

고지방식이로 유도한 지방간 마우스에서 기장 첨가식이 지방간 및 인슐린 저항성에 미치는 영향

박미영¹ · 장환희¹ · 이진영¹ · 이영민¹ · 김재현¹ · 박재학² · 박동식^{1†}

¹국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과
²서울대학교 수의과대학

Effect of Hog Millet Supplementation on Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Fed a High-fat Diet

Mi-Young Park¹, Hwan-Hee Jang¹, Jin-Young Lee¹, Young-Min Lee¹,
Jae-Hyun Kim¹, Jae-Hak Park², and Dong-Sik Park^{1†}

¹Functional Food & Nutrition Division, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Gyeonggi 441-707, Korea

²College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract

The dietary intake of whole grains is known to reduce the incidence of chronic diseases such as obesity, diabetes, cardiovascular disease, and cancer. In our previous study, hog millet (HM, *Panicum miliaceum* L.) water extract showed the highest anti-lipogenic activity among nine cereal types in 3T3-L1 cells. In this study, the effect of hog millet water extract on hepatic steatosis and lipid metabolism in mice fed a high fat diet was investigated. Mice were fed a normal-fat diet (ND), high-fat diet (HFD) or HFD containing 1% or 2% (w/w) HM for 7 weeks. Body weight and food intake were monitored during the study period. Insulin resistance by homeostasis model assessment (HOMA-IR), fasting lipid profile, hepatic fatty acid metabolism-related gene expression determined, and intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT) were performed at the study's end. The results indicated that 1% and 2% HM diets effectively decreased liver weights, blood TG and T-cholesterol levels ($p < 0.05$), while the HDL-cholesterol level was increased ($p < 0.05$) compared to HFD-induced steatosis mice. Hepatic lipogenic-related gene (PPAR α , L-FABP, and SCD1) expressions decreased, whereas lipolysis-related gene (CPT1) expression increased in animals fed the 2% PME diet ($p < 0.05$). In addition, mice fed 1% or 2% HM diet had markedly decreased IGTT and HOMA-IR, compared to the those of the HFD-induced hepatic steatosis control group ($p < 0.05$). These results indicated that HM inhibited hepatic lipid accumulation by regulating fatty acid metabolism, and suggested that HM is useful in the chemoprevention or treatment of high fat-induced hepatic steatosis and hepatic steatosis-related disorders including hyperlipidemia, glucose sensitivity, and insulin resistance.

Key words: *Panicum miliaceum* L., hog millet, high fat diet, insulin resistance, steatosis

서 론

간조식은 신체의 항상성유지에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 장기이다. 간의 지방산 합성과 산화의 균형이 깨지면 간의 지방 축적 및 인슐린 저항성이 야기된다. 음주와 관계없이 간에 중성지방이 과도하게 축적되는 비알콜성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 단순 지방간(simple hepatic steatosis)으로부터 지방간염(steatohepatitis), 간섬유증(hepatic fibrosis) 및 간암(liver cancer)과 같은 만성 간질환으로 진행할 수 있다(1). 또한 이는 비만, 인슐린 저항성, 제2형 당뇨, 심혈관계질환 등 대

사증후군과 관련이 있는 것으로 알려지면서 최근 관심이 증가하고 있다(2). 2008년도 대한간학회에서 발표된 자료에 의하면 직장인에서 지방간질환의 발생은 20년 전보다 3배 이상 증가하였고, 특히 NAFLD의 발생율이 30%에 육박하였다고 하였다(3). 또한 NAFLD 환자의 90%에서 대사증후군의 요소 중 한 가지 이상을 가지고 있으며 33%는 대사증후군의 진단기준을 만족한다고 하였다(4). NAFLD의 발병원인은 정확히 알려진 바 없지만 인슐린 저항성과 고인슐린혈증이 이의 발병에 중요한 역할을 하며, 인슐린 저항성 증가와 밀접한 관련이 있는 지질이상 역시 NAFLD의 원인으로 여겨지고 있다(5,6). 따라서 이는 대사증후군의 결과가 아닌

[†]Corresponding author. E-mail: dpark@korea.kr

[†]Phone: 82-31-299-0530, Fax: 82-31-299-0504

원인으로 대사증후군의 발생을 예견하는 인자일 수 있다.

한편 많은 역학조사결과 다양한 곡류섭취와 만성질환 유병률 간에는 음의 상관관계가 있는 것으로 밝혀지고 있다. 우리나라는 전통적으로 곡류 위주의 식사와 다양한 곡류식품을 섭취함에도 불구하고 곡류의 중요성에 대한 인식이나 관심은 낮은 편이다. 또한 최근 건강에 대한 관심과 영양지식이 증가하면서 일부 잡곡들의 소비가 증가하는 추세이다. 국내산 곡류의 생리활성에 대한 과학적인 근거를 마련하고자 본 연구진은 선행연구로 국내산 곡류 9종의 지방세포 분화억제능을 시험하였으며, 그 결과 기장(*Panicum miliaceum* L.)의 효능이 가장 뛰어났다(7). 즉, 기장 열수추출물이 지방세포 분화와 관련된 유전자 발현을 조절함으로써 지방축적을 가장 효과적으로 억제하였다. 기장에 대한 생리활성 연구보고로는 Kwak 등(8)이 기장 에탄올 추출물의 항돌연변이능이 타 곡류보다 뛰어났다고 보고한 바 있다. 기장의 생리활성은 아직 명확하지 않으며 특히 실험동물을 이용한 *in vivo* 연구는 아직 전무한 실정이다. 이에 본 연구는 고지방식으로 유도된 비알콜성 지방간(hepatic steatosis) 모델에서 기장 열수추출물 함유 식이의 지방간 및 혈중 지질 개선 효능을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 기장은 강원도 원주 신림농협에서 2009년 3월에 구매한 후 4°C에서 냉장 보관하면서 추출에 사용하였다. 기장 열수추출물은 마쇄된 분말의 10배의 증류수를 첨가하여 상온에서 3시간씩 2회 추출하였으며, 그 여액을 회전증발농축기(EYELA N-1000, Tokyo Riakiki Co., Ltd, Tokyo, Japan)로 감압농축 하여 동결건조한 후 사용하였다. 기장 열수추출물의 수율은 5.3%였으며 -70°C에 보관하였다.

