

## n-6/n-3 지방산 비율이 고지혈증 랫드의 지질대사 분할에 미치는 영향

이승형 · 엄경환 · 박병성<sup>†</sup>

강원대학교 동물생명과학대학  
(2018년 7월 15일 접수: 2018년 9월 11일 수정: 2018년 9월 18일 채택)

### Effect of n-6/n-3 fatty acid ratio on metabolic partitioning in hyperlipidemic rats

Seunghyung Lee · Kyung-Hwan Um · Byung-Sung Park<sup>†</sup>

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

(Received July 15, 2018; Revised September 11, 2018; Accepted September 18, 2018)

**요약** : 본 연구는 고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3가 서로 다른 식이를 급여하였을 때 혈액지질의 대사적 분할에 미치는 작용 메커니즘을 생체 모니터링 기법으로 구명하였다. 총 glycerolipids의 간에서 대사된 cholesteryl <sup>14</sup>C-oleate 비율은 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1, 대조군 순서로 낮았다 (p<0.05). 인지질 분비량은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 순서로 높았다 (p<0.05). 중성지방 분비량은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 순서로 특히, 4:1 처리군에서 낮았다(p<0.05). 총 glycerolipid에 대한 인지질의 분할 비율은 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1, 대조군 순서로 높았다(p<0.05). 간으로부터 중성지방 분할 비율(%)은 대조군 82.25%와 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1에서 각각 72.99, 75.93, 78.12%로써 n-6/n-3 비율이 증가할수록 높아졌다(p<0.05). 인지질 분할 비율(%)은 대조군 11.04%와 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1에서 각각 25.15, 18.87, 18.15%로써 n-6/n-3 비율이 증가할수록 낮아졌다(p<0.05).

**주제어** : 오메가 6/오메가 3, 랫드, 고지혈증, 경정맥, 캐놀라, 지질, 대사분할

**Abstract** : This study was investigated the mechanism of action of n-6/n-3 fatty acid ratio on the metabolic partitioning of blood glycerolipids by in vivo monitoring technique in hyperlipidemic animal model rats. The ratio of cholesteryl <sup>14</sup>C-oleate metabolized in the liver of total glycerolipids was lower in the order of n-6/n-3 ratios of 4:1, 15:1, 30:1 and control group (p<0.05). The secretion amount of phospholipid was higher in the order of n-6/n-3 ratio 4:1, 15:1, 30:1 than the control (p<0.05). The secretion amount of triglyceride was lower in especially

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: bspark@kangwon.ac.kr)

4:1, in order of n-6/n-3 4:1, 15:1 and 30:1 compared with the control. The ratio of phospholipid partitioning to total glycerolipid was high in order of n-6/n-3 ratio 4:1, 15:1, 30:1 and control ( $p < 0.05$ ). The triacylglycerol partitioning (%) via liver was higher 72.97, 75.93, 78.12% in n-6/n-3 4:1, 15:1, 30:1, respectively than the control of 82.25%, according to increased n-6/n-3 ( $p < 0.05$ ). The phospholipid partitioning (%) was lower 25.15, 18.87, 18.15% in n-6/n-3 4:1, 15:1, 30:1, respectively, compared to control 11.04%, according to increased n-6/n-3 ( $p < 0.05$ ).

*Keywords* : Omega 6 to omega 3, rats, hyperlipidemic, jugular vein, cannula, glycerolipid, metabolic partitioning

## 1. 서론

과학 및 의학기술의 발달과 지식기반이 확장되면서 건강을 위하여 식품 중에 함유된 이상적인 오메가 6와 3 지방산 비율(n-6/n-3) 4:1 이하로 유지에 관한 중요성이 새롭게 부각되었다[1, 2]. 필수지방산으로써 n-6/n-3 균형은 에이코사노이드 생성과 관련하여 중요하지만 식용유 산업이 발달하면서 n-6 지방산의 섭취가 증가하고 n-3 지방산이 감소하여 n-6/n-3가 크게 높아졌다[3, 4]. n-6/n-3의 과잉은 염증을 비롯한 대사증후군을 일으키는 원인이 되며[5], 고지혈증, 혈액응고, 종양, 고혈압, 알츠하이머치매, 자가면역질환 및 갱년기 여성의 혈관질환의 원인이 될 수 있다[6, 7]. 2016년 우리나라 사망률 1위인 암 다음으로 뇌혈관, 심장혈관질환이 차지하고 있으며 전 세계적으로 비만, 혈액지질과 관련한 대사성 질환 및 폐경기 여성에서의 고지혈증 등과 관련하여 지질대사 개선에 관한 연구가 진행되고 있다[8, 9]. 식품의 섭취와 에너지 소비 조절은 시상하부 내의 신경신호 전달에 의해 조절되며 이러한 신호 전달의 조절장애는 에너지 불균형, 고지혈증과 비만으로 이어지며[10, 11], n-6/n-3의 균형은 비만, 인슐린 저항성 및 지질대사 장애를 예방한다[12]. 고지방 식이를 섭취한 고지혈증 모델동물에서 식이 내 저 수준의 n-6/n-3는 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)를 낮추고 대사성질환을 예방하는데 도움이 될 수 있다[13, 14]. 대사성질환의 원인으로 n-6/n-3가 높은 식품의 섭취를 줄이는 것이 중요하며 건강을 위하여 섭취하는 식품 내 n-6/n-3의 이상적인 비율은 4:1 이하로 알려져

