안 중간속도로 균질화시켰다. 균질액은 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리한 다음 지방 덩어리를 제거하고 상층액은 15,000rpm에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. HSL활성의 측정은 총 lipase activity에서 protamin-resistance activity를 뺀 값이다. 효소원 중 0.6ml에 protamin sulfate(12.8mg/ml) 0.2ml를 가하고 2 $^{\circ}$ C에서 30분간 미리 반응시켰다. 나머지 0.6ml에는 sucrose buffer(0.25M, pH7.4) 0.2ml를 가하고 미리 반응시켰다. Triolein substrate는 0.9ml non-labelled triolein, 90 μ l labelled triolein, 2.5ml gum arabic solution을 넣고 sonicate시킨 다음 5ml bovine serum albumin, 5ml sodium phosphate buffer, 2.5ml EDTA를 넣어 만들었다. Protamine sulfate가 첨가된 것과 첨가되지 않은 효소원을 각각 0.2ml에 0.6ml trioleine기질을 넣고 37 $^{\circ}$ C의 항온조에서 30분 동안 교반하며 반응시켰다. Blank는 0.2ml sucrose buffer를 넣었다. 0.3 μ mole nonradioactive oleic acid를 포함한 chloroform : methanol : benzene(2 : 2.4 : 1) 3ml를 넣었다. 0.1ml 1N NaOH를 넣고 15초 동안 강하게 진탕한 다음 2,500rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상층액 1ml를 따서 counting vial에 넣고 10ml scintillation cocktail을 첨가하고 liquid scintillation counter에서 읽었다. LPL과 HSL활성은 nmoles fatty acid/min/mg protein으로 표시하였으며 효소의 단백질정량은 Lowery 등²⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였다.

4. 통계처리

모든 실험결과는 Statistic Analysis System(SAS) pr-

Table 2. Food intake, body weight gain and food efficiency in 30 weeks feeding experiment

Dietary groups	Food intake g/day	Body weight change			Food efficiency
		Initial g	Final g	Weight gain g/day	
BT	29.81 ± 5.41 (13)	155.94 ± 2.60	479.95 ± 8.66 ^b	1.54 ± 0.04 ^{ab}	4.88 ± 0.56 ^{ab}
BTC	27.21 ± 2.25 (15)	158.06 ± 1.59	486.41 ± 10.31 ^{ab}	1.56 ± 0.05 ^{ab}	5.12 ± 0.62 ^{ab}
FO	29.13 ± 2.86 (13)	159.47 ± 1.52	507.87 ± 8.07 ^a	1.66 ± 0.04 ^a	5.28 ± 0.69 ^a
FOC	29.53 ± 7.51 (16)	160.75 ± 1.71	472.83 ± 9.69 ^b	1.49 ± 0.05 ^b	4.72 ± 0.52 ^b
P-value					
Oil	NS	NS	NS	NS	NS
CLA	NS	NS	NS	NS	NS
Oil*CLA	NS	NS	0.0303	0.0398	0.0138

Value sharing common superscripts in the same column are not significantly different at $p < 0.05$

Value are mean ± SD.

(): Number of rats

NS: not significant

ogram의 general linear model(GLM)을 이용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였으며, CLA와 식이지방의 효과를 보기 위해 two-way ANOVA-unbalanced design을 사용하였고 모든 실험결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다.

결 과

1. 식이섭취량, 식이효율 및 체중증가량

실험동물의 식이섭취량, 식이효율 및 체중증가량은 Table 2와 같다. 30주동안 평균 섭취한 식이의 양은 지방의 종류나 CLA첨가에 의한 차이를 보이지 않았다. 평균 식이효율은 지방의 종류나 CLA첨가에 따른 유의적인 차이가 없었으나, FO에 CLA를 첨가한 FOC군이 FO군에 비해 유의적으로 낮았다. 30주동안 체중의 변화는 Fig. 1과 같은데 FO군이 5주이후 다른 3군에 비해 체중이 많이 증가하는 것을 볼 수 있다. 30주 동안 평균 체중 증가량은 FOC군이 다른 세군에 비해 유의적인 차이를 보여 가장 낮았다(Table 2).

