

랫드에서 혈액지질 감소에 관한 오메가 6와 3 지방산 비율의 생화학적 메카니즘

이승형 · 김진수[†] · 최두형 · 김창래 · 엄경환 · 박병성[†]

강원대학교 동물생명과학대학
(2017년 5월 26일 접수: 2017년 6월 22일 수정: 2017년 6월 28일 채택)

Biochemical mechanism of the ratio of omega 6 to 3 fatty acid on blood lipid reduction in rats

Seung-Hyung Lee · Jin-Soo Kim[†] · Du-Hyeong Choi · Chang-Rae Kim
Kyung-Hwan Um · Byung-Sung Park[†]

*College of Animal Life Science, Kangwon National University,
Chuncheon, Gangwondo 200-701, Republic of Korea
(Received May 26, 2017; Revised June 22, 2017; Accepted June 28, 2017)*

요약 : 본 연구는 차세대 랫드에서 혈액 지질 감소에 관한 식이 내 오메가 6와 3 지방산 비율의 생화학적 메카니즘을 조사하였다. 실험처리군은 오메가 6:오메가 3 비율 0 (대조구), 1:1, 8:1, 19:1로 구분하였다. 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, 저밀도지질단백질(LDL-C), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose의 수준은 오메가 6:오메가 3 비율 1:1 그룹에서 가장 낮았다. 혈액 고밀도지질단백질(HDL-C), 인지질의 수준은 오메가 6:오메가 3 비율 1:1 그룹이 가장 높았다. HMG-CoA reductase activity는 전체 저리구 가운데 오메가 6:오메가 3 비율 1:1, 8:1 그룹에서 가장 강하게 억제되었으나 분을 통한 스테롤의 배설량은 촉진되었다. 혈액 오메가 6:오메가 3 비율은 섭취한 식이 내 오메가 6:오메가 3 비율 증가에 따른 농도 의존적으로 감소하였다. 본 연구결과는 부모 세대로부터 차세대 랫드에 이르기까지 오메가 6:오메가 3 비율이 8:1 이하로 낮아진 식이를 섭취하면 영양소 대사작용 활성화 메카니즘에 의한 혈액 중 유해지질 감소, 간 기능 유지 및 성장을 자극한다는 새로운 사실을 나타낸다.

주제어 : 오메가 6:오메가 3, 차세대 랫드, 혈액지질, 스테롤, HMG-CoA reductase, 스테롤

Abstract : This study was investigated the biochemical mechanism on reducing blood lipids in second-generation rats fed diet with different omega 6 to omega 3 fatty acid ratio. The experiment treatment groups were classified into the groups with the omega 6 to omega 3 ratios of 0 (control group), 1:1, 8:1, and 19:1, respectively. The levels of the blood triglyceride, total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase

[†]Corresponding author
(E-mail: kjs896@kangwon.ac.kr; bspark@kangwon.ac.kr)

(ALT) and glucose were lowest in the group with the omega 6 to omega 3 ration of 1:1. The levels of high density lipoprotein-cholesterol and phospholipid were highest in the group with the omega 6 to omega 3 ration of 1:1. The HMG-CoA reductase activity was suppressed in the groups with the omega 6 to omega 3 ratio of 1:1 and 8:1 compared with that in the control group, but the excretion of sterol through feces was promoted. The blood omega 6 to omega 3 ratio decreased in a concentration-dependent manner depending on the increase in the omega 6 to omega 3 ratio within the ingested diet. The results of this study demonstrated a new finding that when the parent generation and second-generation rats ingested the diet with the omega 6 to omega 3 ratio of below 8:1, harmful lipids in the blood were reduced, the liver functions were maintained, and the growth was promoted due to the nutrient metabolism activation mechanism.

Keywords : Omega 6 to omega 3, next generation rat, immune organ, blood lipid, HMG-CoA reductase, sterol

1. 서론

오메가 6, 오메가 3 지방산은 둘 다 필수지방산으로써 에이코사노이드 합성 및 생체 내 필수적인 기능을 수행한다. 생체대사 경로에서 동일한 효소체계 ($\Delta 6$ -desaturase)에 대하여 서로 경쟁적으로 작용하며 상호 전환할 수 없다 [1]. 따라서 모지방산(parent fatty acid)의 섭취에 의해 생체활성 물질인 에이코사노이드의 생합성이 결정된다. 경제발전이 따른 급속한 산업화와 함께 식용유 산업이 발달하면서 포화지방산 및 오메가 6 지방산의 섭취가 늘어나고 오메가 3 지방산의 섭취가 줄어들면서 심장혈관계 질환(cardiovascular disease, CVD)으로 인한 사망률이 증가하고 있다 [2, 3]. 과학기술의 발달과 지식기반이 확장되면서 지금까지 알려져 왔던 건강을 위한 오메가 3 지방산의 중요성은 오메가 6와 오메가 3 지방산의 이상적인 비율 4:1 이하로 진화하고 있다 [4]. 세계보건 기구는 식품 중의 비율이 4:1 이면 자연식품으로서 명명할 수 있음을 권장하였다 [5, 6]. 오메가 6의 과잉, 즉 오메가 6와 오메가 3 비율이 높은 식품의 섭취는 혈액 LDL-C를 높임과 동시에 대사성질환의 원인이 될 수 있다 [7,8]. 지질대사의 생화학적 메카니즘 연구에서 혈액 지질의 생체지표, 간에서 HMG-CoA reductase activity 및 분을 통해서 체외로 배설되는 중성스테롤과 담즙산 분획의 배설량을 측정하는 것은 중요하다 [9, 10]. 식품에 들어있는 오메가 6와 오메가 3 비율의 증가는 염증, 혈액응고, 종양, 당뇨, 고혈압, 알츠하이머치

매, 자가면역질환, 비만 및 갱년기 여성의 혈관질환의 원인이 될 수 있다 [11]. 과잉의 오메가 6을 함유하는 서방인의 식품 내 오메가 6와 오메가 3 비율은 15-20:1이며 그린 랜드 에스키모인 1:1, 바닷가 근처에서 살고 있는 일본인 12:1이며 이러한 국가에서 CVD로 인한 사망률은 각각 45%, 7%, 12%로써 알려졌다 [12, 13]. 오메가 6와 오메가 3 비율은 수컷 랫드의 번식 [14] 및 임신한 랫드에서 혈액 지방산 프로파일과 프로스타글란딘 생합성에 영향을 미친다 [15]. 고지방식이 섭취 랫드와 마우스에서 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮은 식이를 섭취할 경우 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-C를 낮추고 인간의 대사성 질환 예방에 도움이 될 수 있다 [16, 17].

