

흰쥐에서 고지방식이가 혈중 렙틴 및 인슐린과 갈색지방조직의 UCP 1 발현에 미치는 영향*

홍경희 · 강순아[§] · 김소혜 · 조여원

경희대학교 동서의학대학원 임상영양전공

Effects of High Fat Diet on Serum Leptin and Insulin Level and Brown Adipose Tissue UCP 1 Expression in Rats*

Hong, Kyunghye · Kang, Soon Ah[§] · Kim, Sohye · Choue, Ryo Won

Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

The adipose tissue hormone leptin has been proposed to be involved in the regulation of food intake and energy expenditure via thermogenesis by uncoupling protein(UCP) in brown adipose tissue(BAT). The objective of the study was to examine the effects of high fat diet on the serum leptin levels, BAT UCP1 expression and the body fat mass in rats after weaning. During experimental period of 12 weeks, 4 male Sprague-Dawley rats were killed for the baseline experiment at 4 weeks of age while the remaining rats were fed the two different diets: the control diet AIN-76A(n = 20), high fat(beef tallow) diet(n = 20) ad libitum, which provided 11.7% or 40% of calories as fat, respectively. At 16 weeks of age, the increase in the food efficiency ratio(FER) was related to fat mass in rats on high fat diet. Serum leptin level was increased by age and dietary high fat. There was no difference in serum insulin level between groups until 10 weeks of age, but rats fed high fat diet for 12 weeks showed hyperinsulinemia. The amount of body fat pads was increased significantly in high fat group compared to normal diet group. Visceral fat mass affected acutely by high fat diet, as a result, it was higher in rats fed high fat diet for 2 weeks than normal diet. At 16 weeks of age, BAT and visceral fat mass were significantly high in high fat group. Also, the serum leptin levels reflected the amount of body fat mass. BAT UCP1 mRNA expression increased with age and dietary high fat. This study demonstrates that dietary high fat increased serum leptin levels, BAT UCP1 expression and body fat mass. Furthermore, in rats fed high fat diets, the increases in leptin and UCP1 expression counteracts only in part the excess adiposity and obesity. (*Korean J Nutrition* 34(8) : 865~871, 2001)

KEY WORDS: dietary high fat, fat mass, leptin, insulin, UCP1.

서론

우리 나라에서 단순당, 육류, 지방 등의 섭취 증가로 인해 각종 성인병의 유병율이 증가하고 있으며, 이러한 질병들은 역학적 연구들을 종합하여 볼 때 비만과 관련이 높은 것으로 나타났다. 최근 그 심각성이 대두되고 있는 성인병의 예방 및 치료를 위하여 비만의 원인을 규명하고 효과적으로 관리해야 할 필요가 있다. 비만의 유해성에 대한 광범위한 연구에도 불구하고 비만의 원인은 아직 명확하지 않으며,

유전적, 대사적 및 사회적 요인이 비만의 발생과 진행에 중요할 것으로 알려져 있다.

사람에게서 비만은 유전적인 인자와 환경적인 인자의 복합적인 영향에 의하여 발생된다고 알려져 있으나 주된 발생 기전은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로, 에너지 소비 효율이 나쁘면 지방 축적에 의해 비만이 발생하게 되며, 이러한 체중 변화의 33%는 유전적인 소인에 의해 설명될 수 있다. 최근 비만의 유전적인 소인을 분자생물학적인 방법으로 규명하고자 하는 연구가 진행되어, 설치류에서 비만의 원인이 되는 leptin, leptin receptor 및 carboxypeptidase E 유전자의 변이가 발견되었고, 이러한 유전자의 상동체가 사람에게서 발견되었다. Leptin은 *ob* gene에서 생성되는 식욕과 에너지 소비율을 조절하는 호르몬으로 ^{1,2)} 백색지방조직(white adipose tissue)에서 분비되며 뇌의 시상하부(hy-

접수일 : 2001년 9월 14일

채택일 : 2001년 10월 20일

*This research was supported by a grant HMP-00-B-22000-0156 from Korean Ministry of Health and Welfare.

[§]To whom correspondence should be addressed.

pothalamus)의 neuropeptide Y의 발현을 조절함으로써 식욕과 포만 중추를 조절하여 체내 지방 축적과 체중 증가를 억제하는 기능을 한다.³⁾ Leptin은 섭취량을 줄일 뿐 아니라 mice에서 발열반응(thermogenesis)을 증가시켜 에너지 소비율을 증가시킨다고 보고되었다.⁴⁾

지방 조직에서 발열반응을 통해 에너지의 소비에 관여하는 조직은 갈색 지방 조직(brown adipose tissue, BAT)으로, 갈색지방조직 미토콘드리아의 내막에 존재하는 uncoupling protein(UCP)이 adaptive thermogenesis에 관여한다. UCP는 세포막에서 산화적 인산화 과정에 의해 발생된 proton을 미토콘드리아에서 ATP를 합성하는데 사용되지 못하게 하고 열을 생산하는데 이용되도록 하여, 에너지를 열로 쓰이게 함으로써 발열반응을 일으킴과 동시에 에너지 소비율을 증가시키는 역할을 하는데, 여러 UCP isoform들 가운데 UCP1이 갈색지방조직에서의 이러한 proton leak에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾

