



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

李 名 淑 教 授 指 導  
碩 士 學 位 請 求 論 文

단기(2주) 고지방 섭취가 흰쥐의  
비알코올성 지방간질환에 미치는 영향

2022

誠信女子大學校 生涯福祉大學院  
食品營養學科 臨床營養專攻  
金 娜 來

단기(2주) 고지방 섭취가 흰쥐의  
비알코올성 지방간질환에 미치는 영향

李 名 琚 教授指導

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2022年 12月

誠信女子大學校 生涯福祉大學院


食品營養學科 臨床營養專攻

金 娜 來


# 인 준 서

김나래의 석사학위 논문으로 인준함

2022년 11월

심사위원장 이 승 민 (서명 )

심사위원 강 태 옥 (서명 )

심사위원 이 병 독 (서명 )

성신여자대학교 생애복지대학원

## 논문개요

비만의 유병률은 한국 외에도 글로벌 사회문제로 대두된 지 오래인데 해결책이 부진한 이유는 비만을 발생하는 원인 혹은 발생 후 관련된 합병증 발병이 특발성 유전적인 원인도 있지만 다인성 비만 환경 인자 간 (obesogenic factors) 복합적인 상호작용으로 진행되기 때문이다. 제2형 당뇨병, 비알코올성 지방간, 폐쇄성 무호흡증, 고혈압, 심혈관 및 뇌혈관 질환, 이상지질혈증 등의 질환들이 체중감소를 통해 질환을 예방하고 개선할 수 있다는 점이 그 근거이다. 특히 비알코올성 지방간 (NAFLD)의 발생률 및 기전을 추적하면 비만의 기전과의 차이를 발견하기가 쉽지 않다. 따라서 항비만 기전 연구의 목적에 따라 적절한 동물모델을 사용하는 것은 동물생명 윤리 외 경제적인 측면에서 매우 중요하다.

비만을 유도하는 high fat diet-induced obesity (DIO) 모델 디자인은 항비만 약물 및 기능성 식품개발에 널리 사용하고 있다. 그러나 fat % (45~60%)와 투여 기간 (4~12주)에 따라 간 독성 등 부작용 문제 등이 비만 연구의 장애가 되고 있다. 본 연구의 목적은 60% 고지방식이를 단기간 (2주) 투여하여 다양한 조직에서의 손상 정도, 염증지표 및 지방생성 및 인슐린/렙틴 저항성 등을 조사하여 연구목적에 따른 DIO 모델의 활용성을 다양화하는데 기여하고자 한다.

본 실험은 생후 4주령의 수컷 Sprague-Dawley rats (DBL Co., Ltd., Korea)을 첫 일주일간 적응 사육한 후, 무작위로 각각 6마리씩 2군으로 분리하였다. 대조군 (Con)에는 9% 지방을 함유한 식이 (Rodfeed, DBL Co., Ltd., Korea)를 실험군 (High fat)에는 60%E 지방을 함유한 식이 (HF;

D12492, DBL Co., Ltd., Korea)를 공급하였다. 본 실험은 성신여자대학교 동물연구윤리위원회로부터 승인 (SSWIACUC-2021-008-1)을 받은 후 진행되었다.

대조군 (Con) 대비 2주간 투여한 HF군 (60% fat)에서 간 독성 (AST, ALT) 및 기관무게 (간, 비장, 신장)의 차이는 없으며 체중 증가량, 식이 효율, 혈당, 지방조직 (신장, 내장지방, 부고환)무게, 간 조직의 지방합성단백질 발현 (PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\beta$ ), 염증 유도 사이토카인 (TNF- $\alpha$ , IL-6) 등이 유의적으로 증가하였다. Con 대비 HF군에서 혈중 중성지방과 콜레스테롤은 감소하였으나 간의 중성지방 증가 및 H&E 염색기반 지방조직의 변화 등으로 지방간이 형성됨을 확인하였다. 반면 Con 대비 HF군의 지방 조직에서 분비되는 사이토카인으로 식이조절에 관여하는 비만유전자 leptin과 항비만 사이토카인인 adiponectin을 동시에 감소하였다.

고지방식이 2주간 투여 기간에 따른 DIO 모델에서 간 조직의 지방합성 및 염증성 지방간 형성에는 적절하지만 조직간 지질대사 항상성을 확인하는 사이토카인 기전 등을 확인하기에는 투여 기간이 부족하다고 생각한다. 그러나 비만을 기반으로 하는 NAFLD 및 NASH 등과 연계된 식품 및 약물 개발에는 본 연구모델이 경제적이며 효율적이라고 생각한다.

아울러 최근 비만 관련 수치를 호전시켜 인슐린 감수성 개선 등의 효과 때문에 특이질환 식이치료로 사용하던 저탄수화물 고지방 식사가 다이어트 프로그램으로 자주 활용되고 있다. 그러나 건강한 사람에게서 저탄고지 식사는 인슐린 감수성 개선 효과보다 지질대사 이상을 초래하여 궁극적으로 인슐린 및 사이토카인 저항성을 유발하여 대사이상 등 부작용이 우려되므로

장기간의 저탄고지 식이요법은 부적절하다. 물론 인체시험에 적용하기는 어려우나 2주간의 고지방 식사로도 충분히 지방간이 나타나므로 유념하여야 한다. 저탄수화물 식사는 고지방 외에도 고단백질 식사로 전환되므로 특이 질환자에게 매우 위험하므로 향후 체중조절에 효과적이며 부작용을 최소화하는 적절한 에너지 영양소의 비율 배분을 위한 인체 중재 시험이 시행되어야 할 것이다.

# 목 차

## 논문개요

<b>I. 서론</b> .....	<b>1</b>
1. 비만의 원인 및 연계 질병의 유병률 .....	1
1-1. Type II Diabetes Mellitus .....	3
1-2. Hypertension .....	4
1-3. Hypertriglyceridemia .....	4
2. 비알코올성 지방간 질환 (NAFLD) .....	5
2-1. 원인 .....	5
2-2. 저탄수화물 고지방 식이 효과 .....	7
2-3. 기타 염증인자 간의 관계 .....	7
3. 지방 조직의 염증성 사이토카인 분비 .....	8
4. 연구목적 .....	10
<b>II. 재료 및 방법</b> .....	<b>11</b>
1. 실험동물 및 식이 .....	11
2. 식이 효율, 체중 증가량 및 식이 섭취량 .....	13
3. 혈액 수치 측정 .....	13
3-1. 혈당 측정 .....	13
3-2. 중성지방 (Triglyceride) 측정 .....	14
3-3. 총콜레스테롤 (Total Cholesterol) 측정 .....	14
4. 간 조직 검사 .....	14

4-1. 독성 검사 (AST/ALT) .....	14
4-2. 간조직의 지질 추출 (Folch) .....	15
4-3. 조직검사 (Hematoxylin & Eosin staining) .....	15
5. 조직 단백질 발현 (Western Blotting analysis) .....	17
6. Statistical analysis .....	18
<b>III. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>19</b>
1. 체중, 식이 섭취량 및 식이 효율 .....	19
2. 조직 무게 .....	22
3. 간 독성 검사 .....	25
4. Plasma에서의 혈당, 중성지방 및 총콜레스테롤 수치 측정 .....	26
5. 간 조직에서의 중성지방 및 총콜레스테롤 수치 측정 .....	28
6. 간 조직에서의 지방 형성 .....	30
7. 간 조직에서 염증성 사이토카인 (Inflammatory Cytokine) 반응 .....	32
8. 지방조직에서의 Adipogenesis 유전자 발현 .....	34
9. 지방조직에서의 아디포카인 (Adipokine) 반응 .....	36
<b>IV. 요약 및 결론 .....</b>	<b>38</b>

## 참고문헌

## Abstract

## List of Table

Table 1. Diet composition of contents & experiment diets. ....	12
Table 2. 1st antibodies and 2nd antibodies used in western blotting analysis. ....	18
Table 3. Weight gain, dietary intake and food efficiency in 2 weeks-treatments with the HF and the Con diets. ....	21
Table 4. Changes of weights in organs and fat tissues for 2 weeks diets with the HF and the Con. ....	24
Table 5. Triglyceride and total cholesterol concentration in liver fed HF and Con diets for 2 weeks. ....	29

## List of Figure

Figure 1. The relationships between various biomarkers related to obesity prevalence or obesity-linked disease. ....	2
Figure 2. The prevalence of obesity and obesity-linked diseases. ....	3
Figure 3. The transition process spectrum from a healthy liver to hepatocellular carcinoma. ....	6
Figure 4. Differences in body weight gain (A), dietary intake (B) and food efficiency ratio (C) in the HF and Con groups for 2 weeks. ....	20
Figure 5. Changes of weights in several organs, such as liver, spleen, kidney and fat tissues (A & B), fed with the HF (60%E) diets for 2 weeks compared to the Con. diets. ....	23
Figure 6. Changes of activities of plasma AST (A), ALT (B) and AST/ALT ratio (C) in 2 weeks-treatments with the HF (60% E) and Con diets. ....	25
Figure 7. Changes of plasma blood glucose (A), triglyceride (B) and total Cholesterol (C) in 2 weeks-treatments with the HF (60% E) and Con diets. ....	27
Figure 8. Triglyceride (A) and total cholesterol (B) concentrations in liver tissues for 2 weeks diet with the HF (60%E fat) and the Con (9%E fat). ....	29
Figure 9. Comparison of H&E staining to find fat accumulation in liver tissues fed the Con (A), the HF for 2 weeks (B) and the HF for 15 weeks (C). ....	31

Figure 10. Production of proinflammatory cytokines in liver tissues, such as TNF- $\alpha$ and IL-6 in 2 weeks-treatments with the HF and Con diets. ....	33
Figure 11. Expression of adipogenesis biomarkers in epi fat such as PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$ fed HF & Con diets for 2 weeks. ....	35
Figure 12. Expression of inflammatory (leptin) and anti-inflammatory cytokines (adiponectin) and their ratio in fat tissues in 2 weeks diet-treatments with the HF and Con diets. ....	37