부모, 태아기 및 조기 출생 후의 태아가 섭취하는 지방을 포함하는 식이에 의한 영양 상태는 자손에서 지질의 대사적응을 촉진할 수 있다 [18, 19]. 인간에서 부모와 자손의 환경 노출에 의한 혼돈이 있기는 하지만 부모의 체중과 자손의 체중사이의 관계가 비유전적 메카니즘을 경유하여 일어날 수 있음이 확인되었다 [20]. 수컷 랫드가 암컷과 교미하기 전에 섭취한 식이는 또 한 세대의 후손에서 영양대사 및 번식과 관련한 건강에 영향을 미칠 수 있음이 보고되었다 [18, 21]. 본 연구는 부모가 교미 1개월 전부터 임신-분만-출생-이유 후 성장기까지 2세대에 걸쳐서 식이 내 오메가 6와 오메가 3 지방산의 비율을 서로 다르게 조절하였을 때 차세대 랫드의 성장 능력, 혈액 지질, 간 기능 관련 효소 수준에 관한 지질대사의 생화학적 메카니즘을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 실험동물 및 함설계

번식을 위하여 Sprague-Dawley 랫드 (암컷 315 ± 5 g, 수컷 230 ± 5 g) 각각 12마리씩을 충청북도 음성군에 소재한 (주)대한바이오텍으로부터 공급받았다. 교미하기 전까지 30일 동안 암수를 분리하여 실험 식이를 급여하였다. 실험식이 처리구는 대조구(오메가 6와 오메가 3 비율, 0), 오메가 6와 오메가 3 비율 1:1, 8:1, 19:1 그룹으로 구분하였다. 동일한 실험 식이를 급여한 암수끼리 일정 기간 동거를 실시하여 임신기간을 거치고 분만 직전에 수컷을 케이지로부터 분리하였다. 한 마리 당 출생한 자손을 8마리씩으로 조절하여 출생 후 22일째 이유를 실시하였다. 한 배 새끼 중 건강하게 잘 자란 자손 가운데서 수컷 6마리를 재배치 한 후 성장 8주령까지 사육하였다. 즉, 차세대 랫드 수컷 총 24마리를 4처리구 6반복으로 완전임의 배치하여 성장능력 및 생화학적 지질대사 메커니즘을 규명하였다. 동물실험을 포함한 모든 절차는 EEC Directive(86/609/EEC)에서 제시된 과학적이고 윤리적인 규정을 따랐으며 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어서 진행하였다 (KNU-1618).

2.2. 실험식이와 사양관리

실험동물 식이는 미국 영양연구소에서 제시한 랫드의 영양소요구량 [22]을 충족 또는 초과할 수 있도록 조절된 정제 펠릿식이를 이용하였다. 정제 펠릿식이는 제조 후 70°C 건조오븐에서 24시간 건조하여 수분 12%를 함유하였다. 정제 펠릿식이(%)는 카제인 20, 옥수수전분 39.8, 설탕 10, 말토덱스트린 13.2, 지방 7.0, α -셀룰로오스 5.0, AIN-93G 미네랄 혼합제 3.5, AIN-93G 비타민 혼합제 1.0, L-시스틴 3.0, 콜린비타트레이트 0.25, t-butylhydroquinone 0.0014를 함유하였다 [23]. 동물은 실온 $20\text{--}24^{\circ}\text{C}$, 상대습도 55-58%, 12시간 점등조절로 유지되는 사육실의 폴리에틸렌 케이지에 사육하였으며 물과 실험식을 무제한 급여하였다. 식이 내 오메가 6와 오메가 3 비율은 대조구의 경우 코코넛유 7.0%를 첨가하였으며, 오메가 6와 오메가 3 수준 처리구는 1:1 (아마씨유 3.50%+옥수수유 3.50%), 8:1 (아마씨유 0.46%+옥수수유 6.54%), 19:1 (대두유 1.68%+옥수수유 5.32%)로 각각 조절하였다. 지방 급원의 지방산 조성은 Table 1에 제시하였

으며 사료 지방산 조성은 Table 2와 같다.

2.3. 성장능력

식이 섭취량과 체중은 10일에 1회씩 측정하였다. 일정한 기간 중 식이 섭취량과 체중 증가량을 총 사육일 수로 나누어 일정한 기간 동안의 평균 식이 섭취량과 체중 증가량을 계산하였다. 식이효율은 일일 평균 체중 증가량에 대한 식이 섭취량의 비율(식이 섭취량/체중 증가량)로서 계산하였다.