그러나 아직까지 식이에 의한 유전자 발현의 차이는 명확히 규명되어 있지 않으며, 고지방 식이가 leptin과 UCP의 발현을 증가시켜 에너지 소비율을 증가시키고 체중 조절에 관여한다는 보고들이 있으나,⁷⁻⁹⁾ 성장기의 식이, 특히 성장기 이후에, 비만의 원인이 되는 과잉 지방 섭취가 체내 지방 및 에너지 대사에 미치는 영향은 많이 연구되어 있지 못한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이유기 이후 성장기 전반에 걸친 고지방 식이가 체지방 형성과 혈중 leptin 농도 및 갈색지방조직 UCP 1 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 3주령 Sprague-Dawley 종 숫컷 흰쥐를 중앙실험동물사에서 구입하여 정상식이군과 고지방식이군 두 군으로 나누었다. 실험식이를 공급하기 전 4주령의 쥐 4마리를 희생하여 기준선(baseline)으로 하였다. 실험 식이는 Table 1에 제시된 바와 같이 정상 식이군은 AIN-76A diet #100000(Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)로 식이 총 열량의 11.7%를 지방으로 공급하였고, 고지방 식이군은 지방 급원으로 beef tallow를 사용하여 AIN-76 high fat diet #100496(Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)으로 총 열량의 40%를 지방으로 공급하여 사육하였다.

이유기가 끝난 시기인 실험 동물 4주령 부터 실험식이를 공급하였고 12주간 사육하면서 성장기와 성장기 이후의 기간별 변화 양상을 관찰하기 위하여 실험식이 공급 2주 후인 6주령, 4주 후인, 8주령, 6주 후인 10주령, 12주 후인 16주

Table 1. Composition of experimental diets(g/kg diet)

Ingredients	Normal diet ¹⁾	High fat diet ²⁾
Casein	200	200
DL-Methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	500	345
Cellulose	50	50
Corn oil	50	-
Beef tallow	-	205
Salt mixture	35	35
Vitamin mixture	10	10
Choline bitartrate	2	2
Fat %(calories)	11.7	40.0

1) Normal diet: AIN-76A diet #100000(Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)

2) High fat diet: AIN-76 diet #100496(Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)

령에 각각 사육기간에 따른 정상 식이군과 고지방 식이군 간의 차이를 관찰하였다.

실험동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 물과 식이는 제한없이 공급하였다. 실험 기간 동안 식이 섭취량과 체중은 일주일에 2회 측정하였다. 식이 효율(Food Efficiency Ratio: FER)은 실험 식이 공급일로부터 희생일 까지를 총 실험기간으로 하여 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

2. 시료수집 및 분석방법

1) 시료수집

4주령, 6주령, 8주령, 10주령, 16주령이 된 시기에 각 실험군에서 4마리(4, 6, 8주령), 또는 6마리(10, 16주령)씩 무작위 추출하여 희생하여 혈액과 장기를 채취하였다. 갈색 지방 조직(interscapular brown adipose tissue), 내장 지방(visceral fat)을 분리하여 중량을 측정하였고, 추출 즉시 액체 질소로 동결하였다. 혈액은 희생시 heart puncture 방법으로 채취한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 이들 시료는 분석 시까지 -70℃에서 보관하였다.

2) 혈중 Leptin 및 insulin 함량 분석

혈청 중 leptin 함량은 Linco leptin assay Kit(Linco research Immunoassay, St. Charles, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였고, insulin 함량은 rat insulin standards(Linco, St. Louis, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였다.

3) Uncoupling protein1 m-RNA 분석

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction을 이용하여 Uncoupling protein 1(UCP 1)의 발현량을

측정하였다. 단백질량을 측정하기 위해서 단백질의 전구체인 RNA의 양을 측정하였고, adaptive thermogenesis의 주요 담당 조직인 갈색지방조직에서 UCP1 m-RNA를 측정하였다.¹⁰⁾

실험동물에서 분리한 갈색지방조직으로부터 trizol reagent(Gibco 15596-026)를 이용하여 RNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. 분리된 총 RNA로부터의 cDNA 합성을 위하여 2µg의 RNA를 70℃에서 5분간 열처리한 후 4℃에서 5분동안 방치하고 여기에 M-MLV(Promega M1705) 200U, dNTP(each 2.5mM) mix 2µl, RNasin(Promega N2111) 40 units, oligo(dT) primer(Promega C1101) 1µl를 혼합한 후 DEPC-water로 25µl를 맞추어 42℃ 1시간, 75℃ 30분 조건하에서 cDNA를 합성하였다.