## ABBREVIATIONS

BMI	body mass index
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
WAT	White adipose tissue
LEP-R	Leptin receptor
DGAT	Diglyceride acyltransferase
TAG	Triacylglycerol
AST	Aspartate transaminase
ALT	Alanine transaminase
IL-6	Interleukin-6
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
C/EBP $\beta$	CCAAT/enhancer-binding protein beta
Epi fat	Epididymis fat
HF	High fat diet
Con	Control diet

# I. 서론

## 1. 비만의 원인 및 연계 질병의 유병률

비만은 체내의 과도한 에너지가 지방으로 전환되어 비정상적인 지방 조직 축적을 보이는 상태를 말한다.[1] 비만의 유병률은 전 세계적으로 증가하고 있으며[2], 국민건강영양조사 결과, 국내 비만 유병률은 2010년 30.9%에서 2020년 38.3%로 약 7.4% 증가하였다. 특히 19~29세는 2010년 20.5%에서 2020년 32.6%로 약 12.1% 증가하였으며, 30~39세는 2010년 31.0%에서 2020년 41.6%로 약 10.6% 증가하여 타 연령대보다 높은 증가율을 보였다.[3]

비만의 원인은 특발성 (spontaneous naturally occurring), 가족력 및 유전적 요인 (특히 유전자의 돌연변이), 식사 섭취 및 식습관 (잘못된 식습관 및 식행동), 신경내분비적 원인 (갑상샘 저하증, 쿠싱증후군, 다낭성 난소증후군, 성장호르몬 결핍증, Prader-Willi, Bardet-Biedl 등) 등으로 매우 다양하다.[4][5] 다인성 복합 질병인 비만 유병률 증가의 요인분석은 매우 복잡하다.[6] 따라서 에너지 소비 감소와 에너지 섭취 증가에 따른 에너지 불균형이 비만의 근본적인 원인으로 가정하고, 다양한 비만 환경 인자와의 상관성에 따라 비만 관련 합병증 유병률을 억제하는데 유념하여야 한다.[7]

비만은 여러 병태생리학적 요인들로 비알코올성 지방간, 대사증후군(복부비만, 고혈압, 공복혈당장애, 고중성지방혈증, 낮은 고밀도지단백콜레스테롤), 제2형 당뇨병, 고혈압, 수면무호흡증 등을 유발할 수 있고, 비만의 유병률이 증가함에 따라 비만의 합병증의 유병률도 증가하고 있다 (Figure 1).[8][9][10][11] 특히 복부비만의 원인인 내장지방의 증가는 비알코올성 지방간, 대사증후군 등의 강력한 위험인자이므로 체중감량을 통한 내장지방 감소가 1

차 예방 및 치료에서 가장 효과적인 방법으로 제안되고 있다. [12][13]

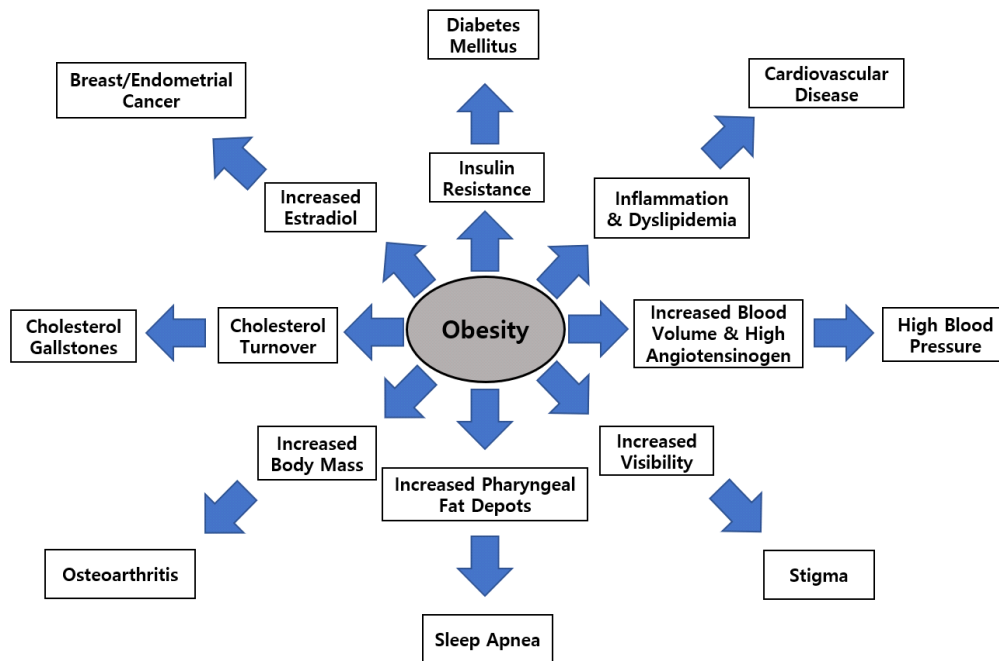
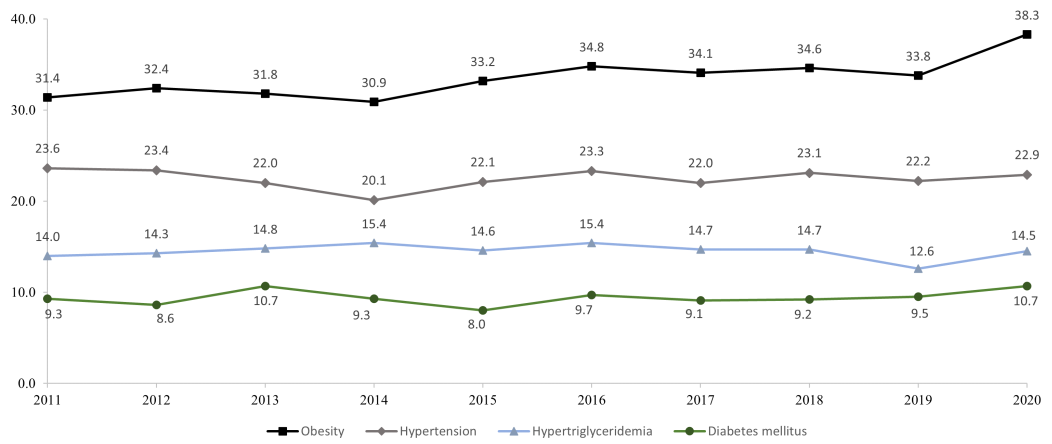


Figure 1. The relationships between various biomarkers related to obesity prevalence or obesity-linked disease.

A model presents the relationship between obesity and obesity-related complex diseases. The middle box is the pathophysiological factors involved in the development of the disease. Many of these pathophysiological factors may interact and may be involved in more complex causal pathways, but potential interactions have been omitted for clarity.[8]

최근 한국인의 비만 및 비만 관련 질환 (고혈압, 고중성지방혈증, 당뇨)의 10년간 유병률은 Figure 2.와 같다. 비만으로 인해 질병이 생기는 뇌혈관 질환과 제2형 당뇨병은 간과 근육 세포 내에 지질이 축적되며 생기는 인슐린 저항성으로 설명할 수 있다.[14] 제2형 당뇨병, 비알코올성 지방간, 폐쇄성 무호흡증, 고혈압, 심혈관 및 뇌혈관 질환, 이상지질혈증 등의 질환에서는 체중감소를 통해 질환 예방 또는 개선할 수 있을 만큼 비만의 중요도가 높다.[15][16]



**Figure 2. The prevalence of obesity and obesity-linked diseases.**

The prevalence of obesity and obesity-related diseases over 10 years (2011~2020) was presented. Obesity; high blood pressure; hyperlipidemia; diabetes; Among them, the prevalence of obesity and diabetes is the highest in recent years.[3][17]

### 1-1. Type II Diabetes Mellitus

제2형 당뇨병은 탄수화물과 지방 대사의 이상을 특징으로 하는 만성 질환으로, 내장지방이 증가한 형태의 비만이 나타나고 있다.[18] 국민건강영양조사 자료를 바탕으로 분석한 대한당뇨병학회의 당뇨병 관련 역학자료 분석

(Diabetes Fact Sheet in Korea 2022)에 의하면 당뇨병 유병자 중 절반 이상인 54.4%가 비만을 동반하였고 그중 2단계 이상의 비만을 동반한 경우는 12.9%였다. 또 복부비만을 동반한 당뇨병 유병자가 약 63.3%였다.[19]

### 1-2. Hypertension

고혈압은 발병 원인에 따라 본태성 고혈압 (essential hypertension)과 이차성 고혈압 (secondary hypertension)으로 나눌 수 있다. 역학조사에 의하면 고혈압 대부분은 본태성 고혈압이며 약 5~10% 정도가 이차성 고혈압이다. 본태성 고혈압은 동맥경화증, 비만, 비인슐린 의존성 당뇨병, 심장 질환 등을 수반하는 다인자 혹은 복합성 질환으로 아직까지 그 원인 규명이 확실하게 이루어져 있지 않다.[20] 그러나 현재까지 알려진 고혈압의 원인 중 생활 습관 인자로는 고령, 비만, 운동 부족, 당뇨병, 고지혈증, 흡연, 스트레스 등이 대표적이다.[21]

### 1-3. Hypertriglyceridemia

고중성지방혈증은 내장 비만, 제2형 당뇨병, 대사증후군이 있는 사람에게 흔한 지질 이상 질환이다.[22] 고중성지방혈증의 유병률은 과체중 또는 비만한 사람에게서 증가하며, 지방세포의 중성지방 저장 증가 및 지방산 배출 장애를 포함한 지방 조직의 기능 장애 등이 비만 관련 합병증 발생에 기여한다.[23] 한국지질동맥경화학회 ‘Dyslipidemia Fact Sheets in Korea, 2018’에 따르면 고중성지방혈증과 함께 저 HDLc 혈증이 포함된 이상지질혈증은 30세 이상 성인 비만에서 증가하며, BMI > 25kg/m<sup>2</sup> 혹은 복부비만의 50% 이상이 이상지질혈증을 동반하였다고 한다.[24]