2. 혈 장

1) 중성지방

Table 3에서 각 지방에 첨가한 CLA가 혈장의 TG농도에 미치는 영향을 검토해 보았다. 지방의 종류에 따라 BT군(BT, BTC)이 FO군(FO, FOC)보다 유의적으로 높았고, CLA첨가에 따른 유의적인 차이는 없었으나 BTC군이 BT군보다 높은 경향을, FOC군은 FO군보다 낮은 경향을 보였다.

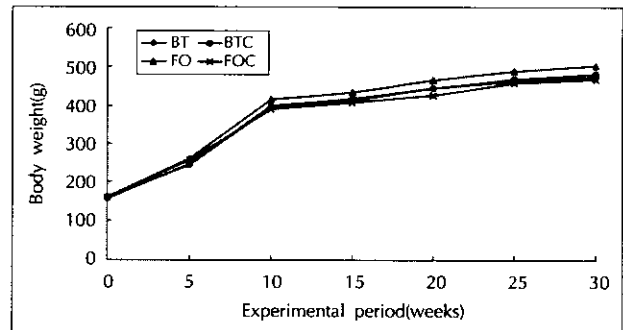


Fig. 1. Change of body weight in rats for 30 weeks.

2) 유리지방산 농도

지방조직에서 유리되어 나온 혈장의 유리지방산의 농도는 Table 3에서와 같이 지방종류와 CLA첨가에 의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 BT군에 비해서 BTC군에서는 높은 경향을 보였고 FO군에 비해 FOC군에서는 더 낮은 경향을 보였다.

3. 간

1) 중성지방농도

간조직의 단위무게당 중성지방량은 지방간의 차이를 보여 BT를 먹인 군(BT, BTC)에 비해 FO를 먹인 군(FO, FOC)에서 유의하게 낮았다(Table 4). CLA 첨가에 의한 유의한 차이는 없었으나 BTC군은 BT군보다 높은 경향을, FOC군은 FO군보다 낮은 경향을 보였다.

2) Lipogenic enzymes 활성도

지방산 합성에 필요한 H⁺ 이온 생성에 관여하는 malic enzyme(ME), glucose-6-phosphate-dehydrogenase(G

Table 3. Effects of CLA supplementation on the levels of plasma triglyceride, and free fatty acid in 30 weeks feeding experiment

Dietary groups	Triglyceride	Free fatty acid
	mg/dl	mg/dl
BT	66.38 ± 21.88 ^{ab} (8)	24.51 ± 14.71 (7)
BTC	75.91 ± 29.18 ^a (8)	28.61 ± 10.28 (7)
FO	41.46 ± 26.10 ^{bc} (6)	26.55 ± 7.86 (7)
FOC	30.08 ± 12.40 ^c (7)	25.86 ± 9.63 (6)
P-value		
Oil	0.0009	NS
CLA	NS	NS
Oil*CLA	NS	NS

Values sharing common superscripts in the same column are not significantly different at p < 0.05.
Values are mean ± SD. (): Number of rats NS: not significant.

Table 4. Effects of CLA supplementation on hepatic triglyceride level and lipogenic enzymes activities in 30 weeks feeding experiments

Dietary groups	Triglyceride	G6PDH	6PGDH	Malic enzyme
	mg/wet g liver	nmol/min/mg protein		
BT	5.60 ± 2.22 ^a (9)	5.71 ± 1.59 ^a (9)	13.87 ± 4.06 ^a (9)	1.44 ± 0.46 (9)
BTC	6.37 ± 2.90 ^a (9)	6.19 ± 1.38 ^a (7)	15.57 ± 4.11 ^a (7)	1.61 ± 1.18 (8)
FO	3.92 ± 2.18 ^{ab} (8)	2.80 ± 0.98 ^b (8)	5.78 ± 1.60 ^b (8)	0.93 ± 0.75 (7)
FOC	2.25 ± 0.98 ^b (9)	2.35 ± 0.80 ^b (8)	4.97 ± 1.65 ^b (8)	0.86 ± 0.53 (8)
P-value				
Oil	0.0032	0.0001	0.0001	NS
CLA	NS	NS	NS	NS
Oil*CLA	NS	NS	NS	NS