2.4. 혈액 지질 프로파일과 AST, ALT의 생화학적 분석

혈액지질 프로파일 분석을 위하여 실험 종료 12시간 전에 식이를 철회하여 절식시켰다. 에틸 에테르로써 가볍게 마취시키고 복부를 절개하여 heparinized tubes (Franklin lakes, NJ07417, USA) 속으로 25 gage 주사기를 이용하여서 복대 동맥으로부터 3 mL의 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 즉시 3,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 혈장을 얻었다. 생화학적 분석을 위해 -196°C 의 액체질소 가스에 급속냉동 처리한 다음 분석 시까지 냉동 보관하였다. 혈액 내 triacylglyceride (TAG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) 및 phospholipid은 Diagnostic kit (Sigma chemical Co., St, Louis, MO, USA)를 이용하여 자동분석 장치 (Hitachi 917, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan)로써 측정하였다. 간 기능효소 Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT)는 혈액 생화학적 자동분석기 (Fuji Dri-Chem 3500, Tokyo, Japan)로써 측정하였다. 혈당은 Beckman glucose analyzer (Beckman instrument Co., Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

2.5. HMG-CoA reductase activity 측정

간으로부터 마이크로솜을 분리하였고 마이크로솜의 단백질과 HMG-CoA reductase activity를 측정하였다. 시약으로써 Triton X-100, NADPH (Sigma aldrich Inc., St. Louis, USA), HMG-CoA reductase (Pharmacia LKB Biotechnology, USA)를 사용하였다. 빛으로 인한 산화적 손실을 피하기 위하여 항산화제로서 아스코르빈산 150 ppm을 간 조직과 homogenizing

Table 1. The fatty acids composition of dietary lipid sources (% of total fatty acids)

Fatty acids	Coconut oil	Corn oil	Linseed oil	Soybean oil
Octanoic acid	8.46	-	-	-
Decanoic acid	7.06	-	-	-
Lauric acid	46.04	-	-	-
Myristic acid	18.53	-	-	-
Palmitic acid	9.18	12.56	5.22	11.76
Palmitoleic acid	-	-	-	0.12
Stearic acid	3.86	2.65	3.86	5.43
Oleic acid	5.85	34.00	21.88	24.08
Linoleic acid	1.03	49.08	16.96	51.19
Arachdic acid	-	0.69	-	-
Linolenic acid	-	0.40	52.08	6.80
Behenic acid	-	0.26	-	0.62
Lignoceric acid	-	0.36	-	-
Total	100	100	100	100
SFA	93.12	16.52	9.08	17.81
UFA	6.88	83.48	90.92	82.19
Omega 6 to omega 3	-	122.7	0.33	7.53
UFA/SFA	0.07	5.05	10.01	4.61

SFA: saturated fatty acids, UFA: unsaturated fatty acids.

Table 2. The fatty acids composition of diets (% of total fatty acids)

Fatty acids	Omega 6 to omega 3 ratio			
	Control	1:1	8:1	19:1
Octanoic acid	5.92	0.15	0.13	0.17
Decanoic acid	6.01	0.09	0.04	0.06
Lauric acid	42.56	0.63	0.17	0.28
Myristic acid	18.28	0.33	0.15	0.22
Palmitic acid	10.49	8.90	12.01	12.46
Palmitoleic acid	0.35	0.16	0.18	0.16
Stearic acid	4.31	3.62	3.02	3.46
Oleic acid	8.19	26.95	32.11	31.84
Linoleic acid	3.72	31.55	45.32	47.69
Arachdic acid	0.15	0.39	0.90	0.74
Linolenic acid	-	26.99	5.60	2.50
Behenic acid	-	0.08	0.24	0.35
Erucic acid	-	0.04	-	-
Lignoceric acid	-	0.12	0.12	0.07
Total	100	100	100	100
SFA	87.73	14.31	16.79	17.80
UFA	12.27	85.69	83.31	82.25
Omega 6 to omega 3 ratio	-	1.17	8.09	19.08
UFA/SFA	0.14	5.99	4.96	4.63

SFA: saturated fatty acids, UFA: unsaturated fatty acids.

buffer (w/v 1:2)의 혼합물에 첨가하여 균질화하였다. 균질물을 3,000 rpm에서 3회의 원심분리에 의해서 마이크로솜(펠렛 105,000)을 분리하였다. 마이크로솜 20 mg을 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) 2 mL에 용해한 다음 혼합된 buffer mixture 20 μ L를 정확히 취하여 5 mL 시험관에 가하였다. buffer mixture 20 μ L는 측정 결과 마이크로솜 단백질 50–300 μ g을 함유하였다. Triton X-100 (0.5%, v/v)를 이용하여 0°C에서 60분 간 배양 후 10 분 동안 3,000 rpm에서 원심분리 한 다음 얻어진 상층액을 생화학적 분석 시까지 -80°C에서 보관하였다. NADPH와 HMG-CoA reductase를 이용하여 제조된 각각의 반응용액을 순서대로 125 μ L씩 첨가하였다. HMG-CoA reductase 반응용액 125 μ L의 첨가와 동시에 37°C water bath에서 정확히 30 분 간 유지하였고 이때 시료 사이의 시간 차이는 5분으로 하였다. 340 nm에서 반응 직전의 흡광도를 측정하였고 30분 반응 후 감소율을 측정하였으며 사용된 기기는 double beam spectrophotometer (JASCO model UVIDE-610, Japan)이었다. NADPH의 내인성 산화율을 측정하여 이를 시료의 측정치로부터 뺀 값으로 보정해주었고, HMG-CoA reductase activity는 NADPH의 산화된 양으로서 나타냈다 [24].

Specific activity = pmoles NADPH oxidised/min/mg microsomal protein

2.6. 분 스테롤 측정

실험식이를 섭취한 동물로부터 배설되는 스테롤의 함량을 측정하기 위해 실험 종료 3일 전부터 종료 일까지 배설된 분을 채취하여 무게를 측정하였다. 분은 동결건조기(SFDSF12, Samwon Co. Ltd, Busan, Korea)를 이용하여 동결건조 후 분쇄하였다. 분 1 g과 증류수 5 mL를 혼합한 후 IKA's ultra turrex homogenizer를 이용하여 균질화 하였다. 균질물 0.5 g을 취하여 90% ethanolic sodium hydroxide 20 mL를 이용해서 1시간 동안 환류가열 하여 검화하였다. petroleum ether 50 mL와 증류수 10 mL를 이용해서 1시간 동안 격렬하게 혼합한 다음 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 후 상층액을 얻었다. 2회 반복으로 얻어진 상층액을 40°C 이하에서 질소가스의 주입과 함께 농축한 후 중성스테로이드 분획물을 얻었다. 아랫 층은 2 mL의 10 N NaOH를 이용