있고 WHO에 의하면 식품 중의 비율이 4:1 이면 natural food로서 명명할 수 있도록 권장하였다[15, 16]. 고지혈증과 관련하여 랫드의 간, 지방조직에서 지질대사의 유전자발현 연구가 보고되었지만 n-6/n-3의 지질대사 분할에 관한 연구는 진행되지 않았다[17, 18]. 차세대 랫드에서 n-6/n-3 비율이 8:1 이하로 낮아질수록 간에서 합성, 분비되는 중성지방과 인지질의 대사적 분할 능력을 조절하는 메커니즘에 의해 혈액지질이 낮아진다는 보고가 있다[19]. 본 연구는 고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3가 서로 다른 식이를 급여하였을 때 혈액지질의 대사적 분할에 미치는 작용 메커니즘을 구명하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험동물 및 함설계

동물실험을 포함한 모든 절차는 EEC Directive (86/609/EEC)에서 제시된 과학적이고 윤리적인 규정을 따랐으며 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻어서 진행하였다(승인번호 2018-0017). Sprague-Dawley 랫드 수컷 (평균 체중 230 g) 20마리를 대한바이오링크(주)로부터 구입하였다. 일반식이를 이용하여 1주일의 환경 적응 기간을 거친 후, 우지를 함유한 고지방 식이(high fat diet, D12451, 45 kcal% fat, USA)로써 30일간 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하면서 고지혈증을 유도하였다[17]. 고지혈증을 유도한 이후 평균 체중에 가깝게 체중에 따라서 4처리구 5반복으로 완전임의 배치하였다. 그 후 n-6/n-3 비율이 서로 다른 실험식이를 각각 60일 동안 급여하였다. 실험 처리군은대조군(n-6/n-3 비율이 없

음)과 3개의 처리군(n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1)으로 구분하였다.

## 2.2. 실험식이와 사양관리

실험식은 미국 영양연구소(American Institute of Nutrition, AIN)에서 제시한 랫드의 영양소요구량[19, 20]을 충족 또는 초과할 수 있도록 조절된 정제 펠릿식을 이용하였다(Table 1). 실험식을 제조한 후 펠릿 가공하였고 20°C 송풍건조기에서 수분 함량 12% 될 때까지 건조하였으며 저온실에서 보관하면서 실험동물에게 급여해 주었다. 실험식이 내 n-6/n-3 비율은 대조군(n-6/n-3 비율이 없음)의 경우 돼지기름(pork belly oil, 삼겹살을 불판에 직접 구워서 획득) 7.0%를 첨가하였으며, n-6/n-3 수준은 4:1(옥수수유 82%+들기름 18%), 15:1(옥수수유 96%+들기름 4%), 30:1(옥수수유 82%+대두유 18%)로 각각 조절하였다. 실험에 사용된 기름과 실험식의 지방산 조성은 Table 2, Table 3과 같다. 동물은 실온 20-24°C, 상대습도 55-58%, 12시간 점등조절로 유지되는 사육실의 폴리에틸렌 케이지에 사육하였으며 물과 실험식을 무제한 급여하였다.

Table 1. Composition of basal purified pellet diet

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

<sup>1)</sup>Fat was adjusted according to the n-6/n-3 ratio, <sup>2)</sup>#210025 AIN-93G mineral mix, <sup>3)</sup>#310025 AIN-93G vitamin mix.

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

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

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

Table 3. Fatty acids composition of experimental diet

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

### 2.3. 지질대사 분할의 생체 모니터링

사양실험이 종료된 후 경정맥 캐놀라를 부착한 후 지질대사 분할에 관한 생체 모니터링을 진행하였다[19, 21, 22, 23].

#### 2.3.1. 지질단백질 donor animal

지질단백질 donor animal로써 체중 600g의 Sprague-Dawley 계통 수컷 쥐를 (주)대한바이오링크로부터 구입하였다. 간에서 새롭게 합성된 초저밀도지질단백질-중성지방(Very low density lipoprotein-triacylglycerol, VLDL-TAG)의 분비를 가속화하기 위하여 혈액 채취 48시간 전에 10% fructose 용액을 음수로써 공급하였다. 48시간 후 donor를 희생하여 복대동맥으로부터 혈액 10 mL를 채취하여 plasma를 분리한 다음 지질단백질 동위원소 labelling에 사용하였다[19, 23].

#### 2.3.2. 생체 캐놀레이션

저자가 취득한 유럽 실험동물 취급면허(영국

특허장법인, SCT-W94058)에 의하여 생체 캐놀레이션을 실시하였다. 케타민(50 mg/mL)과 럼폰 혼합액(3:1)을 흰쥐 체중 100 g당 0.15 mL 복강 주사 하여 마취시키고 항생제 0.4 mL (amoxycillin 0.6 g을 citric saline 2 mL에 용해)를 복강주사 하였다. jugula vein을 노출시켜 소독된 cannula를 주입시키고 수술부위에 acramide를 뿌려주어 꿰맨 다음 카테타 주사기를 이용하여 cannula를 머리 쪽으로 이동시켜 완전히 꿰맨 다음, citric saline 0.3 mL를 이용하여 1일 3회 cannula flushing를 실시하여 주면서 혈액의 흐름을 확인하고 5일간의 회복기를 두었다[19, 21].