Values are mean ± SD. (): Number of rats NS: not significant.
G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase
6PGDH: 6-phosphogluconate dehydrogenase

6PDH)와 6-phosphogluconate-dehydrogenase(6PGDH)의 활성도를 측정된 결과는 Table 4와 같다. ME활성도는 지방종류에 따른 유의한 영향이 없었으며, CLA첨가에 의해서도 유의한 영향을 관찰할 수 없었으나 BT군에 비해 BTC군에서는 높아진 경향을 보였고 FO군에 비해 FOC군에서는 낮은 경향이었다. G6PDH와 6PGDH 활성도에도 지방의 종류의 따른 차이를 보여 BT를 먹인 군(BT, BTC)에 비해 FO를 먹인 군(FO, FOC)에서 유의하게 낮았다. CLA첨가에 의해서 는 유의한 영향을 미치지 않았으나 BT군에 비해 BTC군에서 두 효소의 활성도는 높은 경향을 나타냈고 FO군에 비해 FOC군에서 더 낮은 경향을 보였다.

Table 5. Effects of CLA supplementation on fat cell size and LPL and HSL activities of epididymal fat pad in 30 weeks feeding experiment

Dietary groups	Fat cell size	LPL	HSL	LPL : HSL
	Diameter(µm)	U/mg protein	U/mg protein	
BT	60.61 ± 4.93 (7)	0.86 ± 0.36 (9)	0.27 ± 0.17 (7)	8.28 ± 11.09
BTC	60.11 ± 5.16 (7)	0.98 ± 0.63 (9)	0.30 ± 0.14 (7)	3.49 ± 2.31
FO	57.01 ± 3.44 (7)	0.74 ± 0.35 (9)	0.29 ± 0.19 (8)	5.22 ± 5.50
FOC	58.27 ± 2.61 (7)	0.69 ± 0.35 (7)	0.29 ± 0.12 (7)	2.78 ± 1.97
P-value				
Oil	NS	NS	NS	NS
CLA	NS	NS	NS	NS
Oil*CLA	NS	NS	NS	NS

Values are mean ± SD. (): Number of rats NS: not significant.

4. 부고환지방조직

1) 지방세포의 크기

부고환 지방조직에서의 지방세포 크기는 Table 5와 같다. 지방세포의 평균크기는 지방의 종류나 CLA첨가에 따른 유의한 영향을 받지 않았다.

2) LPL과 HSL활성도

LPL과 HSL활성도를 Table 5에서 비교해 보면 지방의 종류나 CLA첨가에 의한 효소 활성도에 유의한 영향을 주지 않았으며 어유의 n-3지방산에 의해서도 유의한 영향을 받지 않았다. 두 효소의 비율인 LPL/HSL 값은 BT를 먹인 경우(BT, BTC)에 비해 FO를 먹인 경우(FO, FOC) 낮아진 경향이었다. CLA첨가에 따른 차이는 BT군에 비해 BTC군에서 더 낮았으며, FO군에 비해 FOC군에서 더 낮았다.