## 2. 비알코올성 지방간 질환 (Non Alcoholic Fatty Liver Disease; NAFLD)

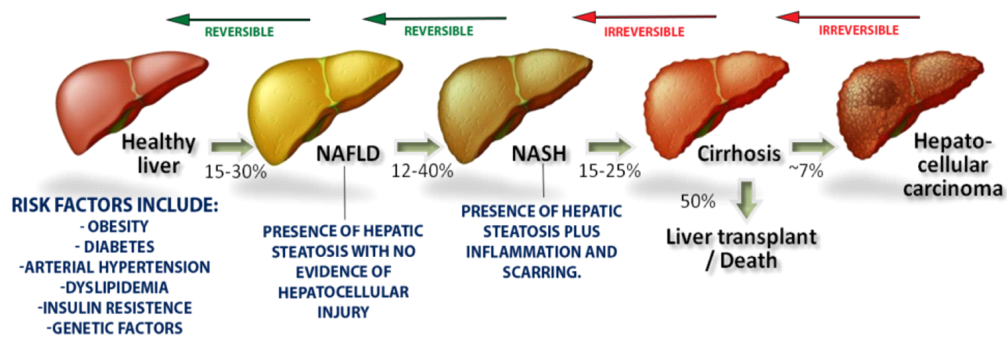
### 2-1. 원인

지방간은 알코올성 지방간과 비알코올성 지방간으로 분류한다.[25] 전자의 원인은 과도한 알코올 섭취에 따른 대사산물이 간세포를 손상시키고 지방이 축적되는 것이다.[26] 따라서 유전적 요인이나 영양사태에 따른 개인 차이가 있겠으나 남자는 하루 알코올 40g 이하 (포도주 2잔, 소주 1/2병), 여자는 하루 20g 이하의 음주량이 안전한 것으로 알려져 있다.[27] 그러나 알코올성 지방간 상태에서 음주가 계속될 경우 20~30%가 지방간염으로, 10%는 간경변증으로 진행되기도 한다.[28]

2007년 국내에서 5,237명의 남성을 대상으로 4년 이상 비알코올성 지방간 (NAFLD)의 발생률을 추적하였을 때 연간 1,000명당 74.01명이었다.[29] NAFLD의 발생과 발달에 관련된 메커니즘은 분명하지 않지만, 유전적 취약성, 비만 당뇨 고지혈증 동반성 여부, 스테로이드 호르몬약제 복용, 운동 부족, 고지방 섭취 증가 등 간의 과도한 지질축적과 관련된 대사이상을 포함한다.[30][31] 다양한 *in vivo* 연구에서 고지방식이 NAFLD 외에도 비알코올성 지방간염 (Non Alcoholic Steato Hepatosis; NASH)의 진행 및 간 지방증 (steatosis)에 관련되어 있다고 보여진다.[32] 지방증 (steatosis)은 조직 내외 지방산 input과 output 사이의 불균형에 의해 생긴 지방질 축적 결과이며,[33] 간 지방증 (liver steatosis)은 간 조직검사 시 5% 이상의 간세포에 지방이 침착된 경우로 정의된다.[34] 간 지방증은 일반적으로 양성 질환으로 인식되지만 NASH로 발전될 수 있으며, 이는 간경화 혹은 간암과 같은 심각한 간 질환의 전조로 나타날 수 있다 (Figure 3).[32][35] 최근 NAFLD으로 인하여 전환된 간세포암은 빠르게 증가하는 추세이며, 미국인

의 간세포암종 원인으로 NAFLD가 세 번째로 높으며 점차 주요 원인이 될 것으로 예측했다.[36]

NAFLD의 유병률은 BMI의 증가와 비례하고 실제로 NAFLD는 과체중에 서 약 2배, 비만인은 약 4배 더 많이 발생하였으며, 비만 수술을 받는 중증 비만 환자의 90% 이상이 NAFLD를 가지고 있다.[37][38][39] 복부 비만, 고혈압, 공복혈당장애, 고중성지방혈증, 낮은 고밀도지단백콜레스테롤로 구성된 대사증후군 또한 NAFLD의 주요한 위험인자이다. 대사증후군을 동반한 경우 NAFLD의 유병률은 50%이며 제2형 당뇨병 환자에서의 NAFLD 유병률은 76% 이상이다.[40][39] 비만 연관 질병에서의 NAFLD 유병률이 높기 때문에 체중 감량 조절 및 체중조절을 위한 저지방 식사, 유산소 운동, 항산화 및 지질 강하제 등은 NAFLD 발생을 억제하는데 도움이 될 것이다.[41][42]



**Figure 3. The transition process spectrum from a healthy liver to hepatocellular carcinoma.** It was well known that NAFLD might be caused by several risk factors such as obesity, diabetes, high blood pressure, dyslipidemia, insulin resistance, and genetics. NAFLD can be reversibly returned to a healthy liver, but it is difficult to return if cirrhosis or higher progresses.[35]

## 2-2. 식이 효과 (저탄수화물 고지방식)

최근, 과체중 혹은 비만, 당뇨병 등 체중조절이 필요한 환자 혹은 건강관리를 위하여 체중감소를 원하는 건강인들에서 저탄수화물 고지방 (저탄고지)식의 활용이 증가하고 있다.[43] 임상영양치료에서의 저탄고지식은 난치성 뇌전증 환자들에게 탄수화물 극히 제한하고 지방을 제공하는 ketogenic diet (지방 약 90%, 단백질 약 8%, 탄수화물 약 2%)의 활용을 말한다.[44] 이 같은 저탄고지 식사는 간에서 아세틸-CoA의 케톤체로 전환이 과도하게 생성되므로 특정 의료조건에 치료적인 개입으로만 사용하였으며, 환자들에게도 미세 영양소 보충을 병행하여 치료하였다.[44][45][46]

저탄수화물 식이요법은 비만 관련 수치를 호전시켜 인슐린 감수성이 개선되었다는 연구가 있었으나, 에너지 소비 증가와 체지방 감소에 대한 근거가 없고 특히 체중감소가 없는 경우 인슐린 민감성과 포도당 자극에 의해 인슐린 분비가 손상될 수 있다.[47][48]

따라서 체중감량을 통해 간의 지질대사 이상에 따른 NAFLD를 개선할 수 있으나, 구체적인 영양소의 식이 구성을 통한 개선점에 대한 연구는 아직 부족하다.[49][50] 또한 NAFLD 환자에게 청량음료, 포화지방산 및 정제된 탄수화물이 적은 식단을 권장하지만, NAFLD에 대한 명확한 식이 구성에 따른 식단 권고안이 나오기까지는 보다 장기간 연구가 필요하다.[50]

## 2-3. 기타 염증인자 간의 관계

지방축적이 과도한 지방세포는 중성지방을 저장하지 못하기 때문에 대신 골격근과 간에 지질이 과도하게 축적되며, 에너지 섭취가 에너지를 소비를 초과하는 상황에서 이소성 지방 침착 및 인슐린 신호전달 체계를 방해한다.[51][52] 즉, 고지방식이 NAFLD, NASH 및 steatosis에 관련되어 있기 때문이다.[32] 인슐린 저항성을 가진 비만인의 지방조직은 TNF- $\alpha$ , IL-6,

leptin, adiponectin을 포함하여 염증 분자의 발현 및 분비가 증가하는 것이 특징이다.[53][52] Adiponectin과 TNF- $\alpha$ 는 상호 길항작용을 하여 서로의 생산과 활성을 억제하기 때문에 증가하는 TNF- $\alpha$ 와 달리 adiponectin은 인슐린 감수성 및 내장지방의 양과 반비례 관계에 있는 비만 환자에게서 감소한다.[54]

### 3. 지방 조직의 염증성 사이토카인 분비

백색지방(white adipose tissue; WAT)의 주된 역할은 에너지를 저장하는 기관이지만 에너지 항상성, 면역력, 염증 등 생리적 기능에 적극적으로 참여하는 것으로 알려져 있다.[55] WAT는 adipokine으로 알려진 leptin, adiponectin, resistin, visfatin 등 기타 다양한 물질을 발현 및 분비하고 이들과 관련한 기관과의 상호기전을 가지고 있으며, 이 adipokine은 염증 및 면역반응의 조절을 통해 비만의 합병증에 기여할 수 있다.[56][57][58]

Leptin은 음식물 섭취, 체질량, 생식 기능 등을 조절하고 태아 성장, 전 염증 면역반응, 혈관신생 및 지방 분해의 역할을 하는 펩타이드 호르몬으로 이의 발견은 에너지 균형과 신경 내분비 축의 조절에 관련된 뇌의 지방 에너지 저장과 신경 회로 사이의 상호관계에 대한 이해를 향상시켰다.[56][59] 특히 leptin은 분화된 지방세포에 발현 및 분비된 후 LEP-R를 가지는 기관과 결합하여 활성화된다.[59] 즉, 유전적으로 leptin이 결핍되면 식사 섭취가 증가하여 비만을 일으키므로 비만유전자라고 불리었다.[60] 혈액 내 leptin 수치는 지방의 저장 상태뿐만 아니라 단식과 과식의 결과로 인한 에너지 밸런스에 의해서도 달라진다.[56] 지방 조직에서의 leptin mRNA 발현 증가에 따른 혈중 leptin 농도도 증가하므로 인체에서 비만도 증가 (체지방비율 증가)와 직접적인 연관이 있다고 보여진다.[61] 지방세포나 지방 조직에 침투

된 대식세포에 의해서 방출되는 adipokine인 leptin, adiponectin, resistin 등은 제2형 당뇨병의 발달이나 인슐린 저항성에 중심적인 역할을 할 수 있는 만성 염증 상태를 초래하며, 그중 leptin은 비만한 사람을 심혈관 질환 발병 위험 증가를 높이는 cytokine이다. [62][63]

Adiponectin은 순환계에서 고농도로 존재하는 아디포카인이며, Adipo R1 및 R2 신호 메커니즘을 통해 다양한 세포 유형의 염증 생성 및 활동을 감소시키므로 항염증성 사이토카인이라고 할 수 있다.[64][65][66] Adiponectin은 근육과 간에서 인슐린 민감성 호르몬으로도 작용하기 때문에 adiponectin의 수치가 낮을수록 비만에서 말초 인슐린 저항성에 기여한다.[67] Adiponectin은 비만 관련 질환(대사증후군, 제2형 당뇨병 등)을 포함하여 죽상동맥경화증, 심혈관계질환, 면역반응, 여러 염증성 질환에서 보호 활성을 나타내며, 실제로 산화를 증가시키고 새로운 유리지방산의 합성을 감소시켜 중성지방 축적을 방지할 수 있다.[68][69]

그러므로 2주 단기간 고지방 섭취한 rat에서 leptin과 adiponectin의 발현 정도를 보아, 고지방식이 섭취를 2주 단기간 섭취하는 경우의 에너지 항상성과 면역력, 염증 등 생리적 기능에 어떠한 영향을 미치는지 연구할 필요가 있다.