#### 2.3.3. 혈액으로부터 지질단백질 분리

donor로부터 얻어진 혈액의 초저밀도지질단백질의 잔유물(Very low density lipoprotein, VLDL remnants=IDL) 분해를 가속화하기 위하여 heparin을 첨가 후 반응시약과 함께 37°C에서 30분간 배양하였다. 3000 rpm에서 15분간 원심

분리한 plasma를 분리하고 다시 중간밀도지질단백질(Intermediate-density lipoproteins, IDL) 분리가 가능한 plasma의 밀도 ( $d=1.017 \text{ g/mL}$ )를 유지해 주기 위해서 NaCl/KBr ( $d=1.346 \text{ g/mL}$ ) 용액을 plasma와 동일한 양을 시험관 기벽을 통하여 서서히 주입한 다음, IDL 분리를 위하여  $12^\circ\text{C}$ 가 유지되는 Sorvall centrifuge에서 Sorvall TH 641 Rotor를 사용하여 30,000 rpm으로 20 시간 동안 진공고속원심분리 하였다[19, 23].

#### 2.3.4. 지질단백질의 동위원소 labelling

20시간 원심분리가 끝난 후 약 2 mL정도의 IDL 함유물질을 분리하여 Sephadex G25 column (10cm)을 통과시켜서 KBr을 제거한 다음 분획을 모아서 IDL을 분리하고 LPS (Lipopolysaccharide)를 조제하였다. 한 개의 Quick fit small tube에 [ $^3\text{H}$ ]-cholesteryl ether  $9 \mu\text{L}$ 와 cholesteryl- $^{14}\text{C}$ -oleate  $7.5 \mu\text{L}$ 를 취하여 질소가스 하에서 건조시키고, 다시 여기에 acetone 약 1 mL를 첨가한 다음 아주 서서히 혼합하였다. 사용할 [ $^3\text{H}$ ]와 [ $^{14}\text{C}$ ]의 동위원소는 영국의 Amershm Intemational (Amersham, Bucks., U.K.) 제품이고 labelling의 탄소 위치는 cholesteryl [ $1-^{14}\text{C}$ ] oleate이었다. 앞의 시험관에 CETP (Cholesterol ester transfer protein) 1.5 mL를 넣고 혼합한 후 질소가스를 이용하여 15분간 기포화 혼합하였다. 이렇게 하여 조제된 LPS 3.6 mL에 반응시약을 각각 첨가하고 이것을 다시 CETP-isotope 혼합물을 만든 후 15분간 질소가스하에서 기포화 혼합된 튜브에 넣었다.  $37^\circ\text{C}$ 로 유지되는 heating block (DB-3, technique, UK)에서 3시간 배양하여 지질단백질을 표식한 후 배양서 3시간 배양하여 지질단백질을 표식한 후 배양이 끝나면 재차 NaCl/KBr ( $b=1.346 \text{ g/mL}$ )용액을 시험관 상부기벽을 통하여 서서히 주입, 앞의 과정을 반복함으로써 IDL을 분리하고 IDL로부터 최종적으로 분리하여 조제된 LPS를 사용직전에  $0.45 \mu\text{m}$  filter pore size를 통과하여 여과시켰다[19, 23].

#### 2.3.5. 생체주입 및 호흡대사 시험

상기 제조하여 동위원소가 표식된 IDL을  $\beta$ -cuunter (Packard 1600 TR)에서 측정된 후 동물에게 주입할 양을 계산하여 주입량을 [ $^{14}\text{C}$ ] 300,000 dpm, [ $^3\text{H}$ ] 300,000 dpm으로 조절하였다. 경정맥캐놀라를 통하여 지질단백질을 주입한

다음 공기(air 5/min rate)가 공급되는 호흡대사 장치(desiccator chamber)에 넣고 [ $^{14}\text{C}$ ]- $\text{CO}_2$  (이하  $^{14}\text{CO}_2$ 로 표기함)를 알칼리 흡습제를 이용·수집하여 산화율을 계산하였다. 15분 후 triton WR 1339 용액 1.0 mL를 캐놀라를 통하여 주입하고 호흡대사장치에서 60분간 방치한 다음, 랫드 체중 kg 당 60 mg의 pentobarbitone을 이용하여 마취하였다[19, 23].

#### 2.3.6. 시료채취 및 TLC분석

상기의 방법으로 마취 후 적외선 등을 이용하여 랫드의 체온을 유지하면서 복강을 절개하여 펼친 다음 동맥으로부터 3 mL의 혈액을 신속하게 채취하였다. 간의 경우 왼쪽 간엽을 급속동결 시료채취법(cold clampling technique)에 의해서 취했으며 이때 스테인레스를 이용하여 삼각형 모양으로 제작된 clamp를 이용하였다. 간의 나머지 부분, 뒷다리 근육 및 지방조직은 액체질소가스에서 급속냉동 후 분석 시까지 보관하였다. 각 조직에서 지질을 추출하여 TLC (Thin-layer chromatography)에 의해 각 지질 분획을 분리하였다[19, 22].

#### 2.4. 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

#### 3.1. 혈액과 간 Glycerolipid 속으로 [ $^{14}\text{C}$ ] label의 합병율 및 $^{14}\text{CO}_2$ 발산율

고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 식이를 급여한 후 경정맥 캐놀라를 설치하여 조사한 혈액과 간의 총지질 분획에서 glycerolipid 속으로 [ $^{14}\text{C}$ ]표식 지질(이하 표식물로 표기함)의 합병율 및  $^{14}\text{CO}_2$  발산율은 Table 4와 같다.