고 찰

1. CLA가 식이섭취, 식이효율 및 체중증가량에 미치는 영향

지방의 종류가 체중에 미치는 영향에 대해서는 많은 논란이 진행되고 있다. 쥐에서 쇠기름에 비해 어유를 섭취하였을 때 체중이 더 낮았다는 보고가 있는가 하면,²⁶⁾ 지방의 종류에 따라 체중증가에는 영향을 미치지 않았다고 보고되었다.²⁸⁾ 본 연구에서도 지방의 종류와 CLA 첨가에 따라 식이섭취량에는 모든 군에서 유의한 차이를 보여주지 않았으나 체중은 CLA와 n-3지방산을 같이 함유한 FOC군에서 다른 군에 비해 유의하게 가장 낮았다. 이 때 식이효율도 FOC군에서 가장 낮았다(Table 2). 박 등¹⁰⁾의 보고에 의하면 5.0% 옥수수 기름에 CLA를 0.5% 첨가한 실험식으로 6주된 생쥐를 6주간 사육하

였을 때 체중의 변화가 거의 없었다고 하였으나 West 등¹²⁾의 보고에서는 CLA에 의해 식이섭취가 감소되었으며 성장률과 지방축적이 낮았다고 하였다. 그러나 Sugano 등¹⁸⁾의 보고에 의하면 본 연구에서와 같은 Sprague Dawley종을 사용하여 CLA를 0.5~1.0% 수준으로 첨가한 식이로 3주간 사육하였을 때 대조군에 비해 식이섭취와 체중에 유의한 영향을 미치지 않았다. 본 연구에서는 동물을 30주 동안 장기간 사육하였을 때 CLA만으로는 체중이나 식이효율에는 유의한 영향이 없었으나 n-3지방산이 높은 FO에 CLA를 첨가한 경우에는 이들 지방산의 상호상승작용으로 식이효율과 체중이 낮아진 것이라고 사료된다.

2. CLA가 간의 lipogenic enzymes의 활성도와 중성지방 농도에 미치는 영향

지방산합성은 간조직에 있는 ACC(Acetyl CoA carboxylase), G6PDH, ME과 같은 lipogenic enzyme의 활성도에 의해 조절되므로 간조직에 함유된 lipogenic enzyme의 수준은 혈액내 중성지방량을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 본 연구의 결과로 미루어 보면 CLA는 지방산합성과 관계있는 lipogenic enzyme 활성도에는 영향을 미치지 않았다고 사료된다(Table 4). 그러나 이미 보고된 바²⁷⁻³³⁾와 같이 본 연구에서도 CLA 경우와는 다르게 n-3지방산인 어유는 lipogenic enzyme의 활성도를 감소시켰다.

본 연구에서 혈장의 TG농도(Table 3)는 CLA와 어유가 lipogenic enzyme활성도에 미친 영향과 같은 경향으로 CLA에 의해서는 유의한 영향을 받지 않았으나 어유에 의해서는 유의하게 감소되었다. Clarke 등³⁴⁾의 보고에서는 식이지방의 불포화도가 높아짐에 따라 간조직에서 lipogenic enzyme의 활성도가 감소되었으며 이에 따라 TG합성이 효과적으로 억제되었다. Haug과 Hostmark²⁸⁾에 의하면 쇠기름에 비해 옥수수기름에 의해서 ACC, ME, G6PDH의 활성도가 30% 감소되었으며 어유에 의해서는 70% 이상 감소되었다고 하였다. 여러 연구보고²⁷⁻³³⁾에서도 마찬가지로 n-3 지방산은 간조직에서 lipogenic enzyme 활성을 억제시켜 TG합성이 감소되어 혈중으로 TG분비가 적었다고 하였다. 본 연구결과에서도 마찬가지로 BT를 먹인 군(BT, BTC)에 비해 n-3지방산이 높은 FO를 먹인 군(FO, FOC)에 의해서 간의 lipogenic enzyme의 활성도가 감소되어 지방합성이 억제되었으며 이에 따라 간에서 TG합성이 낮아 혈장의 TG농도가 낮았다고 사료된다.