실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 5주령 C57/BL6J 마우스 40마리를 일본(Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. 사육환경에 적응시키기 위해 온도 23±2°C, 습도 55±5%의 조건에서 일반 고형사료로 실험 시작 전 10일 동안 예비사육한 후 난피법에 의해 총 4군으로 나누었으며 각 군에 9마리씩 배정하였다. 실험군은 대조군(n=9, normal fat diet, NFD), 고지방식이 대조군(n=9, high fat diet, HFD), 1% 기장 열수추출물군(n=9, 1% hog millet diet, 1% HM), 2% 기장 열수추출물군(n=9, 2% hog millet diet, 2% HM)으로 나누었으며, 1% HM군과 2% HM군은 고지방식이에 기장 열수추출물 분말을 각각 식이의 1% 및 2% 첨가하였다. 총 사육기간은 7주였다.

본 실험에 사용한 기본식이는 AIN-93G(9)의 식이조성에 준하였으며, 단백질 급원으로는 카제인(Samyang, Seoul, Korea)을 공급하고, 탄수화물 급원은 옥수수 전분(Samyang)을 사용하였다. 고지방 식이는 총 열량의 45%가 되도록 옥수수기름(Cheiljedang, Seoul, Korea)과 쇠기름(Wako, Osaka, Japan)을 공급하였다(Table 1). 식이에 첨가된 기장 열수추출물의 농도는 선행연구결과를 바탕으로 설정하였다. 즉, 체내 지방 축적 억제 효과가 있었던 1%와 이보다 높은 농도인 2%를 추가하여 식이 내 기장 열수추출물의 지방간 개선효과를 보고자 하였다(10).

제조한 실험식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 모든 실험식이는 사육기간 동안 냉장 보관하였다. 실험기간동안 체중은 매주 1회, 식이섭취량은 매주 3회 일정한 시간에 측정하였다.

실험동물의 희생 및 시료 채취

실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식한 후 가벼운 에테르 마취 하에서 개복하여 심장으로 부터 혈액을 채혈하고 간조직을 채취하였다. 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 1,500×g에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다

Table 1. Diet compositions of four experimental diets¹⁾

Group ²⁾	ND	HFD	HFD+1%HM	HFD+2%HM
Corn starch	397.49	266.5	256.5	246.5
Casein	200	240.4	240.4	240.4
Dextrin	132	88.5	88.5	88.5
Sucrose	100	67.1	67.1	67.1
Beef tallow	0	215.46	215.46	215.46
Soybean oil	70	11.34	11.34	11.34
Mineral mix ³⁾	35	42.1	42.1	42.1
Vitamin mix ⁴⁾	10	12	12	12
L-Cysteine	3	3.6	3.6	3.6
Choline bitartate	2.5	3	3	3
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.017	0.017	0.017
Hog millet	0	0	10	20

¹⁾Experimental diets were prepared according to AIN-93G purified diets.

²⁾NFD: normal fat diet, HFD: high fat diet, HFD+1HM: high fat diet+1% hog millet water extract, HFD+2HM: high fat diet+2% hog millet water extract.

³⁾AIN-93G Mineral mix. ⁴⁾AIN-93 Vitamin mix.

Table 2. Grade of the histopathological lesions of NAFLD

	Definition	Score
Steatosis grade	Low-to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis	
	<5%	0
	5%~33%	1
	>33%~66%	2
	>66%	3

며, 분석 전까지 -70°C 에 냉동 보관하였다. 혈액을 채혈한 후 간조직을 적출하고 생리식염수(0.9% NaCl)에 세척, 물기 제거한 후 무게를 측정하였으며, 즉시 드라이아이스로 급냉시켜 -70°C 에 냉동 보관하였다. 본 연구에서는 복강 지방조직(retroperitoneal adipose tissue)과 부고환 지방조직(epididymal adipose tissue)을 적출한 후 이들의 합을 내장 지방조직량(visceral adipose tissue)으로 계산하였다.

간조직 검사

적출한 간조직의 일부를 10% buffered neutral formalin 용액에 24시간 고정한 후 알코올로 탈수하고, 파라핀에 포매한 후 $6\ \mu\text{m}$ 두께로 잘라 hematoxylin & eosin(H&E, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 염색하여 간조직 검사를 시행하였다. 조직 소견은 지방이 침착된 정도에 따라 변형된 Brunt법(11)을 이용하여 지방증을 분류하였다(Table 2).

혈청 지질 수준 측정

혈청 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도는 아산제약(Asan Co., Seoul, Korea)의 enzymatic kit를 사용하여 각각 비색 정량하였다.

복강내 당부하 검사

실험 종료직전 복강 내 당부하 검사(intraperitoneal glucose tolerance test; IGTT)를 실시하여 내당능장애를 평가하였다. 이를 위해 실험동물을 16시간 절식 후 기저 혈당을 측정하고 복강 내로 50% 포도당 용액 $2\ \text{g/kg}$ 을 투여한 후 30분, 60분, 120분 간격으로 꼬리 채혈하여 혈당측정기(One-Touch Ultra Glucose Analyser, LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

인슐린 저항성 측정

인슐린 저항성은 mouse insulin ELISA kit(Millipore Corp., Billerica, MA, USA)를 사용하여 혈청 인슐린 농도를 정량한 후 the homeostasis model assessment of insulin resistance(HOMA-IR)를 이용하여 측정하였다.

간조직의 지방대사 관련 유전자 발현 측정

간조직에서 지방산 합성 및 산화와 관련된 유전자 발현 변화를 살펴보았다. 이를 위해 간조직 $100\ \text{mg}$ 씩 취하여 파쇄한 후 TRIzol reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA를 SYBR Green TM kit(Quantitect™ SYBR Green PCR, Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 real-time quantitative PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C 에서 15분간 변성(denaturation), 51°C 에서 30초간 접합(annealing) 및 72°C 에서 30초간 합성(extension) 반응의 3단계를 40회 반복하였으며, delta-delta 계산 방법(12)을 이용하여 증폭시킨 유전자의 상대적 발현 정도를 계산하였다. 본 연구에서 사용한 유전자의 primer의 유전정보는 Table 3과 같다.