Table 4.  $^{14}\text{CO}_2$  production and incorporation of [ $^3\text{H}$ ], [ $^{14}\text{C}$ ] label into liver and plasma at 60 min after injection of LPS(d<1.019) labelled with cholesteryl [ $^{14}\text{C}$ ]-oleate in obese rat fed diets containing different n-6/n-3 fatty acid ratio

Dietary n-6/n-3	Incorporation of [ $^3\text{H}$ ], [ $^{14}\text{C}$ ] label(% of injected dose)				$^{14}\text{CO}_2$ production
	Plasma		Liver		
	[ $^3\text{H}$ ]	[ $^{14}\text{C}$ ]	[ $^3\text{H}$ ]	[ $^{14}\text{C}$ ]	
0	1.10±0.01	23.70±5.19 <sup>a</sup>	95.36±9.01	40.01±7.25 <sup>a</sup>	9.78±2.78 <sup>d</sup>
4:1	1.10±0.01	17.20±4.55 <sup>c</sup>	94.75±10.07	28.87±3.98 <sup>d</sup>	25.25±5.77 <sup>a</sup>
15:1	1.12±0.01	17.88±3.98 <sup>c</sup>	95.60±11.22	31.86±4.02 <sup>c</sup>	24.74±6.01 <sup>b</sup>
30:1	1.11±0.01	20.63±4.78 <sup>b</sup>	94.52±9.78	37.07±5.67 <sup>b</sup>	13.58±4.55 <sup>c</sup>

PSE: pooled standard error of mean values. <sup>a,b,c</sup>Values within the same column with different superscript are significantly different (n=3, p<0.05).

[ $^3\text{H}$ ]표식물의 간에서 합병율은 [ $^{14}\text{C}$ ]표식물의 간과 혈액에서 합병율에 비하여 높게 나타났다. [ $^3\text{H}$ ]표식물의 간 내 합병율은 94.36-95.60%로서 높았으나 혈액 속으로 합병율은 1.10-1.12%로서 매우 낮았으며 [ $^3\text{H}$ ]표식물의 간과 혈액 속으로 합병율은 각 처리군 사이의 차이가 없었다. 간 지방산의 분할기전 연구에 있어서 [ $^3\text{H}$ ]와 [ $^{14}\text{C}$ ]를 동시에 사용하는 이유는 다음과 같다. [ $^3\text{H}$ ]-cholesteryl oleoyl ether를 사용하는 이유는 [ $^{14}\text{C}$ ] 표식물의 주입 시 일어나는 지질대사 즉 간에서 합성 분비되는 VLDL-TAG의 대사율을 보정해주기 위함으로써 이 경우 지질의 생체대사가 진행될 경우 [ $^3\text{H}$ ] 표식물의 간 합병율은 [ $^{14}\text{C}$ ]표식물의 간 합병율에 비하여 월등히 높은 결과를 나타낸다. 그러나 혈액 속으로 [ $^3\text{H}$ ] 합병율은 아주 낮거나 또는 거의 없다[19, 23, 24]. [ $^3\text{H}$ ]-cholesteryl oleoyl ether는 [ $^{14}\text{C}$ ]-cholesteryl oleate와 달리 간에서 위와 같은 대사경로를 거치지 않으며 90%이상이 그대로 간에 남게 되므로 이 두 가지 동위원소 지표물질을 이용하게 되면 보다 정확하게 간에서의 지방산 분할기전을 측정하는 것이 가능하다[19, 23, 24]. [ $^{14}\text{C}$ ]표식물의 간, 혈액으로 합병율은 n-6/n-3 비율 대조군, 30:1, 15:1, 4:1 순서로, 특히 간의 경우 4:1에서 가장 낮았으며, 간, 혈액에서 합병율 범위는 각각 28.87-40.01%, 17.20-23.70%로 나타나서 간 혈액의 합병율에 비해 높았다(p<0.05). 간에서 [ $^{14}\text{C}$ ]-cholesteryl oleate는 [ $^{14}\text{C}$ ] oleic acid와 cholesterol로 대사되며 결국 oleic acid는 산화와 에스터화 과정을 거치면서 새롭게 VLDL-TAG

의 합성에 이용되고 새로 합성된 VLDL은 30분 후 혈액으로 이동된다. 따라서 [ $^{14}\text{C}$ ]-cholesteryl oleate를 사용하면 간에서 새롭게 합병된 VLDL-TAG의 혈액 분비량을 측정하는 것이 가능하다[19, 23-25]. glycerolipid 대사에 의한  $^{14}\text{CO}_2$  발산율은 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 순서로 특히, 4:1에서 가장 높았고 0에서 가장 낮았으며 처리군 사이의 차이가 인정되었다(p<0.05).  $^{14}\text{CO}_2$  발산율 범위는 9.78-25.25%로 나타나서 n-6/n-3 비율 함유식을 섭취한 동물 특히 n-6/n-3 비율 4:1 처리군에서 glycerolipid 대사가 빠르게 진행되는 것으로 나타났다. 간 지방산의 대사에 관한 생체모니터링 연구에서  $^{14}\text{CO}_2$ 의 발산동력학은 약간씩의 차이를 보이는데 그 이유는 간에서  $^{14}\text{CO}_2$ 의 직접적인 생성 둘째, 상피조직에서 [ $^{14}\text{C}$ ] 케톤체의 산화를 들 수가 있다[19, 23]. 이론적으로는 [ $^{14}\text{C}$ ] 케톤체가 지방합성 조직 내 [ $^{14}\text{C}$ ]-TG속으로 합병될 수 있음을 추정할 수 있으나 그 양은 [ $^{14}\text{C}$ ]표식물을 주입 1시간 후 약 2% 미만의 아주 적은 양으로 보고되었기 때문에 생체모니터링 연구에서는 [ $^{14}\text{C}$ ] 케톤체 산화보다도  $^{14}\text{CO}_2$  발산량에 더욱 중요성을 두고 있다[19, 25]. 새롭게 주입된 [ $^{14}\text{C}$ ]표식물로부터 간과 혈액 속으로 glycerolipid 합병율은 대조군에서 가장 높았고 n-6/n-3 비율이 낮은 순서대로 특히, 4:1 처리군이 가장 낮았으나  $^{14}\text{CO}_2$  발산율은 그 반대로 나타났다. 결과는 고지혈증 모델동물 랫드의 식이 내 n-6/n-3 비율 4:1로 유지해주면 지방산 대사가 활성화되어 고지혈증 예방효과를 갖는다는 사실을 새롭게 확인하였다.