#### 4. 연구목적

고지방식이를 사용하여 비만을 유도하는 high fat diet-induced obesity (DIO) 모델 디자인은 비만을 억제하는 약물 및 기능성 식품의 실험에 흔히 사용하고 있다. 주로 45% 혹은 60% fat을 이용하고 있으나 연구목적에 따라 간 독성 문제 등으로 투여 기간 (4주~16주)에 대한 논쟁이 잦다. 따라서 본 연구의 목적은 생후 4주령의 SD rat에서 고지방 함량 60%를 단기간 (2주) 투여하여 다양한 조직의 손상정도 및 염증지표 발현(염증성 adipokines 및 cytokines), adipogenesis 발현 등을 조사하여 연구목적에 따라 DIO 모델의 활용성을 다양화하는데 기여하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 식이

본 실험은 생후 4주령의 수컷 Sprague-Dawley rats (DBL Co., Ltd., Korea) 12마리를 구입하였다. 처음 일주일간 적응 사육한 후, 무작위로 각각 6마리씩 2군으로 나뉘어 2주간 사육하였다. 적응 1주차를 지나서 대조군 (Control)에는 9% 지방을 함유한 식이 (Rodfeed, DBL Co., Ltd., Korea)를 실험군 (High fat)에는 60kcal% 지방을 함유한 식이 (D12492, DBL Co., Ltd., Korea)를 공급하였다. 대조군의 식이 섭취를 대비하여 적절히 공급하였다. 식이 조성 형태는 Table 1.과 같다. 물은 증류수로 150mL씩 공급하였고, 희생 24시간 전 식이 공급을 중단하였다. 실험동물은 isoflurane (HANA PHARM CO., LTD., Seoul, Korea)으로 마취한 후 전혈을 채취하여 혈청을 glucose, triglyceride, total cholesterol 분석에 사용하였고, 조직은 적출하여 실험 전까지 -80°C deep freezer에 보관하였다. 동물 사육실의 조건은 22 ± 1°C와 습도 55 ± 1%를 유지하였으며, 12시간 dark-light cycle로 명암을 조절하였다. 동물실험은 성신여자대학교 동물연구윤리위원회로부터 승인 (SSWIACUC-2021-008-1)을 받은 후 진행되었다.

**Table 1. Diet composition of contents & experiment diets**

<b>Total kcal intake</b>	Unit	Control	High fat
Carbohydrate	Kcal%	67	20
Protein	Kcal%	24	20
Fat	Kcal%	9	60
Total	Kcal%	100	100
<b>Ingredient</b>			
<b>Carbohydrate source</b>	gm%	57.00	-
Maltodextrin 10	gm%	-	16.15
Sucrose	gm%	-	8.89
<b>Protein source</b>	gm%	20.00	-
Casein, 30 Mesh	gm%	-	25.84
L-Cystine	gm%	-	0.387
<b>Fat Source</b>	gm%	3.54	-
Soybean Oil	gm%	-	3.23
Lard	gm%	-	31.65
Fiber	gm%	4.50	6.46
Vitamin Mix, S10026 <sup>1)</sup>	gm%	-	1.29
Vitamin A	IU/g	34.32	-
Vitamin D <sub>3</sub>	IU/g	8.00	-
Vitamin E	gm%	0.0098	-
Vitamin B <sub>12</sub>	gm%	0.00001	-
Niacin	gm%	0.019	-
Choline	gm%	0.2148	-
Mineral Mix, V10001 <sup>2)</sup>	gm%	-	1.29

**<sup>1)</sup> Mineral Mix S10026 (Amt in 10gm/kg)**

Sodium Chloride 2.6g; Magnesium 0.5g; Sulfur 0.33mg; Molybdenum 1.6mg; Chromium 2.0mg; Copper 2.0mg; Iron 37mg; Manganese 59mg; Iodine 0.2mg; Fluorine 0.9mg; Selenium 0.16mg; Zinc 29mg;

**<sup>2)</sup> Vitamin Mix V10001 (Amt in 10gm/kg)**

Vitamin A 4000IU; Vitamin D<sub>3</sub> 1000IU; Vitamin E 50IU; Menadione 0.5mg; Biotin 0.2mg; Vitamin B<sub>12</sub> 10µg; Folic Acid 2mg; Niacin 30mg; Pantothenic Acid 16mg; Vitamin B<sub>6</sub> 7mg; Vitamin B<sub>2</sub> 6mg; Vitamin 6mg

## 2. 식이 효율, 체중 증가량 및 식이 섭취량

체중과 식이 섭취량, 음수 섭취량은 매일 1회 일정한 시간에 측정하였다. 식이 효율은 사육기간 동안의 체중 증가량(g)을 식이 섭취량(g)으로 나눈 값에 100을 곱하여 계산하였다.

$$\text{식이 효율 (Food Efficiency Ratio)} = \frac{\text{Body weight (g)}}{\text{Food intake (g)}} \times 100$$

## 3. 혈액 수치 측정

### 3-1. 혈당 측정

혈당은 글루코스 측정용 시액 (AM201, ASAN PHARM.CO.,LTD, Seoul, Korea)을 이용하여 혈당을 측정하였다. 효소시액을 e-tube에 1.5mL 넣고 sample을 10 $\mu$ L씩 넣은 후 vortex한다. Vortex한 용액을 96 well plate에 100 $\mu$ L씩 분주한다. 37 $^{\circ}$ C incubator에서 5분간 반응시킨 후 spectrometer (Thermofisher, Waltham, MA, USA) 기기로 500nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Glucose 농도는 glucose 표준액을 사용하여 glucose standard curve 추세선을 그려 계산하였다. Sample로 사용한 plasma는 희생 당시 rat을 심장 채혈한 뒤 3,000rpm, 4 $^{\circ}$ C의 원심분리기를 이용하여 plasma를 분리한 후 실험 전까지 -80 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였다.

### 3-2. 중성지방 (Triglyceride) 측정

Triglyceride는 중성지방 측정용 시액 (AM157S, ASAN PHARM.CO.,LTD, Seoul, Korea)과 혈당에서 분리하여 채취한 plasma를 사용하여 측정하였다. 효소 시액 용해액을 e-tube에 1.5mL를 넣고 sample을

10 $\mu$ L씩 넣은 후 vortex한다. Vortex한 용액을 96 well plate에 100 $\mu$ L씩 분주한다. 37 $^{\circ}$ C incubator에서 10분간 반응시킨 후 spectrometer 기기로 550nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Triglyceride 농도는 표준액을 사용하여 triglyceride standard curve 추세선을 그려 계산하였다.

### 3-3. 총콜레스테롤 (Total Cholesterol) 측정

Total Cholesterol은 총콜레스테롤 측정용 시액 (AM202, ASAN PHARM.CO.,LTD, Seoul, Korea)과 혈당에서 분리하여 채취한 plasma를 사용하여 측정하였다. 총콜레스테롤 측정용 완충액은 e-tube에 1.5mL 넣고 sample을 10 $\mu$ L씩 넣은 후 vortex한다. Vortex한 용액을 96 well plate에 100 $\mu$ L씩 분주한다. 37 $^{\circ}$ C incubator에서 5분간 반응시킨 후 spectrometer 기기로 500nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Total cholesterol 농도는 표준액을 사용하여 Total cholesterol standard curve 추세선을 그려 계산하였다.

## 4. 간 조직검사

### 4-1. 독성 검사(AST/ALT)

AST는 지오티 측정용 시액 (AM103-K, ASAN PHARM.CO.,LTD., Seoul, Korea), ALT는 지피티 측정용 시액 (AM102, ASAN PHARM.CO.,LTD., Seoul, Korea), 그리고 혈당에서 분리하여 채취한 plasma를 사용하여 측정하였다.

측정용 기질액을 e-tube에 각각 100 $\mu$ L 넣고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 5분간 반응시킨다. sample을 각각 20 $\mu$ L 넣고 vortex한 뒤 37 $^{\circ}$ C incubator에서 AST는 60분간, ALT는 30분간 반응시킨다. 정색시액 각각 100 $\mu$ L 넣고 vortex한 뒤 실온에서 20분간 반응시킨다. 0.4N NaOH 용액을 각각 1mL 넣고 vortex한 뒤 실온에서 10분간 반응시킨다. 반응시킨 용액을 96 well plate에 100 $\mu$ L

씩 분주한 뒤 spectrometer 기기로 505nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. AST와 ALT 농도는 각각의 표준 곡선용 시액을 사용하여 AST standard curve, ALT standard curve 추세선을 그려 계산하였다.