합성된 cDNA로부터 UCP1의 발현량을 측정하기 위하여 primer를 제작하였고 house keeping gene으로는 β-actin을 이용하였다. 실험에 사용한 primer는 UCP1 sense 5'-TAC CCA CAT CAG GCA ACA G-3', antisense 5'-TCA TTG CAC AGC TGG GTA C-3'이며, product size는 842bp 였다. 유전자 발현량을 측정하기 위한 PCR 조건은 다음과 같다. Tag polymerase(TaKaRa Taq R001A) 0.125µl, 10×PCR buffer 2.5µl, dNTP mix 2µl, Primer, sample, 증류수로 25µl를 맞춘 후 94℃ 3분, 94℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 1분 30초, 30회 반복한 후 94℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 10분, 1회 PCR을 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose에서 100V 하에서 전기 영동하여 분리한 후 10µg/ml의 EtBr에서 30분동안 염색하고 증류수에서 15분동안 탈색하여 transilluminator에서 관찰하였다.

3. 자료의 처리

정상 식이군과 고지방 식이군간의 평균간의 유의성을

Student's t-test로 검정하였고, 주령에 따른 변화를 one-way ANOVA에 의하여 검정하고 α = 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 또한, 식이 지방 수준과 주령에 의한 영향의 요인분석을 two-way ANOVA에 의하여 실시하였다. 유의성은 α = 0.05, α = 0.01 수준에서 검정하였고, 모든 통계 분석은 SAS program을 이용하여 처리하였다. 결과는 평균(mean) 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 섭취, 체중 증가량 및 식이효율

실험동물의 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율의 결과는 Table 2와 같다. 식이 섭취량은 정상 식이군과 고지방 식이군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 체중 증가량은 지방 섭취 수준의 영향을 받아 실험 식이 공급 후 2주와 12주 후에 고지방 식이군이 정상 식이군에 비하여 유의적으로 높았다(p < 0.05). 식이 효율 또한, 식이 지방 수준의 영향을 받아 실험 식이를 12주간 공급한 16주령에서 고지방 식이군이 정상식이군보다 유의적으로 높았다(p < 0.01).

본 실험 결과 식이 섭취량에는 차이가 없었음에도 주령이 증가함에 따라 고지방식으로 사육한 실험동물이 체중 증가량과 식이 효율이 높아지는 것은, 성장기 동안 식사에서의 높은 지방 섭취율은 체중 증가를 가져오며 이는 기간이 지남에 따라 그 영향이 커질 수 있음을 보여준다고 하겠다.

2. 지방 조직의 무게

식이 지방 수준과 주령에 따른 갈색 지방조직 무게를 비교한 결과는 Fig. 1에, 내장 지방 무게를 비교한 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, 각 지방 조직 모두 단위 체중에 대한 조직 무게로 환산하여 표시하였다.

Table 2. Food intake, weight gain and food efficiency ratio(FER) of experimental animals

Diet	Age	Food intake(g/day)		Weight gain(g/day)		FER	
		Normal	High fat	Normal	High fat	Normal	High fat
6 weeks		13.27 ± 1.72 ^b	13.27 ± 1.72 ^b	5.86 ± 0.56 ^a	6.85 ± 0.58 ^{†a}	0.44 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.03 ^a
8 weeks		21.71 ± 1.92 ^a	21.10 ± 1.52 ^a	6.52 ± 0.82 ^a	7.63 ± 0.82 ^a	0.34 ± 0.03 ^b	0.40 ± 0.03 ^b
10 weeks		22.78 ± 2.46 ^a	22.14 ± 2.09 ^a	4.50 ± 0.65 ^a	7.18 ± 1.21 ^a	0.31 ± 0.01 ^c	0.35 ± 0.03 ^c
16 weeks		20.73 ± 2.30 ^a	22.11 ± 2.66 ^a	3.84 ± 0.60 ^b	4.90 ± 0.54 ^{†b}	0.19 ± 0.02 ^d	0.22 ± 0.01 ^{†d}
Pr > F ¹⁾ (1-way ANOVA)		0.0001	0.0001	0.0001	0.0004	0.0001	0.0001
SF ²⁾ (2-way ANOVA)		B**		A** B**		A** B**	

Values are Mean ± S.D.

† : Normal versus high fat by Student's t-test

† : p < 0.05 ‡ : p < 0.01

1) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p < 0.05 by Duncan's Multiple Range Test.

2) Statistical analysis was performed using two-way ANOVA.

SF: Significant Factor

A: Effect of dietary fat level was significant by F-test

B: Effect of age was significant by F-test

** : p < 0.01

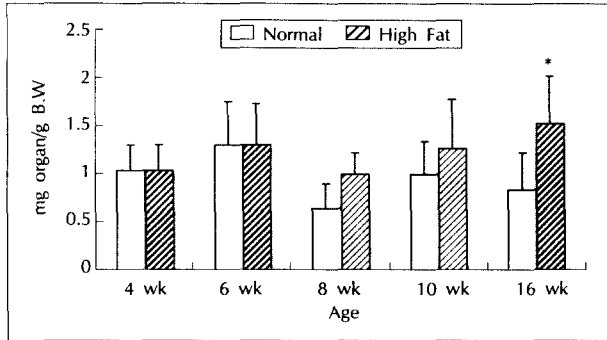


Fig. 1. Effects of dietary fat level and age on brown adipose tissue weight. *: Significantly different from normal group at the same diet period at $p < 0.05$ by student's t-test.