이미 보고된 바⁶⁾에 의하면 토끼에게 총지방 14%에 0.1%의 cholesterol과 CLA를 0.5%를 첨가한 식이로 22주 동안 사육하였을 때 12주부터 혈중의 TG가 낮아진 경향만을

보였으며, Hamster에서⁷⁾도 마찬가지로 같은 경향을 보였다. 쥐에서도⁵⁾ CLA는 간의 TG함량을 감소시킨 경향만을 보였다. 이와 같이 CLA는 혈장이나 간조직에서 TG함량을 유의하게 감소시키지는 않았다. 본 연구 결과에서도 혈장과 간의 TG는 CLA에 의해서 유의적인 변화는 없었으며 BT에 CLA를 첨가한 경우에 오히려 증가된 경향이었으며, FO에 CLA를 첨가한 경우에는 FO군보다는 낮은 경향을 보였다. 혈장과 간조직의 TG함량의 변화와 마찬가지로 lipogenic enzyme의 활성도도 FO에 CLA를 첨가한 경우에 FO만을 먹인 경우보다는 더 낮아진 경향을 보였다. 또한 FOC군의 유리지방산농도도 같은 추세로 FO군에 비해 낮아진 것을 볼 때 FOC군에서 체중이 가장 낮았던 결과와 일치하는 영향을 주었다고 사료된다. 이에 반하여 BT에 CLA를 첨가한 경우(BTC군)에는 간의 lipogenic enzyme 활성도와 TG함량 및 혈중 TG농도가 모두 증가하는 경향을 나타냈다. 그러므로 CLA를 n-3지방산 함량이 높은 어유에 첨가하였을 때 CLA는 n-3지방산과 서로 상승효과가 있을지도 모르기 때문에 앞으로 이 두 지방산의 상호관계에 대한 깊은 연구가 요구된다.

3. CLA가 부고환지방조직에서 지방의 축적과 분해 및 지방 세포 크기에 미치는 영향

이미 보고된 바^{10,11)}에 의하면 CLA는 LPL의 활성도를 낮추었고 HSL의 활성도는 증가시켜 체지방을 감소시켰을 것이라고 하였다. 그러나 본 연구에서는 CLA에 의해서 LPL의 활성도가 유의하게 낮아지지 않았으며, 오히려 BT에 CLA를 첨가한 경우에는 BT군보다 증가된 경향을 보였으며 FO에 CLA를 첨가한 경우에는 FO군보다 낮아진 경향을 보였다(Table 5). 이와 같은 경향은 위에서 언급된 바와 같이 간조직과 혈장의 TG함량에 미치는 결과와 일치하였다. 또한 혈장의 TG농도가 낮은 경우에 지방조직의 LPL활성도도 같이 낮아진 경향을 관찰하였다.

Park 등¹¹⁾의 조직배양 실험에서는 기질로써 free CLA를 albumin에 binding시킨 것을 사용하여 용액내에 있는 CLA가 직접적으로 LPL의 활성에 미치는 영향을 측정하는 것이었다. 그러나 본 연구에서는 이와는 다르게 기질 중에 CLA를 첨가하지 않았고 cold triolein과 ¹⁴C으로 labeling된 triolein으로 lipoprotein을 만들어 사용하였으며, 또한 효소는 부고환지방 조직에서 추출한 LPL의 활성도를 측정하는 것으로서 식이에 첨가한 CLA가 체내 지방조직에 존재하는 LPL효소의 수준에 어떤 영향을 주었는지 관찰한 결과이었다. 그러므로 in vitro 연구¹¹⁾에서 CLA가 LPL의 활성도를 낮추었다는 것은 기질내에 존재하는 CLA가 LPL

의 활성을 방해하였기 때문에 낮아진 것이지만 실제로 본 연구의 *in vivo* 실험에서는 식이에 함유된 CLA에 의해서 지방조직에 있는 LPL효소의 수준에 얼마나 영향을 미쳤는지 측정할 것이다. 그러므로 근본적으로 Park 등¹¹⁾의 연구 결과와는 다른 의도로 관찰하였기 때문에 앞으로 기질로서 lipoprotein을 만들 때 CLA를 첨가하여 LPL활성도를 측정하여 비교하고, 또한 LPL활성도만 측정하기 보다는 LPL mRNA함량도 같이 측정하여 CLA가 지방조직의 LPL합성에 어떤 영향을 주는지 알아볼 필요가 있다고 사료된다.