#### 4-2. 간 조직의 지질 추출 (Folch)

NaCl(0.9%)과 비즈를 넣고 간 조직을 분쇄하여 13,000rpm에서 20분간 원심분리한 뒤 조직을 제외하고 액체층 수거를 3번 반복한다. Chloroform과 Methanol을 2:1 비율로 섞어 제작한 folch solution을 추가한 뒤 vortex와 ice 보관을 5번 반복하여 진행한다. 3,000rpm에서 20분간 원심분리한 뒤 하층액을 새로운 conical tube에 동량 옮겨 담는다. 새로운 conical tube에 0.9% NaCl을 추가한 뒤 3,000rpm에서 20분간 원심분리한다. 가장 하층액만 새로운 e-tube에 옮겨 담은 후 질소가스를 이용하여 하층액을 기화시킨다. 기화시킨 튜브에 chloroform을 추가한 뒤 소분하여 sample로 사용한다. 해당 sample은 triglyceride, total cholesterol 측정에 사용하였다.

#### 4-3. 조직검사 (Hematoxylin & Eosin staining)

4% formaldehyde에 고정되어있는 간 조직을 육안 검사한 후 적당한 크기로 잘라내어 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 100% ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 50:50 xylene-ethanol, 100% xylene (Duksan General Science, Seoul, Korea) 용액으로 전처리한다. 전처리 후 paraffin (Leica biosystems, California, USA)에 담가 조직 사이에 paraffin을 침투시킨다. Paraffin dispenser (Leica biosystems, Nussloch, Germany)을 사용하여 paraffin 블록을 만들고 cold plate (Leica biosystems, Nussloch, Germany)를 사용하여 paraffin 블록을 굳힌다. 만들어진 블록은 rotary microtome (Leica biosystems, Nussloch, Germany)를 이용하여 6 $\mu$ m

의 두께로 박절하였다. 박절한 절편은 40°C water bath for paraffin sections (Leica biosystems, Nussoloc, Germany)에 띄웠다가 slide glass (MUTO PURE CHEMICALS CO.,LTD., Tokyo, Japan)에 부착시킨다. 절편을 부착한 slide glass는 hot plate (Leica biosystems, Nussoloch, Germany)에 올려 건조시킨다. 염색하기 전 paraffin 제거를 위해 100% xylene, 50:50 xylene-ethanol, 100% ethanol, 90% ethanol, 80% ethanol, 70% ethanol, tertiary distilled water에 순서대로 담가 deparaffin한다. Hematoxylin solution (03971, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)과 eosin (BBC Biochemical, McKinney, TX, USA)으로 염색을 진행한다. 흐르는 증류수로 수세하여 용액을 씻어낸 뒤 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 100% ethanol, 50:50 xylene-ethanol, 100% xylene에 차례로 담가 탈수한다. 탈수된 조직 절편 slide glass 위에 DPX Mountant (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 묻힌 cover glass (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany)로 덮어 말린다. Hematoxylin & Eosin staining이 진행된 slide glass는 fluorescence microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰 및 촬영하였다.

## 5. 조직 단백질 발현 (Western Blotting analysis)

조직에 lysis buffer (1M Tris, 5M NaCl, 0.1M EDTA, pH 7.4)와 protease inhibitor (GenDEPOT, Katy, TX, USA), phosphatase inhibitor (GenDEPOT, Katy, TX, USA)를 첨가하여 조직 분쇄기 (Next Advance, Averill Park, NY, USA)를 통해 분쇄하였다. 이후 4°C 원심분리기에서 13,000rpm으로 20분간 원심분리한 후, 상층액을 분리하였다. Bradford method로 단백질을 정량하였고, sample은 추출한 단백질에 lasemlli

sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 혼합하여 제조하였다. 8~15% SDS-PAGE gel을 제조하여 100V에서 30분, 120V에서 60분 전기영동 한 뒤, transer blot module (Biorad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 280mA에서 90분 동안 nitrocellulose membrane (GE healthcare, 10600003, USA)과 poly vinylidene fluoride membrane (GE healthcare, 10600023, USA)으로 단백질을 transfer하였다. Membrane은 1X tris-buffered saline with 0.1% tween-20 (TBST)에 녹인 3% BSA에서 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체는 3% BSA에 1:1,000으로 희석하여 membrane에 4°C에서 16시간 이상 반응시켰다. 이후 membrane을 1X TBST buffer로 10분간 3번 세척한 뒤, 2차 항체를 1:5,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 사용한 항체는 Table 2.에 제시하였다. 마지막으로 1X TBST buffer로 10분간 5번 세척 하였으며, ECL용액 (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에 4분간 반응시켰다. Chemidoc imaging system을 통해 감광하였으며, image lab software (Bio-rad, Laboratories, USA)를 이용하여 분석하였다.

**Table 2. 1<sup>st</sup> antibodies and 2<sup>nd</sup> antibodies used in western blotting analysis.**

1 <sup>st</sup> antibody	Company	Cat. #
TNF- $\alpha$	CST	3707
IL-6	CST*	8904
PPAR $\gamma$	santa cruz	sc-7273
C/EBP $\beta$	CST	3082
GAPDH	Enogene	E11-12057
Vinculin	CST	4650
Adiponectin	CST	2789
Leptin	Biologend	M1905E01
$\beta$ -actin	Enogene	E12-041
2 <sup>nd</sup> antibody	Company	Cat. #
anti-mouse	CellNest	CNG004-0005
anti-rabbit	CellNest	CNG005-0005

\* CST; Cell Signaling Technology

## 6. Statistical analysis

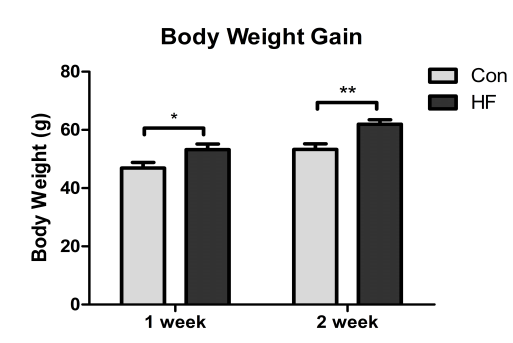
본 연구의 통계 처리는 최소 3 반복 이상 수행한 결과를 기반으로 Statistic Package for the Social Science software ver 26.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 통해 분석하였다. 모든 결과는 평균 (mean)  $\pm$  표준편차 (standard deviation, SD)로 나타내었다. Control군 (Con)과 High Fat군 (HF) 간의 차이는 독립표본 T 검정(independent two sample t-test)을 통해 유의성을 확인하였고, 모든 통계 분석은  $p < .05$  수준에서 유의성을 검증하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

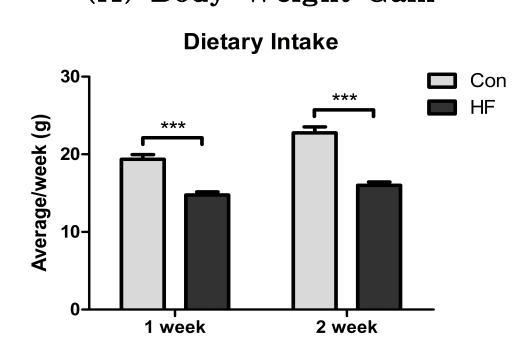
#### 1. 체중, 식이 섭취량 및 식이 효율

Con군과 HF군의 식이 섭취에 따른 체중 변화를 관찰하기 위해 체중, 식이 섭취량, 식이 효율을 측정하였다 (Table 3.). Con군에 비하여 2주간 HF 식이 섭취에 따른 체중은 유의적으로 증가한 반면 식이 섭취량은 감소하였다 (Fig 4-A.&B.). 따라서 식이 섭취량 대비 체중이 더 증가한 HF군이 Con군보다 유의적으로 더 높은 식이 효율을 보였다(Fig 4-C.).

Niepoetter et al.의 연구에 의하면 본 실험과 같은 60% 고지방식이를 먹인 쥐와 10% 지방을 함유한 식이를 먹인 쥐에서 60% 고지방 섭취한 쥐의 체중증가와 식이 섭취량 감소를 확인하였다.[70] 고지방식이에 의해 유도된 비만은 포만감 특성이나 칼로리 밀도, 흡수 후 처리 등과 같은 요인에 의해 고탄수화물 식이보다 더 많은 체중증가를 유도한다.[71] 고지방식이를 섭취할 때 칼로리 섭취와 대사 에너지 소비가 체중증가에 편향되어 있고 고지방 식이의 고열량 밀도가 체중증가에 주요한 역할을 한 것으로 보인다.[72]



(A) Body Weight Gain



(B) Dietary Intake



(C) Food Efficiency Ratio

Figure 4. Differences in body weight gain (A), dietary intake (B) and food efficiency ratio (C) in the HF and Con groups for 2 weeks. Data were assessed by independent sample t-test. (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ )

**Table 3. Weight gain, Dietary intake and Food Efficiency for 2 weeks-treatments with the HF and the Con diets.**

Group	Control		High Fat	<i>p</i> -value
	n=6		n=6	
<b>Body Weight(g)</b>	Initial	132.16±5.40	136.13±7.18	NS
	Final	232.41±13.75	251.27±13.10	0.035*
Body weight gain(g)		100.25±8.96	115.13±7.86	0.012*
<b>Dietary intake(g)</b>				
Average/1 week		19.37±1.45	14.76±0.97	0.000***
Average/2 week		22.75±1.90	16.02±1.00	0.000***
Total		42.13±3.26	30.77±3.26	0.000***
<b>Food Efficiency Ratio(%)<sup>+</sup></b>				
1 week FER		34.59±2.03	51.46±2.33	0.000***
2 week FER		39.11±2.37	64.50±2.77	0.000***