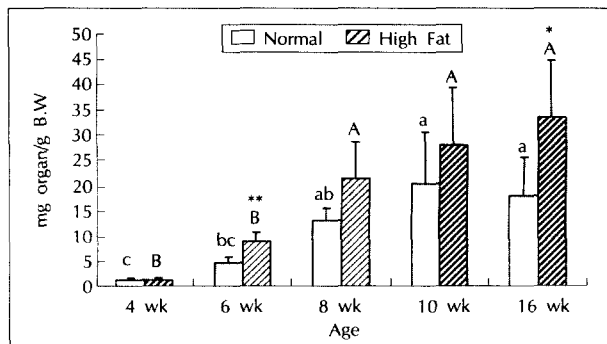


Fig. 2. Effects of dietary fat level and age on visceral fat mass. AB, abc: Different letters in the same diet group indicate significant difference ($p < 0.05$) between age by Duncan's Multiple Range Test. *: Significantly different from normal group at the same diet period at $p < 0.05$ by student's t-test.

갈색 지방조직 무게는 10주령까지는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 고지방 식이 공급 12주 후 고지방 식이군 ($1.51 \pm 0.49\text{mg/g B.W.}$)이 정상 식이군 ($0.84 \pm 0.38\text{mg/g B.W.}$)보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 내장 지방 무게는 실험식이 공급 2주 후부터 고지방 식이군 ($9.07 \pm 1.82\text{mg/g B.W.}$)이 정상식이군 ($4.73 \pm 1.33\text{mg/g B.W.}$)에 비해 유의적으로 높았고 ($p < 0.01$), 식이 공급 12주 후에는 그 차이가 현저하여 고지방 식이군 ($33.80 \pm 11.15\text{mg/g B.W.}$)이 정상 식이군 ($18.15 \pm 7.62\text{mg/g B.W.}$)보다 1.9배 증가함을 보였다.

주령 및 고지방 식이 공급 기간에 따른 지방량의 변화를 살펴 볼 때, 갈색 지방조직은 주령에 따라 단위 체중당 무게에 변화가 없었고, 내장 지방은 고지방 식이에 의한 급격한 영향을 보여 고지방 식이군에서는 식이 공급 2주 후에 $9.07 \pm 1.82\text{mg/g}$ 으로 4주 baseline ($1.31 \pm 0.55\text{mg/g}$)의 6.9배까지 증가하여 단기간에 큰 지방 축적을 보인 반면, 정상식이 군에서는 10주령까지 고지방 식이군보다 적은 폭으로 꾸준히 증가함을 보였고 16주령에서는 오히려 10주령 보다

단위 체중당 지방량이 감소함을 보였다.

Hansen 등의 보고¹¹⁾에서는 50% 지방 식이를 4주간 먹인 쥐의 내장 지방량이 대조군의 2배였다고 하였고, 본 실험 결과 고지방 식이에 의한 영향이 갈색 지방조직보다는 내장 지방량에 더 크게 나타난 것을 볼 때, 이는 내장 지방이 만성 퇴행성 질병의 유병율을 높이는데 있어서 큰 위해 요인임과 관련하여 시사하는 바가 크다고 하겠다. 또한, 본 연구 결과 이유기 직후부터 공급한 고지방 식이가 지방 축적에 미치는 영향이 급격한 것과 식이의 지방 비율이 비만에 큰 영향을 미치는 것¹¹⁾을 생각할 때 성장기의 지방 과다 섭취는 비만 발생에 주요한 위험요인이 될 수 있다고 보겠다.

3. 혈중 Leptin 및 insulin 함량

Leptin이 체중 및 체지방량과 상관관계가 높으며^{13,14)} 고지방 식이에 의해서 leptin의 발현 및 혈중 leptin 농도가 증가한다는 연구 결과들이 보고되어 왔다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 본 실험 결과도 고지방 식이군에서 실험식이 2주 공급 후부터 정상군에 비해 유의적으로 높게 나타났고, 실험식이 공급 기간이 증가할수록 그 차이도 점차 증가함을 볼 수 있었다 ($p < 0.05$). 실험 식이 2주 공급 후 leptin의 함량이 고지방 식이군 ($1.66 \pm 0.89\text{ng/ml}$)이 정상군 ($0.72 \pm 0.05\text{ng/ml}$)에 비하여 2.3배가 높았고, 실험 식이 12주 공급 후에는 고지방 식이군 ($10.53 \pm 1.82\text{ng/ml}$)이 정상군 ($3.93 \pm 0.69\text{ng/ml}$)에 비해 2.7배가 높게 나타나 고지방 식이가 혈청 leptin 농도의 증가를 가져옴을 볼 수 있었다 (Table 3).