Table 5.  $^{14}\text{CO}_2$  production and tissue accumulation of  $^{14}\text{C}$  lipid in obese rat fed diets containing different n-6/n-3 fatty acid ratio

Dietary n-6/n-3	Absorption of $^{14}\text{C}$ lipid (%)	$^{14}\text{CO}_2$ production (% of absorbed dose)	Tissue $^{14}\text{C}$ lipid accumulation (% of absorbed dose/g of tissue)		
			Adipose tissue	Liver	Muscle (hind leg)
0	70.15±6.01 <sup>a</sup>	27.71±3.10 <sup>d</sup>	2.01±0.18 <sup>a</sup>	1.87±0.11 <sup>a</sup>	0.81±0.07 <sup>a</sup>
4:1	57.43±4.75 <sup>d</sup>	45.08±5.77 <sup>a</sup>	0.58±0.14 <sup>b</sup>	0.33±0.01 <sup>c</sup>	0.22±0.02 <sup>c</sup>
15:1	60.59±3.78 <sup>c</sup>	43.77±4.56 <sup>b</sup>	0.62±0.20 <sup>b</sup>	0.87±0.09 <sup>b</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>
30:1	68.72±5.77 <sup>b</sup>	30.35±3.07 <sup>c</sup>	1.89±0.18 <sup>a</sup>	0.92±0.10 <sup>b</sup>	0.75±0.10 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Values within the same line with different superscript are significantly different (n=3, p<0.05).

### 3.2. 조직 내 $^{14}\text{C}$ lipid의 축적율

고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 식이를 급여한 후 경정맥 캐놀라를 설치하여 조사한  $^{14}\text{CO}_2$  발산율, 조직 내  $^{14}\text{C}$ 표식 지질(이하 표식물)의 축적율은 Table 5와 같다.

$^{14}\text{C}$ 표식물의 흡수율과  $^{14}\text{CO}_2$  발산율은 모든 처리군에서 유의적인 차이를 나타냈다(p<0.05).  $^{14}\text{CO}_2$  발산율은 절식 후 식이를 급여한 이후 처음 1시간 동안에 직선적으로 증가했으며 정상식이 섭취군에서 유의적으로 낮아지며 이후 5시간 동안  $^{14}\text{C}$ 표식물의 흡수율은 무제한 급여구의 쥐에서 높아지는 것으로 보고되었다[26]. 따라서 이러한 차이를 보정해주고 보다 정확한 자료를 제시하기 위해서는  $^{14}\text{CO}_2$  발산율과 조직  $^{14}\text{C}$ 표식물의 축적율에 대한 자료를 Table 7과 같이 흡수된 양의 %로 표기하는 것이 바람직하다[19, 26].  $^{14}\text{C}$ 표식물의 지방조직, 간, 근육조직 내 축적율은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군에서 유의하게 낮았고 특히, 4:1 처리군이 가장 낮았다(p<0.05).  $^{14}\text{CO}_2$  발산율은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군이 높았으며 특히, 4:1 처리군에서 가장 높았다(p<0.05). 이는 대조군에서 생체 지질 축적율 증가에 의해서 이루어졌을 것으로 보이는데 산화(간, 근육, 갈색지방) 보다는 오히려 지방조직 내 지질 축적을 위한 새롭게 주입된  $^{14}\text{C}$ 표식물의 새로운 흐름을 나타내는 것으로 추정할 수 있다[22, 27]. 대조군의 지방조직에서  $^{14}\text{C}$ 표식물의 축적율이 n-6/n-3 비율 4:1,

15:1, 30:1 처리군에 비하여 각각 71.14, 69.15, 5.97% 높았던 점은 이를 잘 반영해 주고 있다. 근육은 산화를 위한 순환 중성지방의 중요한 제거 부위로 알려져 있는 바 [19, 23, 24] 본 연구에서는 뒷다리 골격근육 내  $^{14}\text{C}$ 표식물의 축적율이 가장 높았던 대조군이 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군에 비해서 각각 99.72, 41.98, 7.415 유의하게 높은 경향을 나타냈다(p<0.05). 따라서 동물에서 n-6/n-3 비율 4:1을 포함하는 식이의 섭취가 지질의 흡수를 억제함과 동시에 산화를 가속화하여 줌으로써 생체조직 내 지질 축적을 낮추는 것으로 판단된다.

### 3.3. Glycerolipid 대사의 분할

고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 식이를 급여한 후 경정맥 캐놀라를 설치하여 조사한 혈액과 간 에스테르화 생성물에서 회수된 간에서 대사된 cholesteryl ester의 비율은 Table 6과 같다.