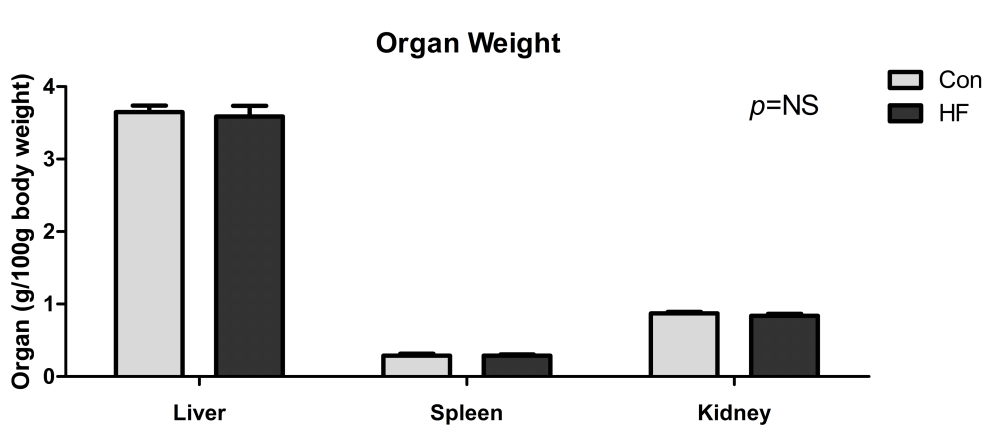
$$^+ \text{ Food Efficiency Ratio (\%)} = \frac{\text{Body weight (g)}}{\text{Food intake (g)}} \times 100$$

## 2. 조직 무게

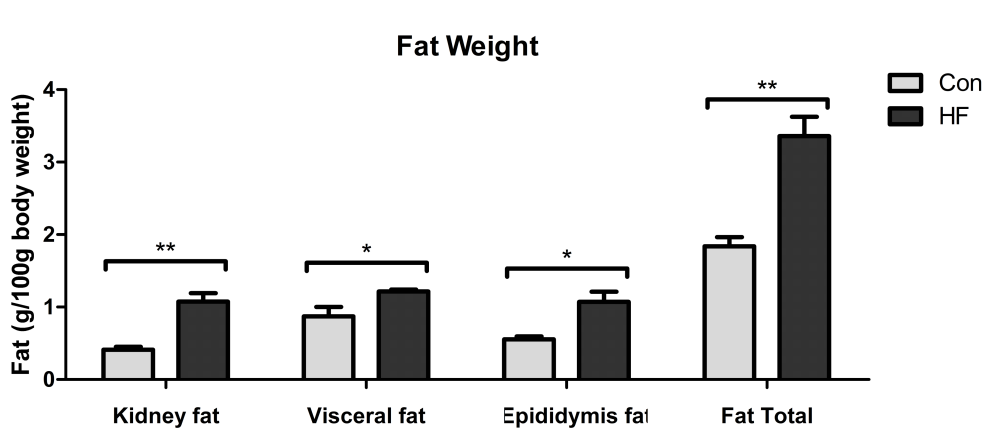
2주 단기간 60% 지방을 함유한 식이를 급식하였을 때 간, 비장, 신장의 두 군의 조직 무게의 변화는 Con군과 유의한 차이는 없었다 (Figure 5-A.). 2주간의 60% high fat 식이는 관련 기관의 비대에는 영향을 주지 않았으나 2주 이상의 급식일 경우 다를 수 있다.

Young-Mee Koh et al.의 연구와 Wan-Sup Sim et al.의 연구 결과를 보면 본 실험과 같은 60% 고지방식이를 먹인 쥐와 10% 지방을 함유한 식이를 6주간, 10주간 먹었을 때 kidney와 spleen의 무게에선 유의한 차이를 보이지 않았고 liver의 무게에서 유의한 차이를 보였다.[73][74]

반면 2주간의 60% high fat 식이는 신장지방, 내장지방, 부고환지방과 같은 지방 조직의 무게를 증가시켰다 (Figure 5-B.). 2주 단기간 60% 고지방식이 섭취가 liver의 무게 변화에 직접적으로 영향을 미치지 않았으나 모든 지방 조직의 무게를 유의적으로 증가시키기에 충분하였다.



(A) Organs



(B) Fat tissues

Figure 5. Changes of weights in several organs, such as liver, spleen, kidney and fat tissues (A & B), fed with the HF (60%E) diets for 2 weeks compared to the Con diets. Data were assessed by independent sample t-test. (\* $p<.05$ , \*\* $p<.01$ , \*\*\* $p<.001$ )

Table 4. Changes of weights in organs and fat tissues for 2 weeks diets with the HF and the Con.

Item	Group	Con	HF	<i>p</i> -value
		n=6	n=6	
<b>Organ (g/100g body weight)</b>				
Liver		3.65±0.23	3.59±0.36	NS
Spleen		0.29±0.06	0.29±0.04	NS
Kidney		0.87±0.04	0.83±0.06	NS
<b>Fat (g/100g body weight)</b>				
Kidney fat		0.41±0.10	1.07±0.29	0.002**
Visceral fat		0.87±0.32	1.22±0.06	0.045*
Epididymis fat		0.56±0.10	1.07±0.35	0.014*
Fat Total <sup>+</sup>		1.84±0.31	3.36±0.65	0.001**

<sup>+</sup>Total fat is the sum of kidney fat, epididymal fat, and visceral fat

### 3. 간 독성 검사

심장 채혈한 혈액에서 추출한 plasma를 이용하여 간 독성검사를 시행하였다. Con군이 HF군보다 높게 측정되었으나, ALT의 경우 두 군 간의 유의한 차이가 없고 AST, ALT 모두 정상범위 (<40IU/L) 이내로 측정되어 간 독성에 문제가 없다고 판단하였다.

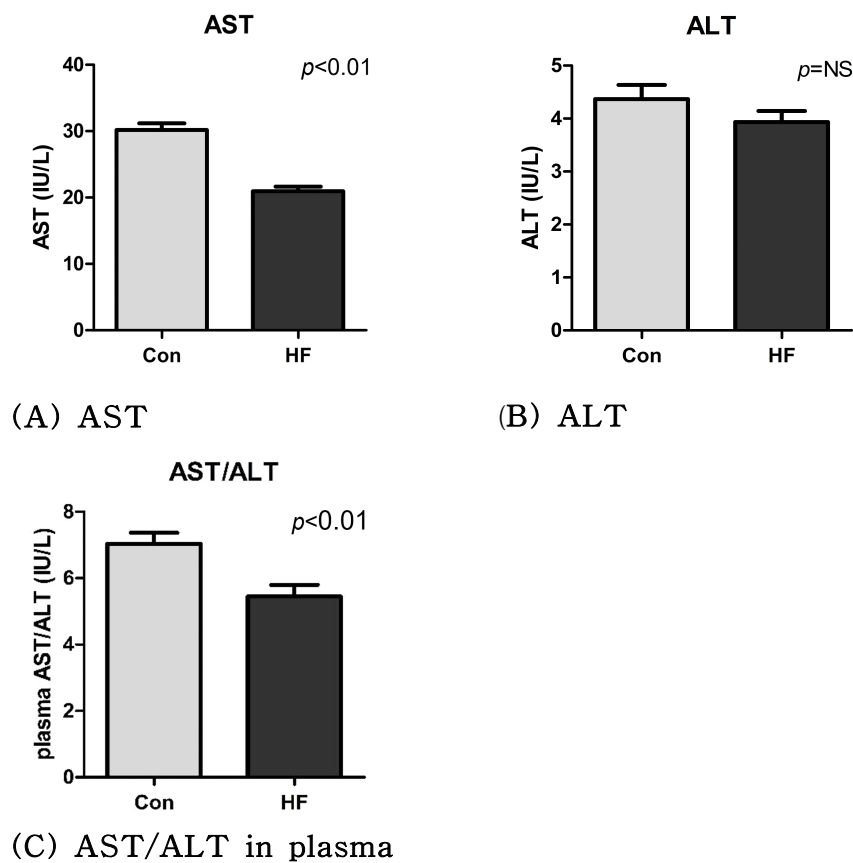


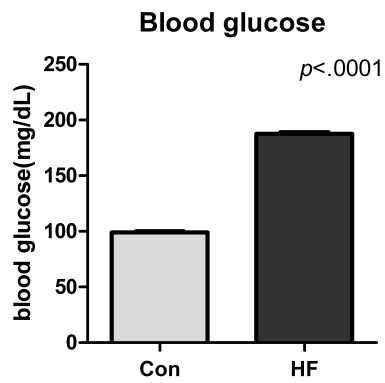
Figure 6. Changes of activities of plasma AST (A), ALT (B) and AST/ALT ratio (C) in 2 weeks-treatments with the HF (60% E) and Con diets. Data were assessed by independent sample t-test. (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ )

#### 4. Plasma에서의 혈당, 중성지방 및 총콜레스테롤 수치 측정

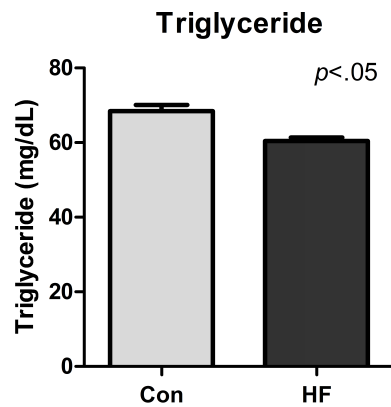
Plasma에서의 혈당, 중성지방 및 총콜레스테롤 수치를 측정하였다. HF군이 Con군에 비해 혈당의 수치가 유의적으로 높은 것을 확인하였으나 중성지방과 총콜레스테롤 수치는 HF군이 Con군에 비하여 낮았다.

Gauthier et al.의 연구에 의하면 42% 지방을 함유한 식이와 12% 지방 함유 식이를 대조하여 제공하였을 때 제공 6주 차까지 두 군의 plasma TAG 수치가 유의한 차이는 없었으며 2주 차에는 12% 지방 함유 식이 섭취 군의 plasma TAG 수치가 더 높았다.[75] 해당 연구는 본 연구보다 지방 함량이 적은 42% 지방을 함유한 식이를 제공하였으나, 6주 차까지 유의한 차이가 없었으며, 본 연구는 더 높은 60% 지방 함량 식이였으나 단기 2주 제공으로 두 군 간의 큰 차이가 없었다.