통계분석

실험결과는 SAS 프로그램(ver. 9.3, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계처리 하였다. 모든 결과는 평균과 표준오차(mean±SD)로 나타내었다. 실험군 간의 유의성은 분산분석(ANOVA)으로 Duncan's multiple range test에 의하여 유의성 차이를 $p<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

체중 변화, 식이섭취량 및 조직무게

본 연구진은 선행연구 결과 지방세포 분화억제능이 뛰어난 기장 열수추출물을 식이에 첨가하여(7) 이의 지방간 및 혈중 지질 개선 효능을 검증하고자 하였다. 실험기간 동안 체중 변화 및 식이섭취량은 Fig. 1과 같았다. 실험시작 시 체중은 $20.19\sim 20.98\ \text{g}$ 으로 실험군 간의 차이가 없었으며(Fig. 1A) 식이 섭취기간 중 모든 군의 평균 식이섭취량에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 1B). 고지방식이임에도 불구하고

Table 3. Primer sequences used for real-time PCR¹⁾

Gene	Primer sequences	GenBank™ NO.
CPT1	5'-CCA GGC TAC AGT GGG ACA TT-3'	NM_013495
	5'-GAA CTT GCC CAT GTC CTT GT-3'	
L-FABP	5'-TGG ACC CAA AGT GGT CCG CA-3'	NM_017399
	5'-AGT TCA GTC ACG GAC TTT AT-3'	
PPAR α	5'-ATC CAC GAA GCC TAC C-3'	NM_011144
	5'-CAC ACC GTA CTT TAG CAA G-3'	
SCD1	5'-TCG CCC CTA CGA CAA GAA CA-3'	NM_009127
	5'-CCG GTC GTA AGC CAG GCC CA-3'	

¹⁾CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; L-FABP, liver-fatty acid binding protein; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; SCD-1, stearyl-CoA desaturase 1.

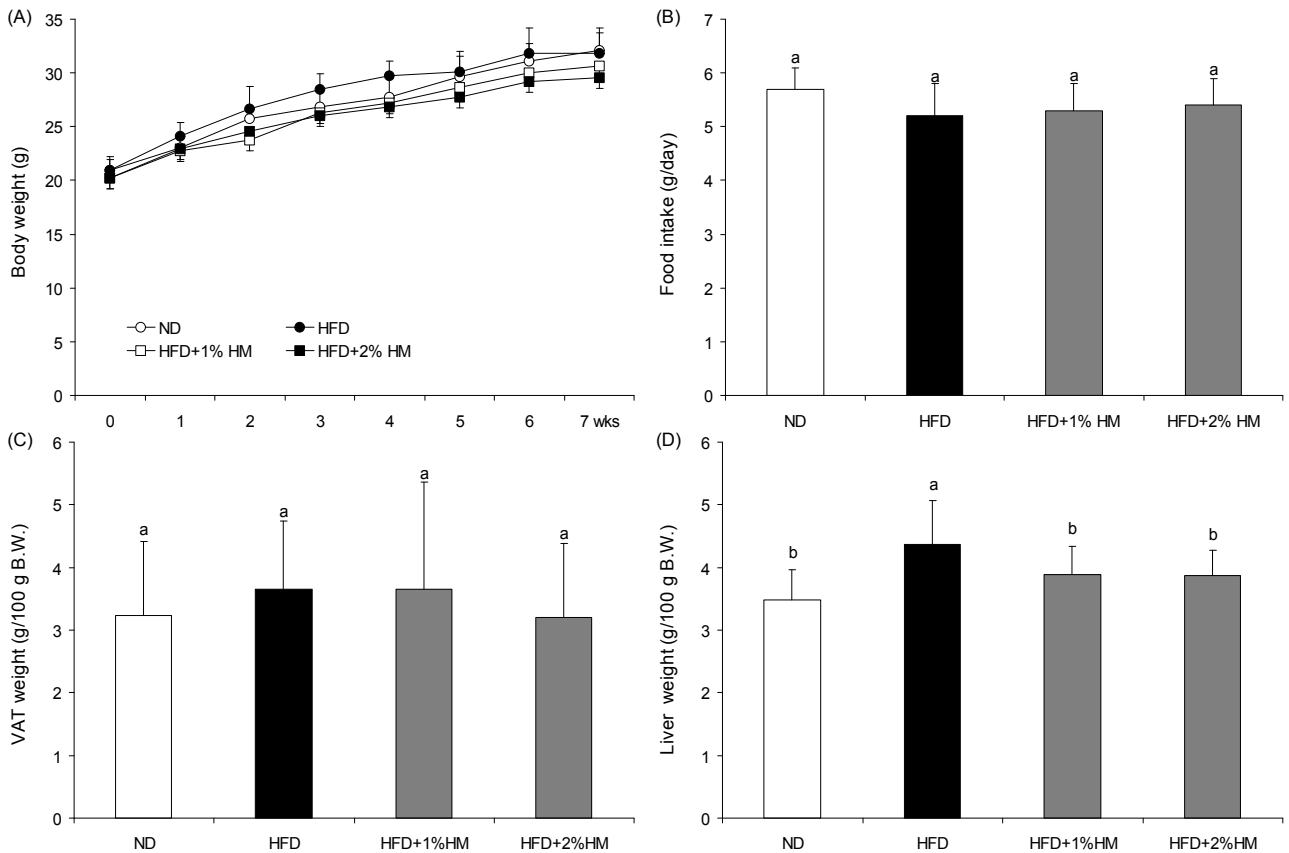


Fig. 1. Effect of HM on body weight gain, food intake, VAT weight, and liver weight in HFD-fed C57BL/6J mice. Mice (n=9) were treated with vehicle or indicated concentrations of HM (1% or 2% diet) by daily oral administration for 7 weeks. Body weight was measured once a week and food intake was measured three times a week. VAT (visceral adipose tissue) and liver were removed and weight. Values were expressed as mean±SD. The bars with different letters are significantly different (p<0.05) from each other. HM, hog millet; ND, normal diet; HFD, high fat diet.