Haug 등²⁰⁾의 보고에 의하면 혈장의 TG농도에 따라 LPL의 활성도가 영향을 받는다고 하였다. 즉 어유를 섭취하였을 때 간에서 TG합성과 분비가 낮아져서 LPL의 기질이 되는 혈장의 TG농도가 감소되므로 지방조직의 LPL의 활성도가 낮았다고 하였다. 그러므로 LPL의 활성도는 기질의 농도가 떨어졌을 때 감소되어진다고 하였다. 그러나 Benhizia 등²⁰⁾의 연구에서는 n-3계 지방산이 LPL의 활성도를 증가시킨다고 하였는데 이것은 혈장의 TG농도를 낮추려는 기전으로 LPL의 활성도가 증가되었다고 하였다. 본 연구의 결과에서는 FO를 먹인 군(FO, FOC)이 BT를 먹인 군(BT, BTC)에 비해 LPL의 활성도가 현저히 감소된 경향을 보였다 (Table 5). 이와 같은 결과를 뒷받침하는 것으로서 혈장의 TG농도(Table 3)도 FO를 먹인 군에서 유의하게 더 낮았음이 관찰되었다. 그러므로 n-3지방산에 의해서 혈장의 TG농도가 낮추어지고 이에 따라 LPL의 활성도가 낮아져서 지방조직의 지방축적이 더 적었다고 사료된다.

30주 사육한 쥐에서 HSL의 활성도(Table 5)와 유리지방산의 농도(Table 3)를 비교하여 보면 지방의 종류나 CLA첨가에 따른 차이가 없었다. 보고된 바²⁰⁾에 의하면 HSL활성도가 높았을 때는 혈장의 유리지방산농도가 높아진다고 하였다. 그러므로 본 연구에서도 지방조직의 HSL활성도가 CLA와 n-3지방산에 의해서 변화가 없었기 때문에 혈장의 유리지방산농도에도 변화가 없었다고 사료된다.

지방축적은 LPL과 HSL의 활성도에 따라 좌우됨으로 지방축적의 정도를 알기 위해서는 각각의 효소활성도를 측정하고 또한 두 효소의 비율을 관찰하는 것이 중요하다고 생각한다. 그래서 LPL/HSL의 비율이 낮으면 지방조직에 지방축적이 적게 일어날 것이라고 본다. 실험군에서 LPL/HSL의 비율을 비교하였을 때(Table 5), 지방종류나 CLA첨가에 의한 유의적인 차이가 없었으나 BT군에 비해서 CLA와 n-3지방산이 함께 함유된 FOC군에서 가장 낮은 경향을 보였다. 이와 같이 FOC군에서 지방축적이 가장 적게 일어났을 것이라고 추정할 수 있으며, 이것은 FOC군에서 체중증가량이 가장 작았던 결과를 뒷받침해 준다고 사료된다.

CLA첨가에 따른 지방세포의(Table 5) 평균크기는 각 지방에 첨가한 CLA와 어유의 n-3지방산에 의해서 유의한 영향을 받지 않았다. 어유로 사육한 쥐들이 쇠기름을 먹인 쥐보다 지방세포의 크기가 작았다는 보고가 있는데,²⁵⁾ 본 연구에서도 유의적인 수준은 아니나 같은 결과를 얻었다. 이미 보고된 바²⁵⁾에 의하면 어유에 의해서 지방세포의 크기가 적었던 것은 어유에서 간의 지방 합성 저하에 따라 혈장 TG가 감소되어 LPL활성이 저하되어 지방조직에 적은량의 지방이 축적되어 지방세포의 크기가 더 적었을 것이라고 사려된다. Sisk 등¹⁷⁾의 보고에 의하면 CLA를 쥐에게 먹였을 때 체중과 지방세포의 수효에는 변화가 없었으나 지방세포의 크기가 작은 것이 많았다고 하였다. 본 연구에서는 CLA첨가에 의해서는 30주 동안 사육한 경우 모두 지방세포의 크기에 영향이 없었다. 그러나 체중은 어유에 CLA를 첨가하였을 때 어유만 먹인 군보다 식이효율이 낮아지고 체중이 유의적으로 적었는데 이는 두 기름간의 상호 상승효과가 아닌가 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 Sprague Dawley종 수컷 흰쥐에게 식이 지방으로 쇠기름과 어유에 첨가한 CLA(1%, w/w)가 지방의 축적과 분해에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