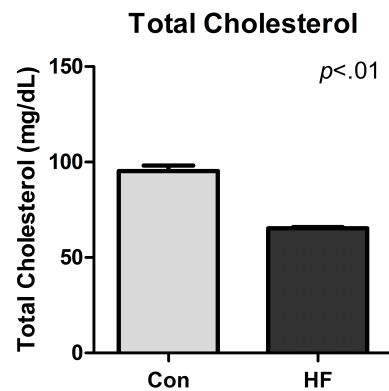
이는 혈중 지질이 간에서 축적되었거나, HF의 투여 기간이 짧아 간의 지질이 혈액으로 분비되지 못한 상태일 것으로 사료된다. 1차적으로 간의 중성지방과 콜레스테롤 농도를 분석하여 전자의 경우를 증명하고 불가할 경우 간의 아포지단백질 (apolipoprotein) 합성과정을 분석하여 후자의 경우를 확인하기로 하였다.



(A) Blood glucose



(B) Triglyceride



(C) Total Cholesterol

Figure 7. Changes of plasma blood glucose (A), triglyceride (B) and total Cholesterol (C) in 2 weeks-treatments with the HF (60% E) and Con diets. Data were assessed by independent sample t-test. (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ )

## 5. 간 조직에서의 중성지방 및 총콜레스테롤 수치 측정

간에서의 지방축적 정도를 확인하기 위하여 중성지방 및 총콜레스테롤 수치를 측정하였다. Folch 지질 추출법을 이용하여 간에서 지질을 추출한 후 효소를 이용하여 각 수치를 측정하였다.

추출한 지질을 이용하여 총콜레스테롤 측정 결과, HF군이 조금 더 높은 수준을 보였지만 유의한 차이는 없었다. 중성지방 수치 측정 결과, HF군이 Con군보다 4.13배 높은 유의미한 차이를 보여 지방간의 상태를 확인하였다.

비만과 같은 에너지 과잉 상태에서는 중성지방이 간세포 내 축적과 합성이 증가한다. 이것은 말초 지방의 지방 분해가 증가하고 간세포 내에서 새로운 지방생성이 증가한 결과이다.[76] 지방 조직 내에서 지단백 리파아제는 간에서 유래된 중성지방을 가수분해하여 유리지방산을 방출하고 지방세포로 운반한 뒤, 지방세포의 DGAT는 중성지방을 재생하기 위해 이들 지방산의 에스테르화를 촉매한다. 간세포 내 중성지방이 축적되는 것은 NAFLD의 특징 중 하나이고, 본 연구에서는 유의적인 중성지방 수치를 확인하였다.[77]

높은 혈당이 간에서 중성지방을 축적하여 높은 중성지방 수치 차이를 나타내고 혈중 지질을 증가시키지 않은 것을 Figure 7.의 결과로 나타냈다. 그러나 간의 총콜레스테롤 수치는 변화가 없는 것으로 보아 혈액으로부터 유입된 포도당이 간 내 콜레스테롤 생합성의 필수 자원인 acetyl-CoA를 제공하지는 않는 것으로 나타났다.[78]

Table 5. Triglyceride and total cholesterol concentration in liver fed HF and Con diets for 2 weeks.

	Control n=6	High Fat n=6	<i>p</i> -value
Hepatic TG(mg/g)	2.10±0.65	8.68±2.46	0.000***
Hepatic TC(mg/g)	5.17±0.66	5.54±0.88	NS(0.302)

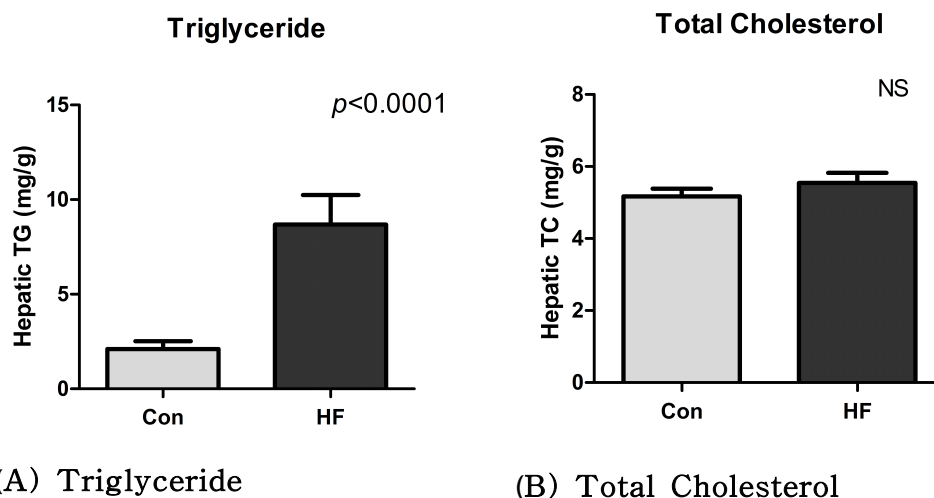
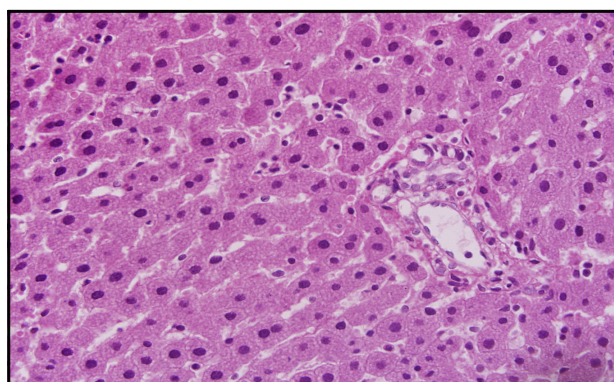


Figure 8. Triglyceride (A) and total cholesterol (B) concentrations in liver tissues for 2 weeks diet with the HF (60%E fat) and the Con (9%E fat). Data were assessed by independent sample t-test. (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ )

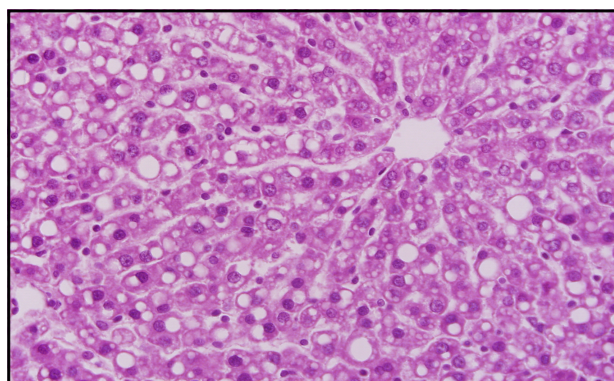
## 6. 간 조직에서의 지방 형성

간 조직에서 지방의 형성을 확인하기 위해 조직검사를 시행하였다. 절단한 간 조직의 단면을 염색하여 현미경으로 관찰한 결과를 다음에 제시하였다 (Figure 9).

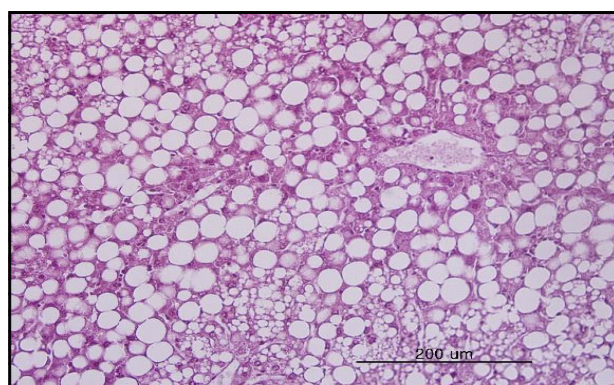
지방 함량 9%의 식이를 먹인 Con군의 간 조직 단면에서는 지방의 형성이 관찰되지 않았다. 60% 지방 함량 식이를 먹인 HF군의 간 조직 단면에서는 간 결절 및 작은 크기의 지방이 다발적으로 형성되는 모습이 관찰되었다. 과거 15주간 60% 고지방식이를 제공한 mice를 사육 후 4% formaldehyde에 보관해둔 간 조직으로 진행한 조직검사 단면을 Figure 9-C로 제시하였다. 60% 고지방식이를 단기 2주간 급식한 rat의 간 조직의 경우 장기 15주간 지급한 mice의 간 조직보다 형성된 지방의 크기가 작아 장기간 고지방식이 제공에 비하여 받는 영향은 작은 것을 확인하였다. 그러나 단기 2주 60% 고지방식이 제공만으로도 간의 결절 및 지방의 형성에는 충분한 결과를 보였다.



(A) Control diet feeding



(B) HF feeding for 2 weeks



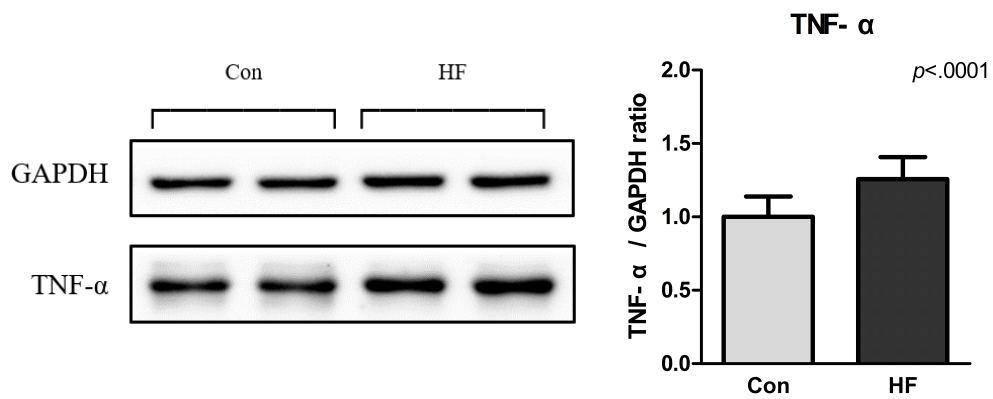
(C) HF feeding for 15 weeks

Figure 9. Comparison of H&E staining to find fat accumulation in liver tissues fed the Con (A), the HF for 2 weeks (B) and the HF for 15 weeks (C). The C sample came from our pre-experiments of longer treatment (15 weeks) with high fat (60%) diets to compare B sample. The scale of the picture is 20X.