하여서 3시간 동안 15 PSI에서 더욱더 강력히 검화시킨 다음 염산을 이용하여 pH 2.0으로 조절하였다. 클로로포름과 메탄올 2:1 혼합용액 75 mL를 이용하여서 유리 담즙산을 추출하기 위해 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 아래층을 40°C 이하에서 질소가스의 주입과 함께 농축한 후 산성스테로이드 분획물을 얻었다. dimethylformamide과 pyridine에서 각각 제조된 중성스테롤과 산성스테롤의 TMS (Trimethylsilyl ether) 유도체 3 μ L를 Gas-liquid chromatography (Packard model 439, USA)에 주입하여서 스테로이드 함량을 측정하였다. 내부 표준물질로써 5 α -cholestane (Sigma-aldrich Inc., St. Louis, USA), nordesoxycholic acid (Toronto research chemicals Inc., Canada), 그리고 DBM capillary column (0.25 mm \times 30 m, J & W Scientific, Folsom, CA)을 이용하였다. carrier gas로써 helium을 분 당 30–60 mL로 조절하였다. column temperature 240°C, detector temperature 260°C, split ratio 10:1으로 조절하였다. 스테롤 농도는 내부 표준물질 면적에 대한 시료 피크 면적의 상대적인 비율로써 계산하였다 [25].

2.7. 지방산 분석

지방산 분석을 위한 메칠에스터의 제조과정을 간단히 기술하면 다음과 같다. 500 mL의 둥근 플라스크에 혈액 1 mL와 chloroform과 methanol을 혼합한 용액 (2:1, v/v) 50 mL, 0.88% KCl 용액 2 mL를 넣고 1분간 교반하였다. 원심분리 관에 교반액과 증류수 20 mL를 가하여 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 지질을 함유하는 클로로포름 층을 분리하여 질소가스를 주입하면서 농축하여 지질을 추출하였다. 지질을 검화용 반응용기에 취해서 methanolic 0.5 N NaOH 용액(2 g NaOH를 메탄올 100 mL에 용해하여 제조) 1 mL를 넣은 후 15분간 가열하고 차가운 물로 냉각하였다. 냉각시킨 후 1 mL의 BF₃-methanol을 넣어 다시 15분간 가열해서 메칠화하였다. NaCl 포화용액과 heptane 혼합 용액(8:1)을 가하여 1분간 혼합, 30분 동안 실온에 방치 후 상등액 1 μ L를 취해서 지방산을 분석하였다. 지방산 메칠에스터는 capillary gas liquid chromatography (Hewlett Packard 6890 gas chromatograph equipped with a 30 m \times 0.25 mm SP-2380 column, film

thickness, 20 μ m)에 의해서 분석하였다. carrier gas로써 helium의 유입속도를 분 당 1 mL로 조절하였다. injector와 detector temperature는 각각 230, 250°C로 실행하였다. column oven temperature는 155°C까지 분당 8°C, 180°C까지 분당 1.5°C, 이후부터는 분당 6°C로 승온하여 60°C에서부터 240°C까지 프로그램하였다. split 비율은 10:1로 운전하였다. 지방산의 표준시약은 PUFA No. 2 animal source (Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 이용하였다. 분리는 Hewlett Packard GC Chem Station software (HP GC, Wilmington, DE)를 이용하여 기록하였다 [26].

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 평균값에 대한 통계적인 유의차 ($p < 0.05$)를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

지방 급원에서 조사한 오메가 6와 오메가 3 비율은 코코넛유 0, 옥수수유 122.7, 아마씨유 0.33, 대두유 7.53으로 나타났으며 포화지방산은 각각 93.12, 16.52, 9.08, 17.81%, 불포화지방산은 각각 6.88, 83.48, 90.92, 82.19%로 구성되었음을 확인하였다 (Table 1). 실험사료의 오메가 6와 오메가 3 비율은 대조구 0, 1:1, 8:1, 19:1

로 나타났다 (Table 2). 오메가 6와 오메가 3 비율이 동일한 실험식을 동거 30일 전부터 부모에게 급여한 이후 동거, 임신, 분만 후 이유, 성장 8주령까지의 차세대 랫드에서 성장능력을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 체중 증가량 (g/day/rat)은 대조구 7.35와 비교할 때 오메가 6와 오메가 3의 비율 8:1 처리구가 7.46으로 높은 경향을 보였으나 각 처리구 사이의 차이가 없었다. 식이섭취량(g/day/rat)은 대조구 19.56과 비교할 때 오메가 6와 오메가 3의 처리구가 17.73-17.80 범위로 나타나서 1.76 낮아졌다 ($p < 0.05$). 식이효율(body weight gain/diet intake)은 대조구 0.38과 비교할 때 1:1, 8:1 그룹에서 각각 0.42로써 높게 나타났으나 ($p < 0.05$) 19:1과 대조구, 그리고 1:1, 8:1, 19:1 사이의 차이는 없었다. 본 결과에서 오메가 6와 오메가 3 비율 8:1 이하를 함유하는 식이의 섭취는 차세대 랫드에서 체중에 영향을 주지 않으면서 식이효율을 향상시킬 수 있었다. 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮은 식이의 섭취는 랫드의 식욕과 지질대사 개선을 통하여 체중증가를 꾀할 수 있음이 보고되었다 [14, 27]. 자돈에서 오메가 6와 오메가 3 비율이 9:1일 때 영양소 대사 및 면역상태를 개선하여 일일 평균 증체량을 높이는 것으로 알려졌다 [28].