고 체중의 유의한 차이가 없었던 이유는 식이 내 지방 함량과 사육기간의 차이이다. 총열량의 60% 이상을 지방으로 공급하는 고지방식이의 경우 사육기간이 8주인 경우 유의적인 체중증가가 일어나지만(13,14) 본 연구에서는 보다 현실성 있는 식이조성으로 지방을 공급하고자 45% 고지방식이

를 선정하였다. 그 결과 본 사육기간 내에 유의적으로 체중이 증가하지 않았지만 고지방식으로 인한 지방간이 유도되었으며(Fig. 2) 간조직 무게가 유의적으로 증가하였고(Fig. 1D, p<0.05) 혈청 지질 농도도 유의한 차이를 보였다(Fig. 3A~D).

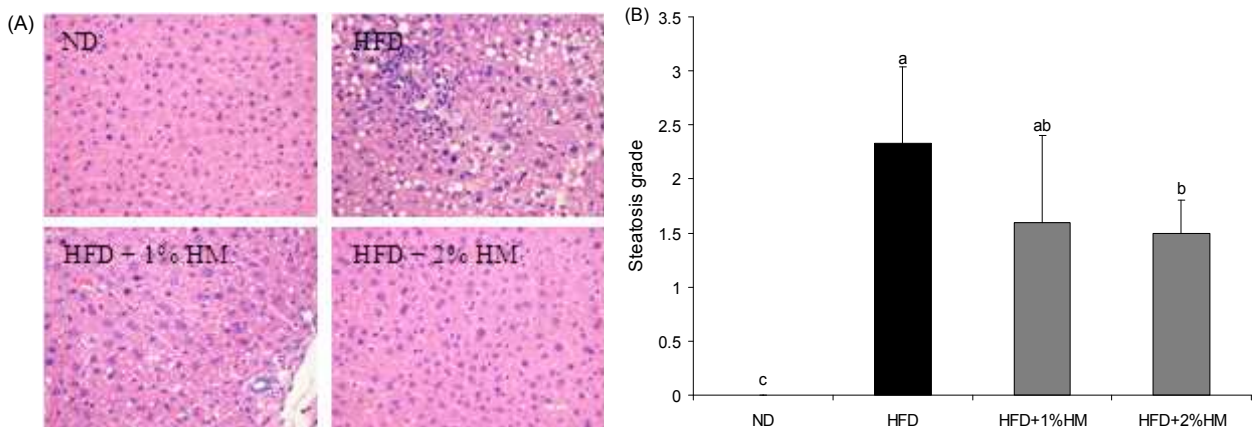


Fig. 2. Effect of HM on microphotographs of the liver in HFD-fed C57BL/6J mice. Mice (n=9) were treated with vehicle or indicated concentrations of HM (1% or 2% diet) by daily oral administration for 7 weeks. Representative hematoxylin and eosin (H&E) stain of liver section (magnification×400) from ND or HFD mice. Values were expressed as mean±SD. The bars with different letters are significantly different (p<0.05) from each other. HM, hog millet; ND, normal diet; HFD, high fat diet.

실험 종료 시 기장 열수추출물 급여에 따른 체중변화 및 내장지방조직 무게는 감소하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1C). 간조직 무게는 고지방식이군이 정상식이군에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 1% 및 2% 기장 열수추출물 섭취군에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 1D, $p < 0.05$). 비알코올성 지방간은 비만 특히 내장비만과 밀접한 관련성을 가지고 있으나, 흥미로운 점은 비알코올성 지방간 환자의 20~40%에서는 정상체중을 가지고 있는 경우에도 지방간이 발생할 수 있다는 점이다(15,16). 이는 비알코올성 지방간은 비만의 결과가 아닌 원인이거나 비만 발생과 무관하게 일어날 수 있음을 의미한다. 본 연구결과 고지방식이 섭취군의 경우 정상식이 섭취군에 비해 체중과 내장지방의 무게는 유의한 변화가 보이지 않은 반면, 간조직 무게가 유의하게 증가한 것도 이러한 가능성을 시사한다. 또한 기장 열수추출물 섭취로 인해 지방조직의 무게가 감소하였다. 이러한 결과는 실험군의 간조직 무게 감소 효과가 식이 섭취량 및 열량 섭취량에 기인하지 않으며, 기장 열수추출물의 효과임을 의미한다.

간조직 검사

실험 종료 후 간조직의 지방증 정도를 현미경으로 관찰한

결과는 Fig. 2와 같다. 정상군의 간조직은 지방축적을 거의 볼 수 없으나 고지방식 대조군은 지방축적 정도가 유의적으로 증가하였다. 그러나 2% 기장 열수추출물 첨가 식이 처리군은 지방증의 정도가 완화되어 고지방식 대조군과 대조 시 의미 있게 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2, $p < 0.05$). 따라서 기장 열수추출물 섭취군의 간조직 무게 감소효과는 간조직 내 지방축적 억제와 관련이 되고 이는 또한 기장 열수추출물의 효능이 체내 지방대사 조절과 관련됨을 시사한다.