제시된 값은 지질대사에 따른 서로 다른 측정값의 차이를 보정해 주기 위해서 [ $^3\text{H}$ ] 회수율 (Table 6)을 기준으로 한 대사된 양의 %농도로 나타낸 수치이다[19, 23]. 총 glycerolipids의 간에서 대사된 cholesteryl  $^{14}\text{C}$ -oleate 비율(%)은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군이 낮았으며 각 처리군 사이의 유의차가 있었다(p<0.05). 인지질 분비량은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 특히, 4:1 처리군이 높았으며 각 처리군 사이의 유의차

Table 6. Glycerolipid partitioning in liver of obese rat fed diets containing different n-6/n-3 fatty acid ratio

Dietary n-6/n-3	Total glycerolipids (% of cholesterol [ <sup>14</sup> C]-oleate metabolized in liver)	% Secreted		Phospholipid/ total glycerolipid (%)	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /[ <sup>14</sup> C] total glycerolipid (%)
		Phospholipid (% of total glycerolipid labelled)	TG (% of total triacylglycerol labelled)		
0	78.51 <sup>a</sup>	8.67 <sup>c</sup>	64.58 <sup>a</sup>	11.04 <sup>c</sup>	39.50 <sup>d</sup>
4:1	70.22 <sup>c</sup>	17.66 <sup>a</sup>	51.26 <sup>d</sup>	25.15 <sup>a</sup>	78.50 <sup>a</sup>
15:1	75.08 <sup>b</sup>	14.17 <sup>b</sup>	57.01 <sup>c</sup>	18.87 <sup>b</sup>	72.23 <sup>b</sup>
30:1	76.64 <sup>ab</sup>	13.91 <sup>b</sup>	59.87 <sup>b</sup>	18.15 <sup>b</sup>	44.16 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Values within the same line with different superscript are significantly different (n=3, p<0.05).

가 있었다(p<0.05). 중성지방 분비량은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 특히, 4:1 처리군이 낮았으며 각 처리군 사이의 유의차가 있었다(p<0.05). 총 glycerolipid에 대한 인지질의 분할 비율은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 특히, 4:1 처리군이 높았으며 각 처리군 사이의 유의차가 있었다(p<0.05). [<sup>14</sup>C] 총 glycerolipid에 대한 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 생성비율은 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 특히, 4:1 처리군이 높았으며 각 처리군 사이의 유의차가 있었다(p<0.05). 새롭게 주입된 [<sup>14</sup>C]표식물로부터 간에서 혈액 속으로 분비된 glycerolipid 분할율은 중성지방의 경우 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 처리군이 낮았으나 인지질 분비율과 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 생성율은 증가하였다. 결과는 고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3 비율 특히 4:1 을 포함하는 식이섭취가 지방산의 산화율을 가속화시켜준다는 점을 나타낸다. 본 연구에서 밝혀낸 새로운 사실은 고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3 비율 4:1을 함유하는 식이가 간에서 새롭게 합성된 glycerolipid 분할에서 중성지방 분비를 낮춤과 동시에 인지질 분비를 증가시키고 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 발산을 증가시켜서 혈액 중 유해한 지질을 낮추어 고지혈증 예방효과를 갖는다는 점이었다.

### 3.4. 간에서 지질분할의 정량화

고지혈증 모델동물 랫드에서 n-6/n-3 비율이 서로 다른 식이를 급여한 후 경정맥 캐놀라를 설

치하여 조사한 지질합성에 관한 각 대사적 분기점 내 기여도를 Fig. 1과 같이 정량화하였다.

생체모니터링에서 얻어진 분할자료로부터 평가한 것으로서 간으로부터 [<sup>14</sup>C] 중성지방으로써 분비된 표식 비율에서 대조군 82.25%와 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1에서 각각 72.99, 75.93, 78.12%로써 n-6/n-3 비율이 증가할수록 중성지방 분할이 높아졌다. 인지질 분할에서 대조군 11.04%와 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1에서 각각 25.15, 18.87, 18.15%로써 n-6/n-3 비율이 증가할수록 중성지방 분할이 낮아졌다. 특히, 간으로부터 새롭게 만들어진 중성지방 분비율 감소 및 인지질 증가는 대조군과 비교할 때 n-6/n-3 비율 4:1에서 가장 강하게 나타났음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 acyl-CoA, DG, 인지질 및 중성지방 분할로 이어지는 acyl moiety의 분할 방향에서 다중적인 감소효과에 의해서 나타난 것으로 볼 수 있다 [19, 23, 24]. 그러므로 산화하는 방향으로 acyl-CoA의 증가 및 분비에 기인한 중성지방의 세포 내 축적증가는 일반적으로 동일한 기여도를 만든다[23, 24]. glycerolipid 합성은 쥐의 간에서 지방산 대사의 주요한 루트이며 조직은 아주 적은 양이지만 새롭게 합성된 지방산을 활용하여 일부 glycerol의 에스테르화를 꾀한다[19, 25, 28, 29]. 지방산화를 위한 아실카르니틴 형성과 지방합성을 위한 에스테르화 사이의 간 지방산 분할은 지방산의 산화율을 결정하므로 산화와 에스테