차세대 랫드에서 조사된 기관무게 변화는 Table 4와 같다. 신장을 제외한 간, 비장, 흉선의 무게는 각 처리구 사이에 통계적인 유의차가 인정되었다 ($p < 0.05$). 간, 비장의 무게는 대조구 2.74와 비교할 때 1:1, 8:1 그룹에서 각각 3.12, 3.24로써 0.38, 0.50 높게 나타났으나 ($p < 0.05$) 대조구와 19:1 사이의 차이는 없었다. 흉선은 대조구 0.24와 비교할 때 1:1 그룹이 0.34로써

Table 3. Growth performance in rats fed experimental diets from weanling to adult

Item	Omega 6 to omega 3 ratio				PSE
	Control	1:1	8:1	19:1	
Body weight gain (g/day/rat)	7.35	7.39	7.46	7.12	0.140
Diet intake (g/day/rat)	19.56 ^a	17.73 ^b	17.80 ^b	17.77 ^b	0.387
Diet efficiency (Body weight gain/diet intake)	0.38^b	0.42 ^a	0.42 ^a	0.40 ^{ab}	0.015

PSE: p[ooled standard error of mean values (n=6). ^{a,b}Values within the same line with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Weight of liver, spleen, kidney and thymus in rats fed experimental diets from weanling to adult (wet g/100 g body weight)

Item	Omega 6 to omega 3 ratio				PSE
	Control	1:1	8:1	19:1	
Liver	2.74 ^b	3.12 ^a	3.24 ^a	2.80 ^b	0.059
Spleen	0.18 ^b	0.27 ^a	0.25 ^a	0.21 ^b	0.010
Kidney	0.63	0.67	0.67	0.66	0.015
Thymus	0.24 ^b	0.34 ^a	0.30 ^{ab}	0.27 ^{ab}	0.015

^{a,b}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=6, p<0.05).

Table 5. Blood lipid profiles, glucose and liver functional enzymes in rats fed experimental diets from weanling to adult (mg/100 mL)

Item	Omega 6 to omega 3 ratio				PSE
	Control	1:1	8:1	19:1	
Triglyceride	127.19 ^a	65.76 ^d	91.27 ^c	113.72 ^b	5.03
Total cholesterol	97.55 ^a	78.71 ^c	79.01 ^c	86.53 ^b	0.64
HDL-C	42.65 ^d	60.02 ^a	55.37 ^b	49.76 ^c	1.27
LDL-C	21.45 ^a	9.61 ^c	14.39 ^b	15.61 ^b	0.81
AST (U/L)	113.91 ^a	71.61 ^c	91.47 ^b	107.93^a	3.28
ALT (U/L)	39.32 ^a	22.20 ^c	31.43 ^b	37.00^a	1.24
Glucose	168.93 ^a	128.54 ^d	153.21 ^c	160.06 ^b	2.62
Phospholipid	62.17 ^c	112.15 ^a	108.07 ^{ab}	97.77 ^b	0.87

High density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), Low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT). ^{a,b,c,d}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=6, p<0.05).

0.10 높았으나 (p<0.05) 대조구, 8:1, 19:1 그룹 사이 그리고 오메가 6와 오메가 3 처리구 사이의 차이는 없었다. 이러한 결과는 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮은 식이의 섭취가 랫드의 간에서 영양소의 대사작용을 활성화 해줌으로써 세포기관의 발육을 자극하는 것으로 볼 수 있다 [14, 27]. 오메가 6와 오메가 3 비율 9:1 이하의 식이가 자돈에서 영양소의 대사를 향상시켜주고 면역세포의 발육을 통한 면역능력을 개선할 수 있음이 보고되었다 [28]. 식이를 통한 오메가3 지방산이 높은 식이 또는 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮은 식이의 섭취는 면역세포와 숙주 조직세포의 발육을 자극하여 줌으로써 염증을 예방하는 것

로 알려졌다 [10, 29].

혈액 지질 프로파일, 혈당과 간 기능관련 효소 AST, ALT의 변화는 Table 5와 같다. TAG는 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 각각 48.29, 28.24, 10.59% 감소하였으며 오메가 6와 오메가 3 처리구 사이의 차이가 있었다 (p<0.05). TC는 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 각각 19.31, 19.00, 11.30% 감소하였고 1:1, 8:1 그룹은 19:1에 비해서 낮았으나 이 둘 사이의 차이는 없었다 (p<0.05). LDL-C는 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 각각 55.20, 32.91, 27.23% 감소하였고 1:1은 8:1, 19:1에 비해서 낮았으나 8:1, 19:1 사이의 차이는 나타

나지 않았다 ($p < 0.05$). 그러나 이와 반대로 HDL-C는 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 증가하였으며 오메가 6와 오메가 3 처리구 사이의 통계적인 차이가 인정되었고 HDL-C는 1.41, 1.30, 1.16배 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 인지질은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 증가하였고 1.80, 1.74, 1.57배 각각 높아졌으나 1:1, 8:1 사이 및 8:1, 19:1 사이의 차이는 없었다 ($P < 0.05$). 간 기능을 나타내는 지표인 AST, ALT는 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 낮아졌으며 AST는 37.13, 19.70, 5.25%, ALT는 43.54, 20.06, 5.90% 각각 감소하였다 ($p < 0.05$). 한편, 오메가 6와 오메가 3 비율 19:1에서 AST, ALT 수준은 대조구와 비교할 때 각각 5.25, 5.90% 낮아지는 경향을 보였으나 이들 사이의 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 혈당은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 각각 23.73, 9.31, 5.25% 감소하였으며 오메가 6와 오메가 3 처리구 사이의 통계적인 차이가 인정되었다 ($p < 0.05$). 결과에서, 오메가 6와 오메가 3 비율 1:1, 8:1을 함유하는 식이를 섭취한 차세대 랫드에서 혈액 중 유해한 지질과 간 기능을 나타내는 효소의 수준이 낮아졌다. 대조구에 비해서 오메가 6와 오메가 3 처리구에서 혈액 중 유해한 지질이 감소한 이유는 HMG-CoA reductase 활

성 억제 및 스테로이드 배설촉진 (Table 6)과 관련한 지질의 생화학적 대사경로에 기인한 것으로 보인다. 랫드에서 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮은 식이의 섭취는 간으로부터 LDL의 분비를 낮추는데 기인하여 콜레스테롤을 떨어뜨리고 [30], 간에서 영양소의 대사작용을 자극하여줌으로써 AST, ALT 수준을 낮추는 것으로 볼 수 있다 [14, 31].