혈청 지질 수준

인슐린 저항성이 증가할 때 혈중 중성지방이 상승하고 HDL-콜레스테롤이 감소하는데 이러한 증상은 NAFLD 환자에서 발견되며(17), 중성지방이 상승하고 HDL-콜레스테롤이 감소되어 있는 경우 비알코올성 지방간의 발병 위험이 2배 이상 된다고 보고된 바 있다(18). 기장 열수추출물의 섭취가 혈청 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도 및 HDL-/총 콜레스테롤에 미치는 영향은 Fig. 3과 같다. 혈청 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도는 고지방대조군(HFD)에서 정상군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으며 기장 열수추출물 1% 및 2% 식이보충 시 모두 유의하게 감소하였다(Fig. 3A, 3B, $p < 0.05$). 혈청 HDL-콜레스테롤 수준은 고지

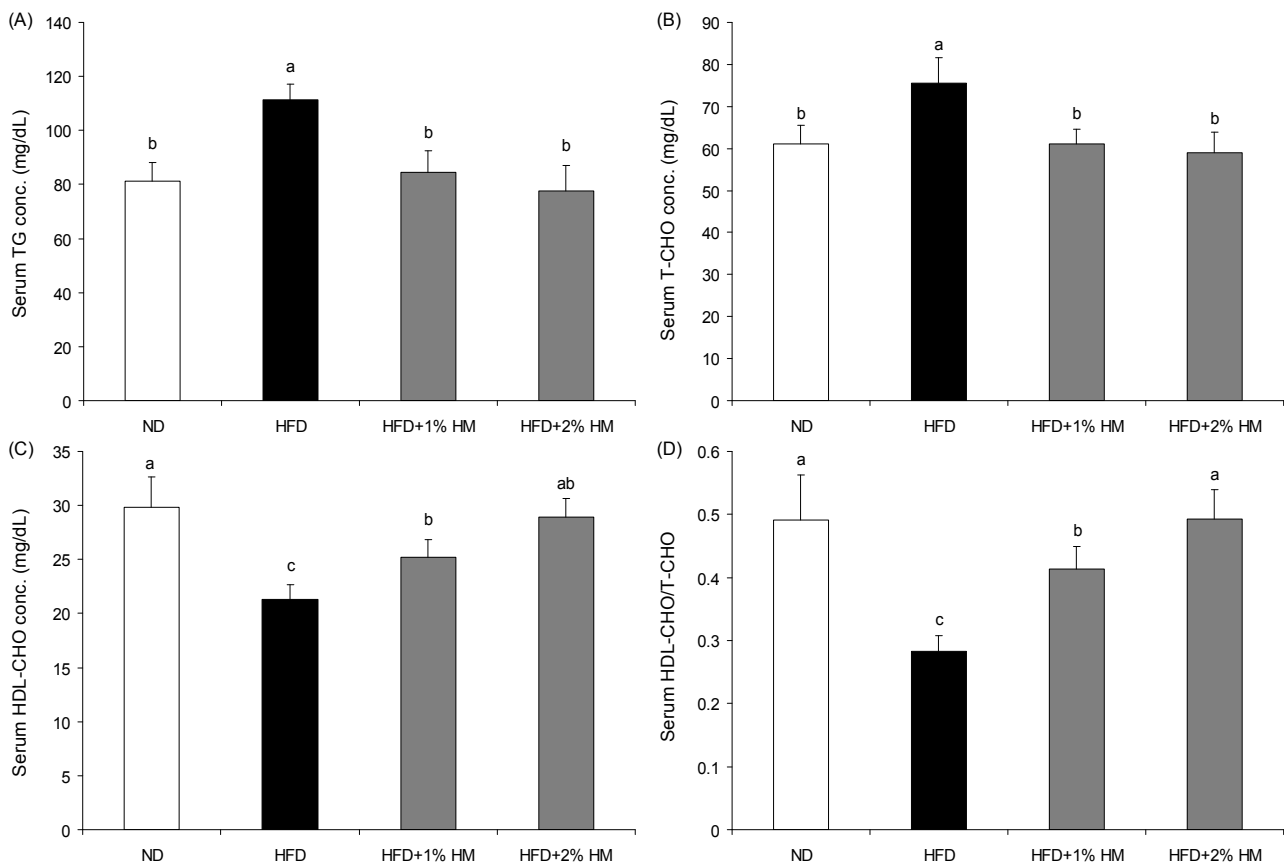


Fig. 3. Effect of HM on serum lipid concentrations in HFD-fed C57BL/6J mice. Mice (n=9) were treated with vehicle or indicated concentrations of HM (1% or 2% diet) by daily oral administration for 7 weeks. The amount of TG, T-CHO, and HDL were measured by ELISA. Values were expressed as mean \pm SD. The bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$) from each other. TG, triglycerides; T-CHO, total-cholesterol; HDL, high density lipoprotein; HM, hog millet; ND, normal diet; HFD, high fat diet.

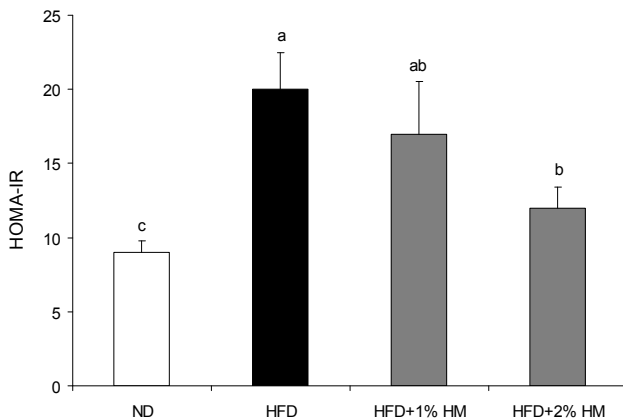


Fig. 4. Effect of HM on HOMA-IR in HFD-fed C57BL/6J mice. Mice (n=9) were treated with vehicle or indicated concentrations of HM (1% or 2% diet) by daily oral administration for 7 weeks. The amount of insulin was measured by ELISA. Values were expressed as mean±SD. The bars with different letters are significantly different ($p<0.05$) from each other. HM, hog millet; ND, normal diet; HFD, high fat diet.

방대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 낮았으며 기장 열수추출물 1% 및 2% 섭취군 모두 이의 수준을 의미 있게 증가시켰다(Fig. 3C, $p<0.05$). HDL-/총 콜레스테롤을 비율 역시 모든 기장 열수추출물 군에서 유의하게 높게 나타나 혈청 지질 수준이 개선되었음을 확인하였다(Fig. 3D, $p<0.05$). 따라서 기장 열수추출물 섭취군의 간조직 무게 감소 및 지방증 개선과 더불어 혈청 지질 수준도 개선되어 기장 열수추출물이 체내 지질 감소에 효과적일 수 있다는 가능성을 제시하였다.