이러한 결과는 식이 조성의 변화, 즉 고지방 식이에 의한 혈청 leptin의 함량 변화를 관찰할 수 있어서 leptin이 신체 내 영양상태를 전달하는 호르몬으로 체지방의 변화에 따라서 작용함을 추측케 한다. 즉, 영양상태에 따라 유도된 비만의 결과 지방 세포에 지방이 다량 축적됨에 따라, 생성이 증가된 leptin이 혈중으로 분비되어 식욕과 발열반응, 에너지 소비율 등을 조절하는 것으로 보여 진다. 또한, 앞서 고찰한 바와 같이 고지방 식이군에서 나타난 체지방 비율 증가를 볼 때 본 실험 결과는 leptin이 체지방 비율 및 지방세포 증가와 양의 상관성이 있다는 결과^{14,18,19)}들과 일치한다.

Leptin의 발현은 연령의 증가에 따라 증가하는 경향이 있음이 보고되어 왔는데^{13,18)} 본 실험결과도 정상 식이군과 고지방 식이군 모두에서 주령이 증가함에 따라 혈청 leptin 농도가 증가하여 이와 일치하였다.

혈중 leptin 농도가 주령에 따라 증가하여 16주령에서 leptin 농도가 가장 높은 반면, 16주령 정상 식이군에서의 단위 체중당 지방무게는 모두 10주령에 비해 감소한 것을 볼 수 있는데, 이러한 결과는 leptin이 에너지 소비율을 증

Table 3. Effects of dietary fat level and age on serum leptin and insulin level

		Leptin(ng/ml)		Insulin(ng/ml)	
4 weeks Baseline		0.68 ± 0.07 ^c	0.68 ± 0.07 ^c	0.21 ± 0.05 ^b	0.21 ± 0.05 ^b
Diet	Age	Normal	High fat	Normal	High fat
	6 weeks		0.72 ± 0.05 ^c	1.66 ± 0.89 ^{†c}	0.23 ± 0.04 ^b
8 weeks		1.56 ± 0.31 ^c	3.26 ± 1.14 ^{†c}	0.43 ± 0.13 ^b	0.32 ± 0.11 ^b
10 weeks		2.69 ± 1.12 ^b	6.56 ± 3.92 ^{†b}	0.88 ± 0.77 ^b	1.09 ± 1.06 ^b
16 weeks		3.93 ± 0.69 ^a	10.53 ± 1.82 ^{†a}	1.61 ± 0.50 ^a	2.74 ± 0.77 ^{†a}
Pr > F ¹ (1-way ANOVA)		0.0001	0.0001	0.0012	0.0002
SF ² (2-way ANOVA)			A** B** AB**		B**

Values are Mean ± S.D. † : Normal versus high fat by Student's t-test † : p < 0.05, ‡ : p < 0.01
 1) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at p < 0.05 by Duncan's Multiple Range Test.
 2) Statistical analysis was performed using two-way ANOVA.
 SF: Significant Factor A: Effect of dietary fat level was significant by F-test
 B: Effect of age was significant by F-test AB: Interaction between A+B factor was significant by F-test
 NS: Effect of dietary fat level and age was not significant by F-test ** : p < 0.01

가시켜 체중 감량에 관여한다는 이론^{1,2,4)}을 뒷받침하고 있다고 볼 수 있다. 반면, 고지방 식이군에서는 높은 혈중 leptin 수준이 지방 축적을 억제하지 못했는데 이는 비만 자체가 leptin resistance를 가져온다는 보고와 일치한다. 비만한 사람들과 비만한 쥐의 경우 혈중 leptin의 농도는 높으나 leptin resistance가 정상인들에 비해 높다는 보고들이 있고,^{14,20,21)} 고지방 식이에 의해 유도된 비만에서도 역시 leptin resistance가 증가하는 것을 볼 수 있는데^{8,16,17)} leptin resistance를 Huiqing 등¹⁷⁾은 비만이 leptin에 대한 중추 신경계의 반응성을 감소시켜 leptin의 효과를 상쇄시키기 때문으로 설명했고, Jose 등²⁰⁾은 비만인의 cerebrospinal-fluid(CSF)와 혈청에서의 leptin 농도를 연구한 보고에서 비만인은 leptin의 운반 능력이 적기 때문에 leptin resistance가 생긴다고 설명하고 있다. 이러한 비만에 따른 leptin resistance의 증가는 본 실험 결과 고지방 식이군이 대조군보다 혈청 leptin 농도가 높았음에도 고지방 식이군에서 체중 증가량과 체지방 비율이 더 높게 나타난 결과를 일부 설명해 줄 수 있다고 하겠다.