차세대 랫드 간에서 HMG-CoA reductase 활성, 스테롤 배설량은 Table 6과 같다. HMG-CoA reductase 활성은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 그룹에서 각각 36.45, 33.04, 17.36% 낮았으며 19:1을 제외한 1:1, 8:1 사이의 유의차가 인정되었다 ($p < 0.05$). 분을 통하여 배설되는 일일 중성스테롤의 총량, 총콜레스테롤은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1 순서로 유의하게 높았으며 코프로스타놀은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1에서 각각 1.21, 1.63, 1.24배 높아졌다 ($p < 0.05$). 중성스테롤의 배설량은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1에서 총 중성스테롤 2.66, 2.26, 1.79배, 총콜레스테롤 2.91, 2.37, 1.88배 각각 높게 나타났으며, 코프로스타놀은 8:1, 19:1에서 각각 1.63, 1.24배 높았다. 총산성스테롤, 총담즙산, lithocholic acid 배설량은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1에

Table 6. HMG-CoA reductase activity and excretions of fecal sterol in rats fed experimental diets from weanling to adult¹⁾

Item	Omega 6 to omega 3 ratio				PSE
	Control	1:1	8:1	19:1	
HMG-CoA reductase activity	248.8 ^a	158.1 ^c	166.6 ^c	205.6 ^b	9.651
Neutral sterol (NS)					
Total NS	23.01 ^d	61.13 ^a	52.11 ^b	41.10 ^c	4.4897
Total cholesterol	19.60 ^c	57.00 ^a	46.54 ^b	36.88 ^c	3.9878
Coprostanol	3.41 ^c	4.13 ^b	5.57 ^a	4.22 ^b	1.7550
Acid sterol (AS)					
Total AS	20.27 ^c	42.16 ^a	42.78 ^a	33.97 ^b	2.2985
Total bile acids	18.04 ^c	36.98 ^a	36.26 ^a	30.66 ^b	1.0452
Lithocholic acid	0.51 ^b	1.66 ^a	1.89 ^a	1.48 ^a	0.4201
Deoxycholic acid	0.22 ^b	0.80 ^a	0.77 ^a	0.24 ^b	0.1065
Cholic acid	1.50 ^c	2.72 ^b	3.86 ^a	1.59 ^c	0.3012
Total sterol	43.28 ^c	103.3 ^a	94.89 ^a	75.07 ^b	7.0925

¹⁾HMG-CoA reductase activity : pmole NADPH oxidized/mg microsomal protein/min., Fecal sterol extractions : mg/day/rat. ^{a,b,c,d}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=6, $p < 0.05$).

서 높았으며 1:1, 8:1 사이가 비슷하였으나 19:1은 1:1, 8:1에 비하여 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1, 19:1에서 총 산성 스테롤 2.08, 2.11, 1.68배, 총 담즙산 2.05, 2.01, 1.70배, lithocholic acid 3.26, 3.71, 2.90 배, deoxycholic acid 2.65, 2.50, 1.09배, cholic acid 1.81, 2.57, 1.06배로 각각 높게 나타났다. 이러한 중성스테롤과 산성스테롤의 배설은 총 스테롤의 배설량에 영향하였으며 총스테롤의 배설량은 대조구에 비해서 1:1 그룹 2.39, 8:1 그룹 2.19, 19:1 그룹 1.73배로 유의하게 높은 경향을 보여주었다 ($p < 0.05$). 결과의 중요한 발견은 오메가 6와 오메가 3 비율 1:1, 8:1을 함유하는 식이를 섭취한 차세대 랫드에서 간 콜레스테롤 합성 효소의 활성을 억제함과 동시에 분을 통한 스테롤의 배설을 촉진시킨다는 점이었다. 실험동물에서 오메가 3 지방산은 세포막 지방포화도의 변화로 인하여 HMG-CoA reductase 활성을 조절해 줌으로써 혈중 콜레스테롤의 증가를 낮출 수 있음이 보고되었다 [32, 33].

차세대 랫드에서 혈액 지방산조성의 변화는 Table 7과 같다. 혈액 중 오메가 6와 오메가 3 비율은 대조구는 전혀 측정되지 않았으나 1:1, 8:1, 19:1에서 각각 7.20, 15.11, 20.81로써 농도의존적으로 높게 나타났으며 각 처리군 사이의 차이가 있었다 ($p < 0.05$). 불포화지방산과 포화지방산의 비율은 대조구, 1:1, 8:1, 19:1에서 각각 0.91, 0.71, 0.56, 0.69로 나타나서 대조구가 높은 경향을 보였으나 대조구, 1:1, 19:1 사이는 서로 비슷하였고 8:1은 대조구에 비해서 낮았으나 오메가 6와 오메가 3 처리군 사이의 차이는 없었다 ($p < 0.05$). 결과에서 부모 세대로부터 오메가 6와 오메가 3이 낮은 식이를 장기간에 걸쳐서 섭취한 차세대 랫드에서 혈액 중 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮아졌다. 오메가 6와 오메가 3 비율이 1:1, 8:1을 함유하는 식이를 섭취한 차세대 랫드에서 대조구와 비교할 때 혈액 중 포화지방산이 낮고 불포화지방산이 높았음에도 불구하고 혈액 유해 지질 수준이 감소한 점은 바로 혈액 중 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮았기 때문

Table 7. Fatty acids composition of blood plasma in rats fed experimental diets from weanling to adult (% of total fatty acids)