인슐린 저항성

인슐린은 혈당이 높아지면 이를 낮추기 위해 췌장의 β -세포에서 분비되는 호르몬으로 인슐린 저항성이란 인슐린의 체내 작용이 떨어진 상태를 의미한다. 이는 제2형 당뇨병의 발병원인으로서만이 아니고, 외형상 건강한 성인에게서 비알코올성 지방간을 비롯한 각종 성인병의 원인이 될 수 있다는 보고가 축적되면서 많은 주목을 받고 있다(19,20). 또한

지질이상과 인슐린 저항성은 밀접한 관련이 있어 인슐린 저항성이 증가할 때 혈중 중성지방이 상승하고 HDL-콜레스테롤이 감소하며 이러한 경우 비알코올성 지방간의 발병 위험이 2배 이상 증가되는 것으로 알려져 있다(18). 본 연구에서 기장 열수추출물의 첨가식이 급여가 HOMA-IR에 미친 영향은 Fig. 4와 같다. 식이 종료 후 측정된 혈청 인슐린 수준은 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서 유의하게 증가하였으며, 1% 및 2% 기장 열수추출물 섭취군 모두 고지방식이군에 비하여 유의적으로 감소하였다(Fig. 4, $p<0.05$). 이는 기장 열수추출물 함유 식이에 의해 인슐린 민감도와 저항성이 개선되었음을 의미한다.

당부하 검사

당부하 검사는 혈액 내 포도당이 세포 내로 유입되는 능력을 측정하기 위한 실험으로, 본 실험에서는 일정량의 포도당을 투여한 후 혈액 내 포도당 농도를 매 30분 간격으로 2시간 동안 측정하였으며 그 결과는 Fig. 5에 제시하였다. 공복 시 혈당수준은 군간 유의적인 차이가 없었으며, 포도당 부하 30분과 60분 후 기장 열수추출물 2% 식이군의 경우 고지방군에 비해 유의적으로 낮은 수준이었고, 120분 후에는 유의적인 차이 없이 감소하였다(Fig. 5A, $p<0.05$). 그러나 곡선하 포도당 면적(area under the curve) 비율은 기장 열수추출물 1% 및 2%군에서 의미 있게 감소하였다(Fig. 5B, $p<0.05$). 이는 고지방식이로 유도된 인슐린 내성으로 인해 조직 내 포도당 흡수가 감소되고 인슐린의 작용이 저하되어 당 이용능력이 저하되는 것으로 해석되며 기장 열수추출물의 급여가 내당능을 회복시키는 작용이 있는 것으로 판단된다. 즉, 기장 열수추출물 함유 식이가 당 섭취에 의한 혈당 상승을 억제하고 초기 혈당으로 회복시키는 작용이 있으며 이는 식후 고혈당 조절 및 내당능 회복에 기여할 수 있음을 의미한다. 체중이 유의하게 증가하지 않았더라도 지방의 섭취량이 증가하면 포도당 내성이 악화되는 것으로 알려져 있다(21).

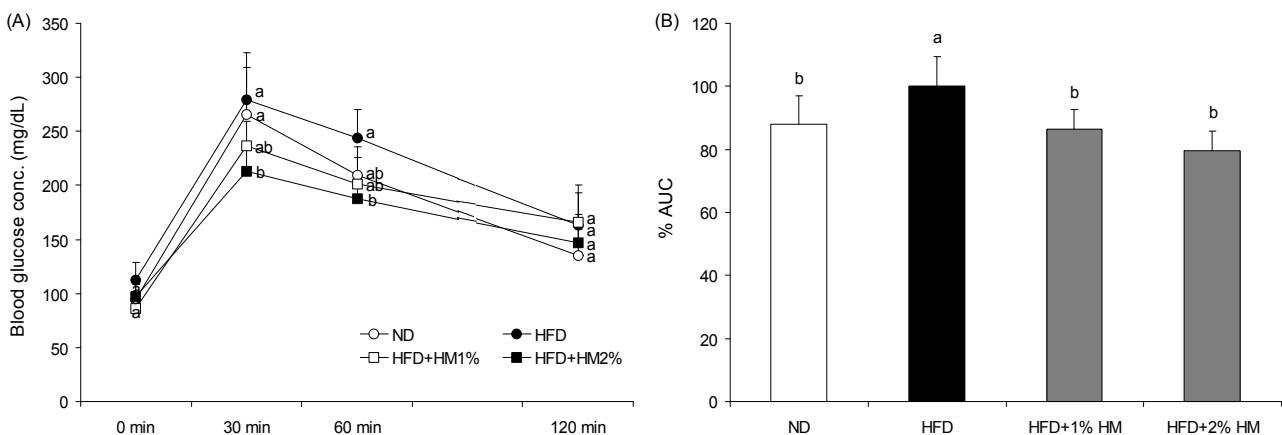


Fig. 5. Effect of HM on blood glucose levels and % AUC obtained during the intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT) in HFD-fed C57BL/6J mice. Mice (n=9) were treated with vehicle or indicated concentrations of HM (1% or 2% diet) by daily oral administration for 7 weeks and then the IGTT (2 g/kg) was performed. Values were expressed as mean±SD. The bars with different letters are significantly different ($p<0.05$) from each other. HM, hog millet; ND, normal diet; HFD, high fat diet.