Leptin resistance는 연령의 증가에 따라서도 증가한다고 보고되고 있는데,^{20,21)} 위에서 설명한 바와 같이 본 실험 결과에서는 주령 증가에 따라 고지방 식이군에서 내장 지방량 증가가 나타났고, 이는 연령 증가에 따른 leptin resistance 증가 보다 leptin 농도의 증가가 체지방량에 더 큰 영향을 미쳤음을 보여준다. 따라서 leptin resistance의 증가가 leptin에 영향을 미쳐 상쇄하지 못한 것으로 보인다.

고지방 식이에 따른 혈액 중의 insulin 함량의 변화는 실험식이 공급 10주까지는 고지방 식이군과 정상 식이군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 실험식이 12주 공급

후에 고지방 식이군(2.74 ± 0.77ng/ml)에서 정상 식이군(1.61 ± 0.50ng/ml)보다 유의적으로 높아(p < 0.05) 고지방 식이를 장기간 공급했을 경우 혈중 insulin 농도가 증가함을 보여주었다(Table 3).

혈중 leptin 농도와 혈중 insulin 농도는 여러 연구에서 양의 상관 관계를 보여주는데,^{16,19,22,23)} 본 연구에서도 혈청 insulin 농도는 8주령 이후부터 혈청 leptin 농도와 비슷한 변화 양상을 보였다. 설치류에서는 leptin의 증가가 hyperinsulinemia를 가져오고 insulin은 지방세포에서의 leptin 발현을 증가시키는 것으로 나타났으나, 사람에게서는 논란의 여지가 있어, Dagogo 등²³⁾은 단기간의 영향으로는 insulin이 사람에게서 leptin의 분비를 증가시키지 못하고 hyperleptinemia도 비만인에서 hyperinsulinemia를 가져오지 못한다고 보고한 반면, Havel의 보고²²⁾에서는 사람에게 insulin을 주입했을 때 혈중 leptin 농도를 증가시켜 insulin은 leptin 생성의 주 조절인자라고 하였고, M Guerre의 보고¹⁶⁾에서는 insulin이 설치류와 사람모두에게서 leptin의 생성을 촉진한다고 하였다.

또한 내장지방의 축적이 hyperinsulinemia를 가져온다는 보고도 있는데 내장 지방은 지방 분해 활성도가 높아 혈중 유리지방산의 농도를 상승시키며, 유리지방산은 insulin resistance와 관련되어 hyperinsulinemia를 가져온다고 보여진다.²⁴⁾ 본 실험결과에서도 주령에 따른, 고지방 식이에 따른 혈청내 insulin 증가가 내장 지방량의 증가와 관련이 있다고 보여진다.

4. 갈색지방 조직에서의 UCP 1의 발현성
 실험동물에서 분리한 갈색 지방조직으로부터 UCP1의

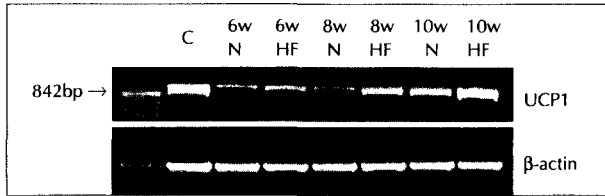


Fig. 3. Comparison of brown adipose tissue UCP1 RNA expression. C: 4 weeks(baseline), 6w N: 6 weeks of age, normal diet group, 6w HF: 6 weeks of age, high fat diet group, 8w N: 8 weeks of age, normal diet group, 8w HF: 8 weeks of age, high fat diet group, 10w N: 10 weeks of age, normal diet group, 10w HF: 10 weeks of age, high fat diet group.

발현 차이를 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 식이 지방 수준과 주령에 따른 BAT에서의 UCP 1 발현량을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다.

갈색 지방조직에서의 UCP1 RNA 함량은 모든 주령에서 고지방 식이군이 정상 식이군에 비해 높게 나타나 고지방 식이에 의해 UCP1 발현이 유도된 것을 보여주었다. 고지방 식이에 의한 갈색 지방조직에서의 발열반응 증가는 UCP1 발현 증가로 설명되어 질 수 있는데 Rippe는 고지방 식이를 먹인 쥐의 갈색 지방조직에서 UCP1 발현이 4배 증가함을 보고하였고,⁷⁾ Watson의 보고⁸⁾에 의하면 obesity-resistant mice는 고지방 식이에 의해 갈색 지방조직에서의 UCP1 발현이 증가된 반면, 유전적으로 비만한 obesity-prone mice는 그렇지 않았다. 이러한 결과들은 식이로 유도된 비만에서 UCP1의 작용이 발열반응을 통해 에너지 소비율을 증가시켜 체중 조절에 기여할 수 있음을 보여준다.