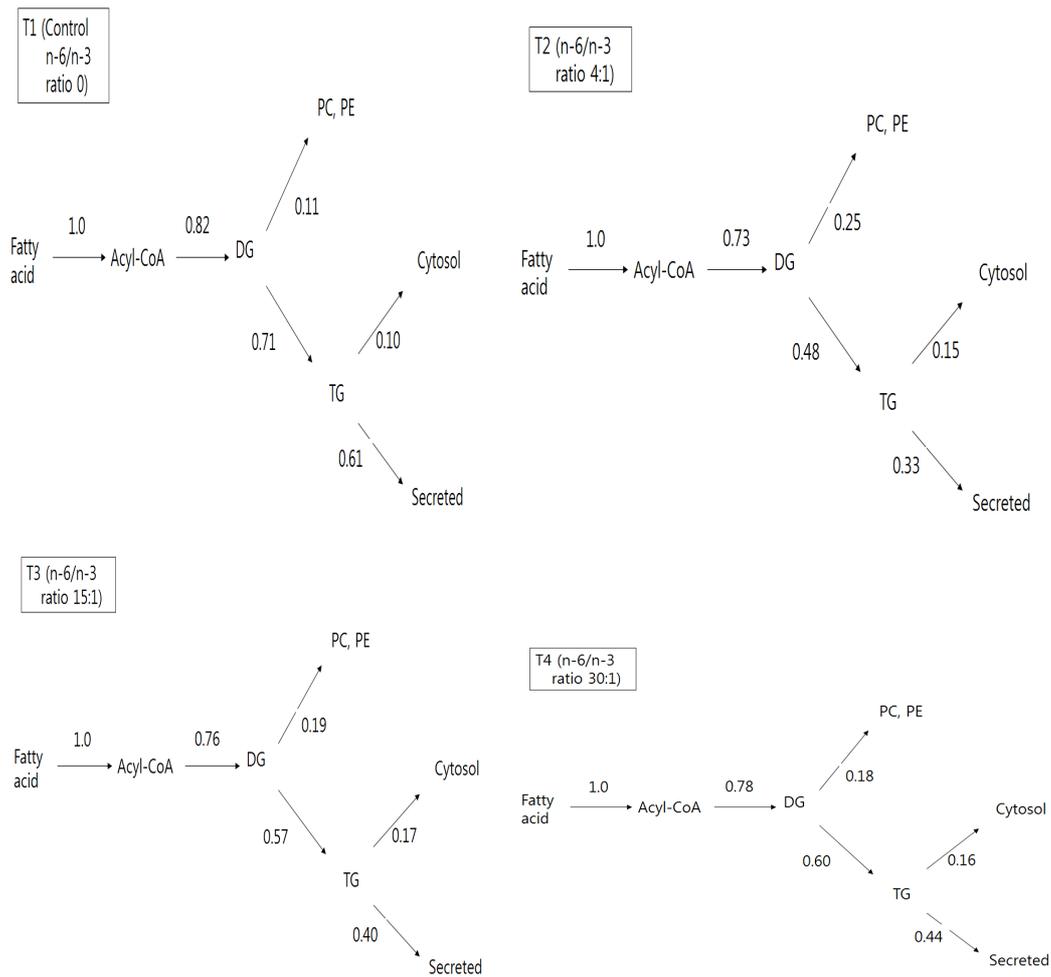


Fig. 1. Quantification of the partitioning of flux of acyl moieties at the major branch points for oxidation and glycerolipid synthesis in obese rat fed diets containing different n-6/n-3 fatty acid ratio (n=3). DG, diacylglycerol; TG, triacylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine.

르화 사이의 간 지방산 분할은 매우 중요하다 [23-25]. 식이를 섭취한 쥐에서 지방산의 대사는 중성지방(TAG, triacylglycerol)과 인지질(PL, phospholipid) 합성 쪽으로 진행되며 간에서 합성되어 혈액 속으로 분비된 중성지방을 함유하는 초저밀도지질단백질(VLDL, very low density lipoprotein)은 동물의 지방조직 내 지질단백질 분해효소(lipoprotein lipase)의 기질로써 사용된다 [19, 23-25]. 결과는 n-6/n-3 비율이 4:1로 낮아질수록 간에서 합성 분비되는 중성지방과 인지

질의 대사적 분할조절 메커니즘에 의해서 혈액지질을 낮추고 고지혈증 예방효과를 갖는다는 새로운 사실을 발견하였다.

#### 4. 결론

고지혈증 모델동물 랫드에서 총 glycerolipid에 대한 중성지방의 대사적 분할 비율은 n-6/n-3 비율 4:1, 15:1, 30:1 및 대조군 순서로 낮아졌

으나 인지질의 분할 비율은 높아졌다( $p < 0.05$ ). 간으로부터 새롭게 만들어진 중성지방 분비 감소율 및 인지질 분비의 증가율은 대조군과 비교할 때  $n-6/n-3$  비율이 낮아질수록 특히 4:1에서 가장 높았다( $p < 0.05$ ). 결론적으로 고지혈증 모델동물 랫드에서 오메가 6와 오메가 3 지방산 비율이 4:1로 낮아질수록 간에서 합성, 분비되는 중성지방과 인지질의 대사적 분할능력을 조절하는 메카니즘에 의해 혈액지질이 낮아지는 것으로 볼 수 있다.