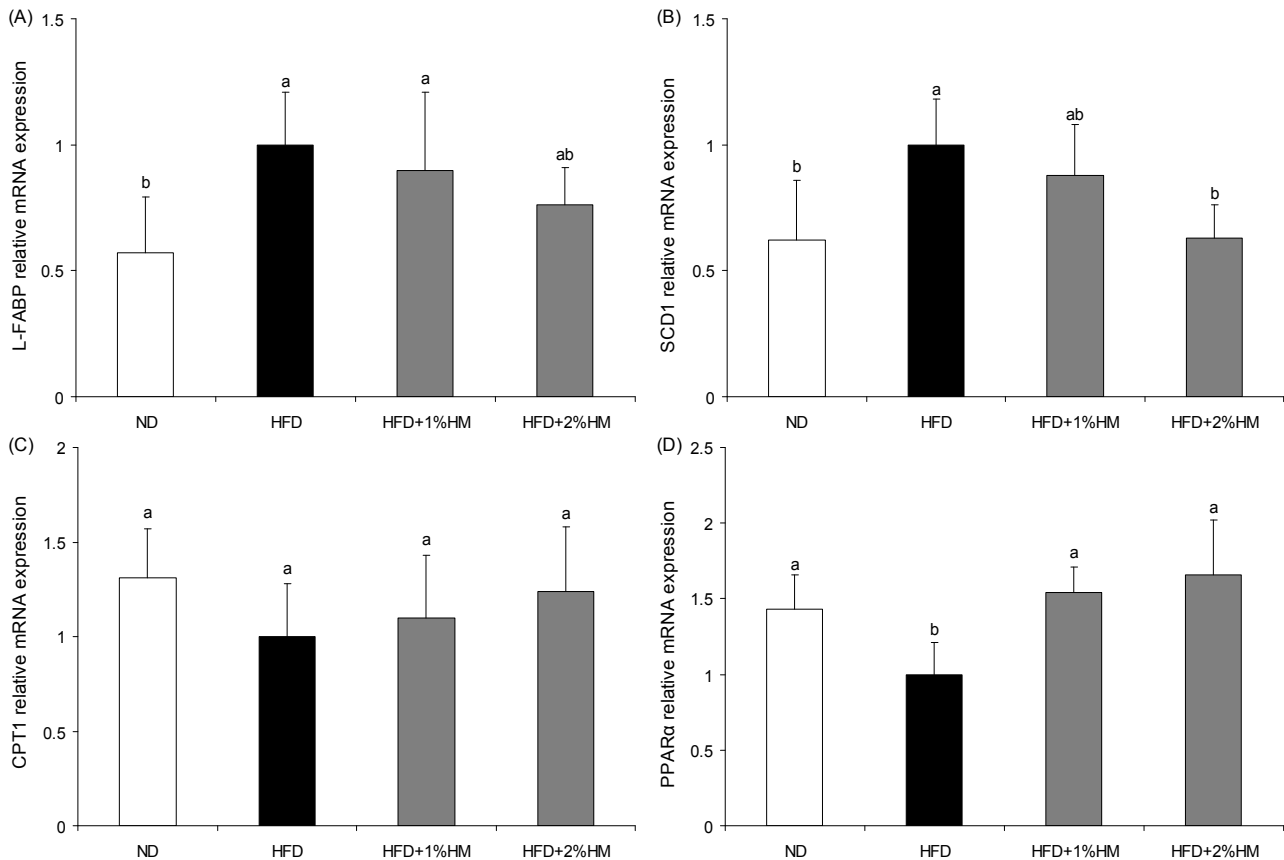


Fig. 6. Effect of HM on relative mRNA expression in livers from HFD-fed C57BL/6J mice. Mice (n=9) were treated with vehicle or indicated concentrations of HM (1% or 2% diet) by daily oral administration for 7 weeks. The relative mRNA expression in livers was measured by real-time PCR. Values were expressed as mean±SD. The bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$) from each other. L-FABP, liver-fatty acid binding protein; SCD-1, stearoyl-CoA desaturase 1; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase 1; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; HM, hog millet; ND, normal diet; HFD, high fat diet.

간조직 유전자 발현

본 실험에서는 간조직 내 지방산 합성 및 산화에 관련된 인자의 유전자 발현 변화를 측정함으로써 기장 열수추출물 첨가식이 비알코올지방간 개선효과의 일부를 규명하고자 하였다. 다량의 자유지방산이 간조직으로 유입되거나 간조직 내 지방 생성 경로를 통해 지방산이 합성되면 간조직 내에 지방산 축적이 일어난다. 이렇게 축적된 지방산은 미토콘드리아, 마이크로솜 및 퍼옥시솜에서 산화작용으로 분해되거나 중성지방 형태로 축적되는데 이 과정에 결함이 생기면 지방간이 유발된다(20). L-FABP(liver-fatty acid binding protein)는 간에서 장쇄지방산이 중성지방으로 합성되는 과정을 촉진시키는 인자이다(22). SCD1(stearoyl-CoA desaturase 1)은 단일불포화지방산의 생합성과정의 속도조절효소로서 지방 생성 경로에서 stearic acid(18:0)를 oleic acid(18:1)로 전환되도록 촉진하는 것으로 알려져 있다(23). 본 연구결과 고지방식이군은 지방산 합성 촉진 인자인 L-FABP 및 SCD1의 mRNA 발현이 유의적으로 증가한 반면, 2% 기장 열수추출물 함유식이 섭취군은 L-FABP 및 SCD1의 mRNA 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 6A, 6B, $p < 0.05$).

한편 지방산화 관련 유전자 전사의 주된 조절 요인인 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor)은 발현되는 조직 및 부위에 따라 α , γ , δ 의 세 가지 isoform으로 분류되는데, PPAR α 는 주로 간에 많이 분포되어 있고 미토콘드리아내의 지방산 산화에 필요한 핵 내 유전자를 발현시키는 데 관여하고 있다(24). 한편 지방산이 세포내로 유입되어 산화되기 위해서는 막 내부의 transferase의 도움이 필요하게 되는데 CPT1(carnitine palmitoyltransferase 1)은 이들 효소 중 지방산 산화의 rate limiting 효소로 에너지를 생성하는 지질 이용의 중추역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다(25). 본 연구결과 간조직의 PPAR α 의 mRNA는 고지방식 대조군에 비해 기장 열수추출물 1%와 2% 첨가식이군에서 모두 유의적으로 증가하였고(Fig. 6D, $p < 0.05$) CPT1의 mRNA는 고지방식이군과 비교했을 때 유의한 차이는 없었으나 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6C). 따라서 기장 열수추출물 첨가식은 고지방식에 의한 지방산 합성을 억제하고 지방산 산화를 촉진함으로써 비알코올성 지방간 및 이와 관련된 증상을 완화시키는 것으로 보인다.