이러한 고지방 식이에 의한 갈색 지방조직에서의 UCP1 발현 증가는 leptin의 증가가 매개체가 되는 것으로 보여진다.^{10,25-27)} Commins 등의 연구²⁵⁾에서는 ob/ob mice에 leptin을 주입하였을 때 UCP1 RNA와 UCP1 protein 양이 4~5배 증가하였고, 체중도 감소함을 보고하였다. Arvaniti 등²⁶⁾은 leptin이 ob/ob mice에서 식이 섭취량을 감소시킴과 동시에 갈색 지방조직 UCP1 발현을 유도하여 체중을 감소시킨다고 하였으며, Scarpace 등²⁷⁾은 leptin이 ob/ob mice에서 산소 소비량을 증가시키고 갈색 지방조직의 UCP RNA를 2배 증가시켰음을 보고하였다. 본 연구에서도 앞서 살펴본 바와 같이 주령이 증가할수록, 또한 고지방 식이를 먹은 실험동물에서 혈청 leptin 농도가 높게 나타났고, 갈색지방조직에서의 UCP1 발현량이 이와 유사한 양상을 띠는 것으로 나타났는데, 이러한 결과들을 볼 때 leptin이 UCP1의 발현을 유도하고, UCP1을 통해 발열반응의 활동성과 발열반응 능력을 증가시켜 에너지 소비율을 촉진하고 체중 조절에 관여한다고 생각된다.

그러나 본 실험 결과에서는 주령이 높은 고지방 식이군에

서의 체지방을 증가는 이러한 leptin과 UCP1의 체중 조절을 위한 negative feedback은 한계가 있음을 보여준다고 하겠다. 고지방 식이에 의해 leptin 농도와 UCP1 발현이 증가가 유도되었으나 체중 증가와 체지방 축적을 대조군 수준으로 억제하지는 못했음을 알 수 있다. Iossa 등도 고지방 식이를 먹인 쥐가 저지방 식이를 먹인 쥐보다 에너지 소비량이 많았으나 체지방 증가량 역시 많아 고지방 식이에 의해 유도된 에너지 소비량 증가가 지방 축적의 일부분만을 억제했다고 보고하였다.²⁸⁾

갈색 지방조직의 UCP 1 RNA 함량은 이유기 직후인 4주령의 발현량이 높았는데 이 결과는 어린 아기에서 갈색 지방조직에서의 발열반응이 많은 것을 설명해 줄 수 있다. 주령 증가에 따른 발현량 증가를 볼 수 있었는데 4주령 이후로 6주령에서는 UCP1 RNA 함량이 급격히 감소한 후, 6주령 이후로 정상 식이군과 고지방 식이군 모두에서 주령이 증가함에 따라 UCP1 발현량이 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나, 생후 3, 12, 18, 24, 30개월에서의 갈색 지방조직 UCP1 RNA 함량을 측정 한 Hua등의 보고¹⁸⁾에서는 연령에 따른 변화가 없다고 하여 연령 증가에 따른 UCP1 발현 차이는 추후의 연구가 필요하다고 보여진다.

요약 및 결론

본 연구는 성장기 전반에 걸친 고지방 섭취로 인한 체지방 형성 및 분포, 혈청 leptin 농도와 갈색지방조직에서의 UCP1 발현에 미치는 영향을 조사하여 성장기의 고지방 섭취가 비만 유전자를 통한 에너지 대사 조절에 미치는 영향과 이에 따른 비만 발현 정도가 성장 시기에 따라 어떻게 나타나는지를 살펴보기 위하여 수행하였다.

1) 식이 섭취량에는 실험군간에 차이가 없었으나 체중 증가량과 식이 효율은 고지방 식이군에서 높았으며 주령이 증가함에 따라 차이가 크게 나타났다.

2) 고지방 식이군에서 단위 체중당 체지방량이 많았으며 이러한 고지방 식이의 영향은 갈색 지방조직보다 내장 지방에서 더 크게 나타났다. 고지방 식이군에서의 체지방량 증가는 실험식이 공급 2주후인 6주령부터 나타나기 시작하여 성장기의 고지방 섭취가 지방 축적에 미치는 영향이 단기간에 나타났음을 보여주었다.

3) 혈청 leptin은 주령에 따라 증가하면서 고지방 식이군에서 정상 식이군 보다 높은 값을 보여 혈청 leptin이 고지방 섭취에 의해 증가하며 체지방 비율과도 상관성이 있음을 보여주었다. 또한, 고지방 섭취에 의한 leptin의 증가가 체지방 축적 및 체중 증가를 대조군 수준으로 조절하지는 못

하는 것으로 나타났다.

4) 혈중 인슐린 농도는 실험식이를 12주간 공급한 16주령에서 고지방 식이군이 정상 식이군에 비해 높은 값을 보여 장기간의 고지방 섭취가 고인슐린혈증을 유발함을 보여 주었다. 또한, 혈중 인슐린 농도는 leptin과 상관성이 있음을 나타내었고 내장 지방량과도 관련이 있음을 보여주었다.