지방의 종류에 따라서는 식이섭취율, 식이효율과 체중 증가에 영향을 미치지 않았으나 어유에 CLA를 첨가하였을 때는 체중 증가와 식이효율이 어유군에 비해 유의적으로 낮았다.

혈장의 TG는 지방의 종류에 따라 쇠기름군이 어유군보다 유의적으로 높았다. CLA 첨가에 따른 차이는 없었다. 유리지방산 농도는 지방의 종류나 CLA첨가에 따른 차이가 없었다.

간조직의 TG함량은 기름간의 차이를 보였으나 CLA첨가에 따른 차이는 없었다. Lipogenic enzyme의 활성도에서 Malic enzyme는 지방의 종류나 CLA첨가에 따른 차이는 보여주지 않았으나 G6PDH나 6PGDH 활성에서는 지방의 종류에 따라 어유군이 쇠기름군보다 유의적으로 낮았으나 CLA첨가에 따른 차이는 없었다.

지방세포의 크기는 지방의 종류나 CLA첨가에 따른 차이가 없었다. 부고환지방조직의 LPL과 HSL활성도는 지방의 종류나 CLA첨가에 의해서 유의한 영향을 받지 않았다.

결론적으로 본 연구에서는 CLA가 Sprague Dawley종 수컷쥐에서는 기름의 종류를 달리하여 CLA를 첨가하였을 때 간에서 지방합성을 억제하거나 지방조직에서 지방축적

을 감소시키거나 또는 축적된 지방을 더 분해하는 영향을 주지 않았다. 그러나 어유에 CLA를 첨가하였을 때 식이효율과 체중이 어유만 먹었을 때보다 유의적으로 감소하였다. 다음의 연구에서는 어유와 CLA의 상호 상승작용에 대한 심도 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