요 약

비알코올성 지방간은 인슐린저항성을 근간으로 하는 대사증후군의 원인으로 생각되고 있으며 최근 그 발병율이 증가하고 있다. 본 연구진은 기장 열수추출물을 식이에 첨가하여 고지방식에 의해 인위적으로 지방간을 유도한 마우스에게 섭취시킨 후 혈청 내 생물학적 수치와 간조직 검사를 통하여 비알코올성 지방간 억제 효과를 검토하였다. 그 결과, 식이섭취량은 차이가 없었으나 간조직 무게가 1% 및 2% 기장 열수추출물 첨가식이군에서 유의적으로 감소하였고 ($p < 0.05$) 간조직 내 지방 축적이 유의적으로 감소하였음을 확인하였다. 또한 기장 열수추출물 첨가식이군의 경우 고지방식 대조군에 비해 혈청 중성지방 및 총 콜레스테롤이 감소하였고 ($p < 0.05$), HDL과 HDL-/총 콜레스테롤의 비율이 유의적으로 증가하여 ($p < 0.05$) 혈액의 지질 조성이 개선되었음을 알 수 있었다. HOMA-IR 및 포도당 내성 검사 결과 2% 기장 열수추출물 첨가군의 경우 이들 모두 유의적으로 감소하여 고지방식에 의한 인슐린 저항성 및 당흡수 부전을 기장 열수추출물이 완화시켰다 ($p < 0.05$). 한편 간조직에서 지방산 대사와 관련된 인자들의 유전자 발현을 측정된 결과 지방산 합성에 관여하는 L-FABP와 SCD1은 2% 기장 열수추출물 섭취군에서 유의적으로 감소하였고 ($p < 0.05$) 지방산 산화와 관련된 PPAR α 는 1% 및 2% 기장 열수추출물 섭취군에서 모두 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 이상의 혈청 및 조직의 생물학적 수치와 간조직 검사 결과를 미루어 볼 때 기장 열수추출물 첨가 식이는 고지방식에 의해 유도된 마우스의 비알코올성 지방간 치유 혹은 예방에 긍정적으로 기여할 수 있음을 시사해 준다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: pj008554)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

문 헌

- Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK, Kim BI. 2006. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 138-143.
- Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. 2006. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut* 55: 123-130.
- Jun DW. 2011. Non-alcoholic fatty liver disease. *Korean J Hepatol* 17: S332-S336.
- Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. 2003. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37: 917-923.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50: 1844-1850.
- Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. 2002. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3023-3028.
- Park MY, Seo DW, Lee JY, Sung MK, Lee YM, Jang HH, Choi HY, Kim JH, Park DS. 2011. Effects of *Panicum miliaceum* L. extract on adipogenic transcription factors and fatty acid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res Pract* 5: 192-197.
- Kwak CS, Lim SJ, Kim SA, Park SC, Lee MS. 2004. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean buckwheat, sorghum, millet and Job's tears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 921-929.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 1993. 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* 123: 1939-1951.
- Park MY, Jang HH, Kim JB, Yoon HN, Lee JY, Lee YM, Kim JH, Park DS. 2011. Hog millet (*Panicum miliaceum* L.)-supplemented diet ameliorates hyperlipidemia and hepatic lipid accumulation in C57BL/6J-ob/ob mice. *Nutr Res Pract* 5: 511-519.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. 1999. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467-2474.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Macotela Y, Emanuelli B, Bång AM, Espinoza DO, Boucher J, Beebe K, Gall W, Kahn CR. 2011. Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. *PLoS One* 6: e21187.
- Satapathy SK, Ochani M, Dancho M, Hudson LK, Rosas-Ballina M, Valdes-Ferrer SI, Olofsson PS, Harris YT, Roth J, Chavan S, Tracey KJ, Pavlov VA. 2011. Galantamine alleviates inflammation and other obesity-associated complications in high-fat diet-fed mice. *Mol Med* 17: 599-606.
- Yasutake K, Nakamuta M, Shima Y, Ohyama A, Masuda K, Haruta N, Fujino T, Aoyagi Y, Fukuizumi K, Yoshimoto T, Takemoto R, Miyahara T, Harada N, Hayata F, Nakashima M, Enjoji M. 2009. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. *Scand J Gastroenterol* 44: 471-477.
- Nakamuta M, Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Yada M, Yada R, Takemoto R, Fukuizumi K, Harada N, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Enjoji M. 2008. The significance of differences in fatty acid metabolism between obese and non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 22: 663-667.
- Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. 2002. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3023-3028.
- Struben VM, Hespeneheide EE, Caldwell SH. 2000. Nonalco-

- holic steatohepatitis and cryptogenic cirrhosis within kindreds. *Am J Med* 108: 9-13.
19. Mather KJ, Hunt AE, Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Katz A, Quon MJ, Baron AD. 2001. Repeatability characteristics of simple indices of insulin resistance: implications for research applications. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5457-5464.
 20. Smith BW, Adams LA. 2011. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48: 97-113.
 21. Ma T, Liaset B, Hao Q, Petersen RK, Fjære E, Ngo HT, Lillefosse HH, Ringholm S, Sonne SB, Treebak JT, Pilegaard H, Frøylund L, Kristiansen K, Madsen L. 2011. Sucrose counteracts the anti-inflammatory effect of fish oil in adipose tissue and increases obesity development in mice. *PLoS One* 6: e21647.
 22. von Eynatten M, Baumann M, Heemann U, Zdunek D, Hess G, Nawroth PP, Bierhaus A, Humpert PM. 2010. Urinary L-FABP and anaemia: distinct roles of urinary markers in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 40: 95-102.
 23. Ntambi JM. 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40: 1549-1558.
 24. Lapsys NM, Kriketos AD, Lim-Fraser M, Poynten AM, Lowy A, Furler SM, Chisholm DJ, Cooney GJ. 2000. Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4293-4297.
 25. McGarry JD, Brown NF. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 15: 1-14.

(2012년 1월 16일 접수; 2012년 3월 22일 채택)