5) 갈색 지방조직에서의 UCP1 발현은 고지방 식이에 의해 증가하였고 주령에 따라 증가하는 경향을 보였다. UCP1 발현량은 leptin의 농도와 양의 상관 관계를 갖는 것으로 보이며 leptin이 UCP1 발현을 유도하여 발열반응을 통해 에너지 소비율을 증가시키고 체중 조절에 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 고지방 섭취에 의한 UCP1 발현 증가는 체지방 축적 및 체중 증가를 대조군 수준으로 조절하지는 못함을 알 수 있었다.

결론적으로, 성장기의 고지방 섭취에 의해 혈중 leptin과 갈색지방조직에서의 UCP1 발현이 증가하고 이들의 에너지 대사 조절 작용은 체지방 축적 및 비만 조절에 관여하는 것으로 보인다.

Literature cited

- 1) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994
- 2) Meier CA. Advances in the understanding of the molecular basis of obesity. *Eur J Endocrinol* 133: 761-763, 1995
- 3) Sainsbury A, I Cusin, F Rohner-Jeanrenaud, B Jeanrenaud. Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuro-peptide Y infusion in normal rats. *Diabetes* 46: 209-214, 1997
- 4) Mistry AM, Swcik AG, Romsos DR. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/bo mice. *J Nutr* 127: 2065-2072, 1997
- 5) Sean H Adams. Uncoupling protein Homologs: Emerging Views of Physiological Function. *J Nutr* 130: 711-714, 2000
- 6) Keith DG, Martin J, Pet J. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Letters* 438: 10-14, 1998
- 7) Rippe C, Berger K, Boeirs C, Ricquier D, Erlanson AC. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(2): E293-E300, 2000
- 8) Watson PM, Commins SP, Beiler RJ, Hatcher HC, Gettys TW. Differential regulation of leptin expression and function in a/J vs. C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(2): E356-E365, 2000
- 9) Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Scerwood SW, Adams SH, Pan G. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB J* 14(11): 1611-1618, 2000
- 10) Javier M, Amelia MJ, Alfredo M. Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-

- energy diet and relationships with leptin, glucose and PPAR γ . *J Nutr Biochem* 12: 130-137, 2001
- 11) Hansen PA, Han DH, Nolte LA, Chen M, Holloszy JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed high fat diet. *Am J Physiol* 273(5pt 2): R1704-1708, 1997
- 12) Armand M, Borel P, Cara L, Senft M, Chautan M, Lafont H, Lairon D. Adaptation of lingual lipase to dietary fat in rats. *American Institution of Nutrition* 1148-1156, 1990
- 13) Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA, Kraemer GR, Gimpel T. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil Steril* 70(3): 472-477, 1998
- 14) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, Mckee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New Eng J Med* 334(5): 292-295, 1996
- 15) Lin X, Chavez MR, Bruch RC, Kilroy GE, Simmons LA, Lin L, Braymer HD, Bray GA, York DA. The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum and the response to leptin and not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity. *J Nutr* 128(10): 1606-1613, 1998
- 16) M Guerre-Millo. Regulation of ob gene and overexpression in obesity. *Biomed & Pharmacother* 51: 318-323, 1997
- 17) Huiqing Lu, Zhengbo D, Craig H, KL Catherine J, Anne Buisson, Joseph CD. Obesity due to high fat diet decreases the sympathetic nervous and cardiovascular responses to intracerebroventricular leptin in rats. *Brain Res* 47(4): 331-335, 1998
- 18) Hua Li, Michael M, Margery N, Nihal T, Philip JS. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46: 2035-2039, 1997
- 19) Havel PJ, Kasim KS, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endo Met* 81(12): 4406-4413, 1996
- 20) Jose FC, Jerzy WK, Mark RN, Joanna PL, Irina O, Warren HG, Richard BL, Pei LA, Madhur KS, Robert VC. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161, 1996
- 21) Scarpace PJ, Matheny M, Moore RL, Tumer N. Impaired leptin responsiveness in aged rats. *Diabetes* 49(3): 431-435, 2000
- 22) Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation. mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc* 59(3): 359-371, 2000
- 23) Dagogo JS, Fanelli C, Parmore D, Brother J, Landt M. Plasma leptin and insulin relationship in obese and nonobese humans. *Diabetes* 45 (5): 695-698, 1996
- 24) Abate N. Insulin resistance and obesity: the role of fat distribution. *Diabetes Care* 19: 92-294, 1996
- 25) Commins SP, Watson PM, Padgett MA, Dudley A, Argyropoulos G, Gettys TW. Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology* 140(1): 292-300, 1999
- 26) Arbaniti K, Ricquier D, Champigny O, Richard D. Leptin and corticosterone have opposite effects on food intake and the expression of UCP1 mRNA in brown adipose tissue of lep(ob)/lep(ob) mice. *Endocrinology* 139(9): 4000-4003, 1998
- 27) Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tumer N. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol* 273(1 pt 1): E226-230, 1997
- 28) Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G. Fat balance and hepatic mitochondrial function in response to fat feeding in mature rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23(11): 1122-1128, 1999