Literature cited

- 1) Haumann BF. Conjugated linoleic acid. *Inform* 7(2): 152-159, 1996
- 2) Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res* 54: 1212-1215, 1994
- 3) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887, 1987
- 4) Kim KH. Effect of dietary supplementation of conjugated linoleic acid on tumor incidence and colon carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine treated rats. *KyungHee University Doctoral Dissertation*, pp.1-123, 2000
- 5) Cook ME, Miller CC, Park Y, Pariza MW. Immune modulation by altered nutrient metabolism: Nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci* 72: 1301-1305, 1993
- 6) Pariza MW, Kritchevsky D, Lee KS. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108: 19-25, 1994
- 7) Nicolosi RJ, Courtemanche, KV, Laitinen, L, Scimeca, JA, Huth, PJ. Effect of feeding diets enriched in conjugated linoleic acid on lipoproteins and aortic atherosclerosis in hamsters. *Circulation* 88 suppl: 2458, 1993
- 8) Nicolosi RJ, Rogers EJ, Kritchevsky D, Scimeca JA, Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduce plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22(5): 236-77, 1997
- 9) Chin SF, Storkson JM, Albright KJ, Cook ME, Pariza MW. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J Nutr* 124: 2344-2349, 1994
- 10) Pariza MW, Park YH, Kim S, Sugimoto K, Albright K, Liu W, Storkson J, Cook M. Mechanism of body fat reduction by conjugated linoleic acid. *FASEB* 11: A139, 1997
- 11) Park YH, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated Linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32(8): 853-858, 1997
- 12) West DB, Delany JP, Carnet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J. Effect of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol* R667-672, 1998
- 13) Park YH, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34: 232-241 1999
- 14) Delany JP, Blohm F, Truett AA, Scimeca JA, West DB. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* R1172-1179, 1999
- 15) Park YH, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Cook ME, Pariza MW. Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* 34: 243-248, 1999
- 16) Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama M, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49(Sept): 1534-1542, 2000
- 17) Sisk M, Azain MJ, Hausman DB, Jewell DE. Effect of conjugated linoleic acid on fat pad weights and cellularity in sprague Dawley and Zucker rats. *FASEB(abstract)* 3116: A536, 1999
- 18) Sugano M, Tsujita A, Yamasaki M, Noguchi M, Yamada K. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 33: 521-527, 1998
- 19) 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
- 20) Ochoa S. "Malic" Enzyme. *Methods in Enzymology* 1: 739-753, 1959
- 21) Glock GE, Mclean P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem* 55: 400-408, 1953
- 22) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. *JBC* 177: 751, 1949
- 23) Park HS, Yearick ES. The influence of dietary fat and meal frequency on lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in rat adipose tissue. *J Nutr* 108: 1798-1805, 1978
- 24) Lowery OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 25) Parrish CC, Pathy DA, Angel A. Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. *Metabolism* 39: 217-219, 1990
- 26) Kitland J, Gurr MI. The effect of different dietary fats on fat cell size and number in rat epididymal fat pad. *Br J Nutr* 39: 19-26, 1978
- 27) Johnson BJ, Bertdaniel CD. Effect of menhaden oil on the responses of rats to starvation-refeeding. *Nutr Reports Inter* 36: 809-817, 1987
- 28) Haug A, Hostmark AT. Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. *Lipids* 1011-1016, 1987
- 29) Kim SH, Kim WK, Jung JE. The effects of n-6/n-3 and p/s ratio of dietary lipid on lipid metabolism of rats of different age. *Korean J Nutr* 27(7): 687-698, 1994
- 30) Ruiter A, Jongbioed AW, Van Gent LH, Danse JC, Metz SH. The influence of dietary mackerel oil on the condition of organs and on blood lipid composition in the young growing pig. *Am J Clin Nutr* 31: 2159-2166, 1978
- 31) Kim WK, Kim SH, Lee KH. Effect of different sources of carbohydrate and n-3 fatty acid on lipid metabolism in hypertriglyceridemic rats. *Korean J Nutr* 29(9): 925-933, 1996
- 32) Iritani N, Fukuda E, Inoguchi K, Tsubosaka M, Tashiro S. Reduction of lipogenic enzymes by shellfish triglycerides in rat liver. *J Nutr* 110: 1665-1670, 1980
- 33) Herzberg GR, Minda R. Hepatic fatty acid synthesis and tryglyceride secretion in rats fed fructose or glucose based diets containing corn oil, beef tallow or marine oil. *J Nutr* 118: 1601-1607, 1988
- 34) Clarke SD, Romsos DR, Levelle GA. Differential effects of dietary methyl esters of long-chain saturated and polyunsaturated fatty acids on rat liver and adipose tissue lipogenesis. *J Nutr* 107: 1170-1181, 1977
- 35) Yamasaki M, Manshok, Mishima H, Kasei M, Sugano M, Tachibana H, Yamada K. Dietary effect of conjugated linoleic acid on lipid levels in white adipose tissue of Sprague-Dawley rats. *Biosci biotechnol Biochem* 63(6): 1104-1106, 1999
- 36) Benhizia F, Hainault I, Serouge C, Lagrange D, Hajduch E, Guichard C, Malewlak MI, Boulange A, Lavaum, Griglio S. Effects of a fish oil-lard on rat plasma lipoproteins, liver FAS, and lipolytic enzymes. *Am J Physiol* E975-981, 1994
- 37) Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res* 35: 177-193, 1994