Fatty acids	Omega 6 to omega 3 ratio				PSE
	Control	1:1	8:1	19:1	
Octanoic acid	0.13 ^b	0.03	0.02 ^b	1.70 ^a	0.255
Decanoic acid	0.36	0.17	0.03	0.22	0.046
Lauric acid	0.73	0.54	0.37	0.19	0.137
Myristic acid	5.36 ^a	0.81 ^b	0.97 ^b	3.45 ^{ab}	0.687
Palmitic acid	29.80 ^c	34.74 ^b	43.02 ^a	35.49 ^b	1.401
Palmitoleic acid	3.74	2.32	2.00	2.56	0.312
Stearic acid	14.13 ^b	16.52 ^{ab}	16.70 ^a	15.12 ^b	0.372
Oleic acid	17.87	18.96	19.01	15.44	0.884
Linoleic acid	7.19 ^c	17.08 ^a	12.96 ^b	17.04 ^a	1.087
arachdic acid	0.16 ^b	0.54 ^b	1.04 ^{ab}	2.78 ^a	0.369
Linolenic acid	-	2.57 ^a	1.10 ^b	0.83 ^b	0.265
Behenic acid	1.46 ^b	0.80 ^a	0.68 ^b	0.66 ^b	0.119
Erucic acid	19.07 ^a	0.55 ^b	0.49 ^b	3.98 ^b	2.154
Lignoceric acid	-	4.37 ^a	1.61 ^b	0.55 ^c	0.442
Total	100	100	100	100	-
SFA	52.56 ^b	58.53 ^{ab}	64.44 ^a	60.16 ^{ab}	1.668
UFA	47.44 ^a	41.47 ^{ab}	35.56 ^b	39.84 ^{ab}	1.668
Omega 6 to omega 3 ratio	-	7.20 ^c	15.11 ^b	20.81 ^a	0.787
UFA/SFA	0.91 ^a	0.71 ^{ab}	0.56 ^b	0.69 ^{ab}	0.050

SFA: saturated fatty acids, UFA: unsaturated fatty acids. ^{a,b,c}Values within the same line with different superscript are significantly different (n=6, $p < 0.05$). - : Not detected.

으로 볼 수 있다. 식이의 지방산 조성은 체내 구조 지질 및 저장된 지방산 조성을 바꾸는 것으로 알려졌다 [34]. 동물에서 세대를 거스르는 불포화 지방산이 풍부한 식이의 공급은 간에서 대사작용을 변화시켜서 포화지방산을 낮추고 불화지방산을 높이며 오메가 6와 오메가 3 비율이 낮은 식이는 혈 중 유리지방산과 중성지방을 낮추는 것으로 보고되었다 [19].

4. 결론

본 연구는 차세대 랫드에서 오메가 6와 오메가 3 비율이 서로 다른 식이(0, 1:1, 8:1, 19:1)의 섭취가 성장능력, 혈액 지질, 간 기능 관련 효소 수준에 관한 생화학적 지질대사의 메카니즘을 조사하였다. 식이섭취량 및 식이효율은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1 그룹이 높았다. 간, 비장은 대조구와 비교할 때 1:1, 8:1 그룹이 높았고 흉선은 1:1 그룹이 높았다. 혈액 중 유해 지질과 간 기능을 나타내는 효소의 수준은 1:1 그룹에서 가장 낮았다. 오메가 6와 오메가 3 비율 1:1, 8:1 그룹에서 HMG-CoA reductase의 활성을 억제함과 동시에 분을 통한 스테롤의 배설을 촉진시켰다. 혈액 중 오메가 6와 오메가 3 비율은 식이 내 오메가 6와 오메가 3 비율 증가와 관련하여 농도 의존적으로 높아졌다. 결론적으로, 부모 세대부터 차세대에 이르는 랫드에게 오메가 6와 오메가 3 비율이 1:1 또는 8:1을 함유하는 식이를 급여하면 혈액 유해 지질, 간 기능효소, 조직세포의 발육, HMG-CoA reductase 활성 및 분을 통한 스테롤의 배설과 관련한 지질대사의 생화학적 메카니즘을 경유하여 건강을 유지함과 동시에 성장능력을 개선할 수 있다는 점을 보여준다.

감사의 글

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

References

1. U. Gogus and C. Smith, Omega 3 fatty acids: a review of current knowledge, *Int. J. Food Sci. Tech*, 45, 417-436 (2010).
2. G. Michas, R. Micha and A. Zampelas, Dietary fats and cardiovascular disease: Putting together the pieces of a complicated puzzle, *Atherosclerosis*, 234, 320-328 (2014).
3. K. Bhardwaj, N. Verma, R. K. Trivedi, S. Bhardwaj and N. Shukla, Significance of ratio of omega-3 and omega-6 in human health with special reference to flaxseed oil, *Int. J. Biol. Chem*, 10, 1-6 (2016).
4. C. Gómez-Candela, L. M. Bermejo López and V. Loria-Kohen, Importance of a balanced omega-6/omega-3 ratio for the maintenance of health, *Nutritional recommendations*, *Nutr. Hosp*, 26, 323-329 (2011).
5. A. P. Simopoulos, Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects, *World Rev. Nutr. Diet*, 92, 1-22 (2003).
6. P. R. Burghardt, E. S. Kemmerer, B. J. Buck, A. J. C. Yan and S. J. Evans, Dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratios differently influence hormonal signature in a rodent model of metabolic syndrome relative to healthy controls, *Nutrition and Metabolism*, 7, 53-62, (2010).
7. P. Haggarty, Fatty acid supply to the human fetus, *Annu. Rev. Nutr*, 30, 237-255 (2010).
8. D. B. Jump, Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 14, 115-120 (2011).
9. A. P. Simopoulos, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, *Biomed. Pharmacother*, 56, 365-379 (2002).