### 감사의 글

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

### References

1. A. P. Simopoulos, “The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids”, *Biomed. Pharmacother.*, Vol.**56**, pp. 365-379, (2002).
2. A. P. Simopoulos, “An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity”, *Nutrients*, Vol.**8**, pp. 128-135, (2016).
3. G. Schmitz, J. Ecker, “The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids”, *Prog. Lipid Res.*, Vol.**47**, pp. 147-155, (2008).
4. C. Gómez-Candela, L. M. Bermejo López, V. Loria-Kohen, “Importance of a balanced omega-6/omega-3 ratio for the maintenance of health, Nutritional Recommendations”, *Nutr. Hosp.*, Vol.**26**, pp. 323-329, (2011).
5. K. S. Husted, E. V. Bouzinova, “The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder”, *Medicina*, Vol.**52**, pp. 139-147, (2016).
6. A. P. Simopoulos, “Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects”, *World Rev. Nutr. Diet*, Vol.**92**, pp. 1-22, (2003).
7. A. P. Simopoulos, “The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases”, *Exp. Biol. Med.*, Vol.**233**, pp. 674-688, (2008).
8. M. C. Rudolph, B. E. Young, D. J. Lemas, C. E. Palmer, T. L. Hernandez, L. A. Barbour, J. E. Friedman, N. F. Krebs, P. S. MacLean, “Early infant adipose deposition is positively associated with the n-6 to n-3 fatty acid ratio in human milk independent of maternal BMI”, *Int. J. Obes.*, Vol.**41**, pp. 510-517, (2017).
9. B. M. Spiegelman, J. S. Flier, “Obesity and the regulation of energy balance”, *Cell*, Vol.**104**, pp. 531-543, (2001).
10. J. M. Friedman, “Modern science versus the stigma of obesity”, *Nat. Med.*, Vol.**10**, pp. 563-569, (2004).
11. S. M. Sternson, B. J. Nicholas, Z. F. Cao, “Neural circuits and motivational processes for hunger”, *Curr. Opin. Neurobiol.*, Vol.**23**, pp. 353-360, (2013).
12. H. Q. Liu, Y. Qiu, Y. Mu, X. J. Zhang, L. Liu, X. H. Hou, L. Zhang, X. N. Xu, A. L. Ji, R. Cao, R. H. Yang, F. Wang, “A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats”, *Nutr. Res.*, Vol.**33**, pp. 849-858, (2013).
13. L. I. Yang, Z. X. Song, W. Cao, Y. Y. Wang, H. X. Lu, F. Guo, H. Yang, J. Chen, S. K. Wang, G. J. Sun, “Effects of diets with different omega-6/omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in mice fed high-fat diets”, *Wei Sheng Yan Jiu*, Vol.**45**, pp. 436-441, (2016).
14. L. I. Yang, Z. X. Song, H. Yin, Y. Y. Wang, G. F. Shu, H. X. Lu, S. K. Wang, G. J. Sun, “Low omega-6/omega-3 PUFA ratio improves lipid metabolism, inflammation, oxidative stress and endothelial function in rats using plant oils

- as omega 3 fatty acid source”, *Lipids*, Vol.**51**, pp. 49-59, (2016).
15. A. M. El-Badry, R. Graf, P. A. Clavien, “Omega 3-Omega 6: What is right for the liver?”, *J. Hepatol*, Vol.**47**, pp. 718-725, (2007).
  16. K. Bhardwaj, N. Verma, R. K. Trivedi, S. Bhardwaj, N. Shukla, “Significance of ratio of omega-3 and omega-6 in human health with special reference to flaxseed oil”, *Int. J. Biol. Chem*, Vol.**10**, pp. 1-6, (2016).
  17. B. S. Park, “Effect of n-6/n-3 fatty acid ratio on lipid metabolism in obesity rats”, *J. Oil & Appl. Sci*, In press, (2018).
  18. J. Hwangbo, S. O. Park, B. S. Park, “Lipid lowering mechanism of sulfur-fed grain larvae extract in high-fat induced obesity rats”, *J. Oil & Appl. Sci*, Vol.**31**, pp. 572-583, (2014).
  19. B. S. Park, “Effect of n-6/n-3 fatty acid ratio on hepatic glycerolipid partitioning in second generation rats”, *J. Oil & Appl. Sci*, Vol.**34**, pp. 839-850, (2017).
  20. P. G. Reeves, F. H. Nielsen, Jr, G. C. 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*, Vol.**123**, 1939-1951, (1993).
  21. B. S. Park, “Method of biological monitoring related to lipid metabolism”, *Korean Patent*, No.10-1633979, (2016).
  22. B. S. Park, Y. C. Lee, “Studies on the partitioning of glycerolipid metabolism in pregnant and lactating rats”, *Kor. J. Anim. Sci*, Vol.**39**, pp. 705-714, (1995).
  23. A. M. B. Moir, V. A. Zammit, “Monitoring of changes in hepatic fatty acid and glycerolipid metabolism during the starved-to-fed transition in vivo, studies on awake, unrestrained rats”, *Biochem. J*, Vol.**289**, pp. 49-55, (1993).
  24. V. A. Zammit, A. M. Moir, “Monitoring the partitioning of hepatic fatty acids in vivo: keeping track of control”, *Trends Biochem. Sci*, Vol.**19**, pp. 313-317, (1994).
  25. V. A. Zammit, D. J. Lankester, A. M. Brown, B.S. Park, “Insulin stimulates triacylglycerol secretion by perfused livers from fed rats but inhibits it in livers from fasted or insulin-deficient rats implications for the relationship between hyperinsulinaemia and hypertriglyceridaemia”, *Eur. J. Biochem*, Vol.**263**, pp. 859-864, (1999).
  26. M. L. Cruz, D. H. Williamson, “Refeeding meal-fed rats increases lipoprotein lipase activity and deposition of dietary<sup>[14C]</sup> lipid in white adipose and decreases oxidation to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>”, *Biochem. J*, Vol.**285**, pp. 773-778, (1992).
  27. A.M. Moir, B.S. Park, V.A. Zammit, “Quantification in vivo of the effects of different types of dietary fat on the loci of control involved in hepatic triacylglycerol secretion”, *Biochem. J*, Vol.**308**, pp. 537-542, (1995).
  28. L. Hodson, K. N. Frayn, “Hepatic fatty acid partitioning”, *Curr. Opin. Lipidol*, Vol.**22**, pp. 216-224, (2011).
  29. M. L. Cruz, D. H. Williamson, “Refeeding meal-fed rats increases lipoprotein lipase activity and deposition of dietary<sup>[14C]</sup> lipid in white adipose and decreases oxidation to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>”, *Biochem. J*, Vol.**285**, pp. 773-778, (1992).