10. V. Charlton-Menys and P. N. Durrington, Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules, *Exp. Physiol*, 93, 27-42 (2007).
11. A. P. Simopoulos, The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases, *Exp. Biol. Med*, 233, 674-688 (2008).
12. A. P. Simopoulos, An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity, *Nutrients*, 8, 128 (2016).
13. K. S. Husted and E. V. Bouzinova, The importance of omega-6/omega-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder, *Medicina*, 52, 139-147 (2016).
14. L. Yan, X. L. Bai, Z. F. Fang, L. Q. Che, S. Y. Xu and D. Wu, Effect of different dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in male rats, *Lipids in Health and Disease*, 12, 33-41 (2013).
15. A. B. K. Amira, A. B. Z. Zuki, Y. M. Goh, M. M. Noordin and M. Ebrahimi, Effects of varying levels of omega-6: omega-3 fatty acid ratio on plasma fatty acid composition and prostanoid synthesis in pregnant rats, *African J. Biotech*, 9, 8881-8888 (2010).
16. L. I. Yang, Z. X. Song, W. Cao, Y. Y. Wang, H. X. Lu, F. Guo, H. Yang, J. Chen, S. K. Wang and 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*, 45, 436-441 (2016a).
17. L. I. Yang, Z. X. Song, H. Yin, Y. Y. Wang, G. F. Shu, H. X. Lu, S. K. Wang and 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*, 51, 49-59 (2016b).
18. V. King, R. S. Dakin, L. Liu, P. W. F. Hadoke, B. R. Walker, J. R. Seckl, J. E. Norman and A. J. Drake, Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation, *Endocrinology*, 154, 2514-2524 (2013).
19. S. Halfen, C. B. Jacometo, P. Mattei, S. R. Fensterseifer, L. F. M. Pfeifer, F. A. B. D. Pino, M. A. Z. Santos, C. M. P. D. Pereira, E. Schmitt and M. N. Corrêa, Diets rich in polyunsaturated fatty acids with different omega-6/omega-3 ratio decrease liver content of saturated fatty acids across generations of Wistar rats, *Braz. Arch. Biol. Technol*, 59, 1678-4324 (2016).
20. B. Patro, A. Liber, B. Zalewski, L. Poston, H. Szajewska and B. Koletzko, Maternal and paternal body mass index and offspring obesity: A systematic review, *Ann. Nutr. Metab*, 63, 32-41 (2013).
21. T. J. G. Chambers, M. D. Morgan, A. H. Heger, R. M. Sharpe and A. J. Drake, High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent of origin specific manner, *Scientific Reports* 6, 31857-31868 (2016).
22. Reeves, G. Philip, H. Forrest, Nielsen, and C. George, Jr. Fahey, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J nutr* 123,11 1939-1951 (1993).
23. J. Bajerska, S. Mildner-Szkudlarz and E. Pruszyńska-Oszmalek, May rye bread enriched with green tea extract be useful in the prevention of obesity in rats?, *Acta Alimentaria* 42,1 69-78 (2013).
24. S. O. Park and B. S. Park, Lipid-lowering mechanism of egg yolk in normal rats, *Int. J. Food Sci. Tec*, 51, 2512-2519 (2016).
25. B. S. Park and A. Jang, Dietary b-cyclodextrin reduces the cholesterol levels in meats and backfat of finishing pigs, *J. Sci. Food Agric*, 88, 813-818 (2008).

26. S. O. Park, J. Heangbo, I. S. Yeo and B. S. Park, Gamma-linolenic acid egg production enriched with hemp seed oil and evening primrose oil in diet of laying hens, *J. Environ. Biol*, 35, 635-640 (2014).
27. M. Jia, N. Xue, Z. Cao and H. Liu, Effects of dietary different ratios of omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acids influence lipid metabolism and appetite of rats, *Wei Sheng Yan Jiu*, 38, 175-178 (2009).
28. W. Yao, J. Li, J. J. Wang, Z. Weiliang, Q. Wang, Z. Rongchang, W. Fenglai and P. Thacker, Effects of dietary ratio of omega-6 to omega-3 polyunsaturated fatty acids on immunoglobulins, cytokines, fatty acid composition, and performance of lactating sows and suckling piglets, *J. Ani. Sci. Biot*, 3, 43-51 (2012).
29. D. D. S. B. Betiati, P. F. D. Oliveira, C. D. Q. Camargo, E. A. Nunes and E. B. S. D. M. Trindade, Effects of omega-3 fatty acids on regulatory T cells in hematologic neoplasms, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 35, 119-125 (2013).
30. H. Wergedahl, O. A. Gudbrandsen, T. H. Rost and R. K. Berge, Combination of fish oil and fish protein hydrolysate reduces the plasma cholesterol level with a concurrent increase in hepatic cholesterol level in high-fat-fed Wistar rats, *Nutrition*, 25, 98-104 (2009).
31. O. V. Ketsa and M. M. Marchenko, The effect of diet ratio of polyunsaturated fatty acids of omega-3 and omega-6 families on activity of aminotransferases and gamma-glutamyltransferase in rat blood serum, *Vopr. Pitan*, 83, 27-32 (2014).
32. C. Vasandani, A. I. Kafrouni, A. Caronna, Y. Bashmakov, M. Gotthardt, J. D. Horton and D. K. Spady, Upregulation of hepatic LDL transport by omega 3 fatty acids in LDL receptor knockout mice, *J. Lipid Res*, 43, 772-784 (2002).
33. C. Martini, V. Pallottini, E. De Marinis, M. Marino, G. Cavallini, A. Donati, S. Stranierob and A. Trentalancia, Omega-3 as well as caloric restriction prevent the age-related modifications of cholesterol metabolism, *Mech. Ageing Dev*, 129, 722-727 (2008).
34. A. L. Mohamed, A. S. Hussein, S. J. Bhatena and Y. S. Hafez, The effect of dietary menhaden, olive, and coconut oil fed with three levels of vitamin E on plasma and liver lipids and plasma fatty acid composition in rats, *J. Nutr. Biochem*, 13, 435-441 (2002).