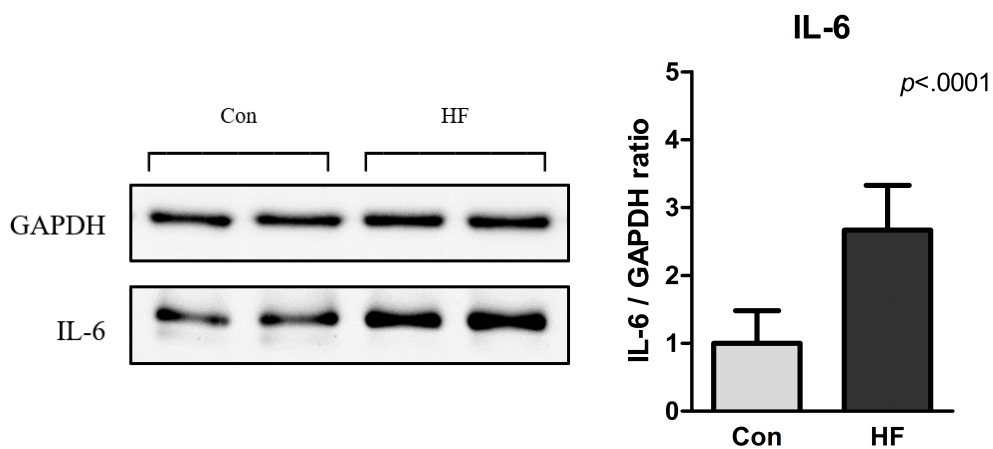
## 7. 간 조직의 염증성 사이토카인 (Inflammatory Cytokine) 반응

고지방식이에 따른 간 조직의 염증 반응을 확인하기 위하여 간에서 protein을 추출하여 관련 염증 유도 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)으로 알려져있는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 발현 정도를 확인하였다. Con군에 비하여 HF군에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 가 모두 과발현되는 것을 확인하였다. 면역반응 초기에 분비되어 세포 괴사 조절과 염증 활성화에 관여하는 인자인 TNF- $\alpha$ 는 HF군에서 Con군보다 2.66배 증가하였다.[79] 감염이나 조직 손상에 반응하여 신속하고 일시적으로 생성되는 IL-6는 HF군에서 Con군보다 1.25배 증가하였다.[80]

TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 급성 염증의 주요 조절자로 작용하는 다기능 사이토카인이며, 염증 상태에서 발현되고 비만 관련 염증성 질환에서 이들이 증가한다.[81][82] KA Kim et al.의 연구에서 본 연구와 같은 60% 지방 함유 식이를 8주간 제공하였을 때, 10% 지방 함유 식이를 제공한 군보다 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 지방 조직에서의 과발현을 확인하였고, 본 연구에서 단기 2주간 제공으로도 IL-6와 TNF- $\alpha$ 으로 HF군의 유의적인 염증 반응을 확인하였다.[83]



(A) TNF- $\alpha$  expression.



(B) IL-6 expression

Figure 10. Production of proinflammatory cytokines in liver tissues, such as TNF- $\alpha$  and IL-6 in 2 weeks-treatments with the HF and Con diets. Data were assessed by independent sample t-test. ( $*p < .05$ ,  $**p < .01$ ,  $***p < .001$ )

## 8. 지방 조직에서의 Adipogenesis 유전자 발현

지방세포 내 분화를 확인하기 위하여 epi fat에서 추출한 protein으로 western blotting을 수행하였다. 지방세포 분화 마커로 알려져있는 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\beta$ 의 발현 정도를 확인하였다.

Con군에 비하여 HF군에서의 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\beta$ 의 발현은 각각 1.36배, 1.25배 증가한 것을 확인함으로써 2주간의 지방 섭취로 충분히 adipogenesis 유전자가 발현되었음을 알 수 있었다.

지방세포 분화와 지질 저장의 주요 조절자 역할을 하는 PPAR- $\gamma$ 는 HF군에서 Con군보다 1.36배 더 발현된 것을 확인하였다.[84]

S.Y. Lee의 연구에서 본 연구와 같은 60% 지방 함유 식이와 12% 지방 함유 식이를 15주간 제공하였을 때 본 연구 결과와 같이 60% 지방 함유 식이를 제공한 군에서 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 가 과발현되는 양상을 확인하였다.[1] 본 연구는 지방세포 분화 초기에 insulin이나 dexamethasone, cAMP 등에 의해 일시적이고 빠르게 발현되는 C/EBP $\beta$ 의 발현을 확인하였고, 60% 지방 함유 식이를 단기 2주의 제공으로도 지방세포 분화를 조절하는 주요 전사 인자인 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\beta$ 가 발현된다는 것을 확인하였다.[85]

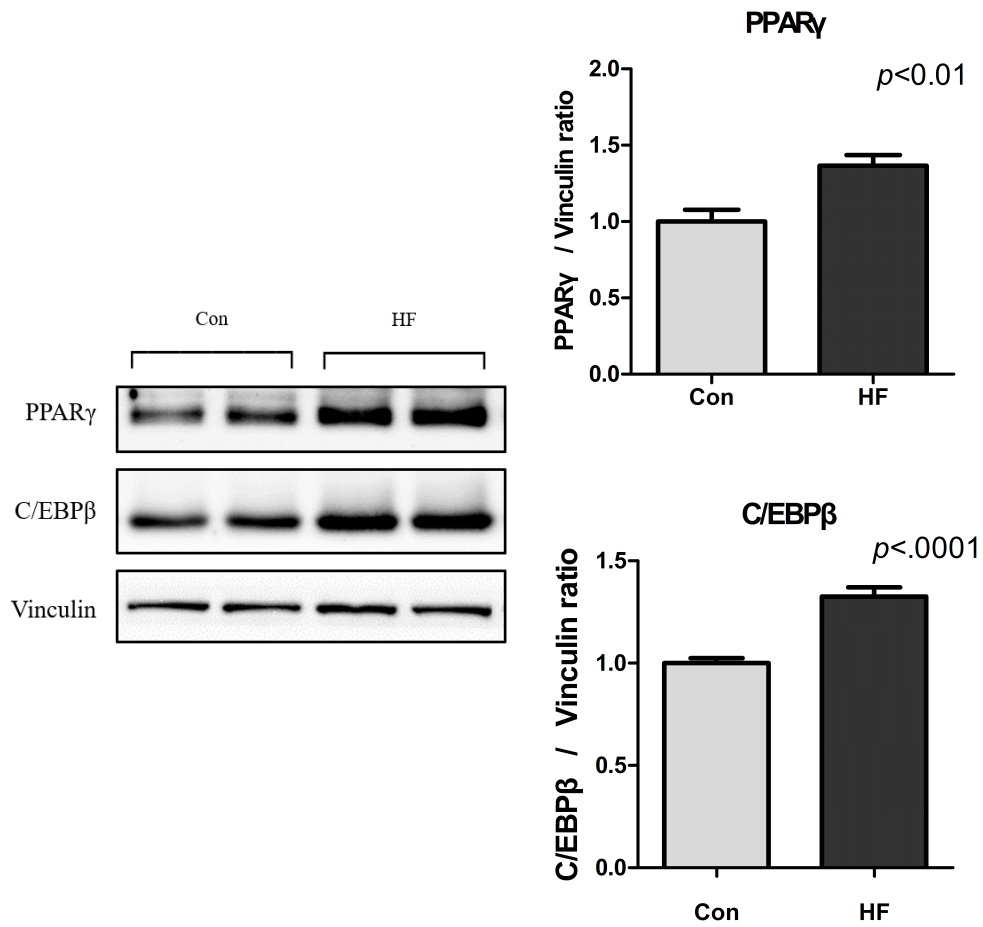


Figure 11. Expression of adipogenesis biomarkers in epi fat such as PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$  fed HF & Con diets for 2 weeks. Data were assessed by independent sample t-test. ( $*p < .05$ ,  $**p < .01$ ,  $***p < .001$ )

## 9. 지방조직에서의 아디포카인(Adipokine) 반응

감염이나 전신 염증에 대한 반응으로 지방조직의 염증 반응을 조절하는데 중요한 역할을 하는 adipokine의 생성을 확인하기 위하여 epi fat에서 추출한 protein으로 western blotting을 수행하였다.[86]

항염증성 인자인 adiponectin이 Con군 대비 HF군에서 약 1.5배 유의적으로 낮은 것을 확인하였다 (Figure 12-A.). Adiponectin의 수치는 비만에서 감소하고 간 지방증 또는 NASH 환자에서 훨씬 더 낮은 경향을 보이며, 낮은 adiponectin 수치는 NASH의 특징이다.[51][87] Leptin과 TNF- $\alpha$ 와 같은 adipokine과 달리 adiponectin은 NAFLD와 NASH의 원인에 더 관련되어 있으며 단순 지방증에서 NASH로 진행되는 NAFLD가 진행동안 adiponectin의 발현은 20~40% 감소한다. 또한 adiponectin의 수치가 낮은 NASH 환자는 염증 수준이 더 높고, 이는 adiponectin의 결핍이 지방간, 지방간염 등 간 손상 발생에 중요한 위험 요소임을 확인할 수 있다.[88]

Leptin의 발현 확인 결과, HF군 대비 Con군에서 유의하게 발현되었다 (Figure 12-B.). 대부분 비만한 대상자는 leptin 유전자가 결핍되지 않고 순환하는 leptin의 수치가 비만하지 않은 대상에 비하여 증가한다. Figure 12-B.와 같이 결과가 나온 이유는 2주간의 HF 투여로는 leptin의 발현이 부족하며 leptin 저항성을 보이는 것으로 사료된다.

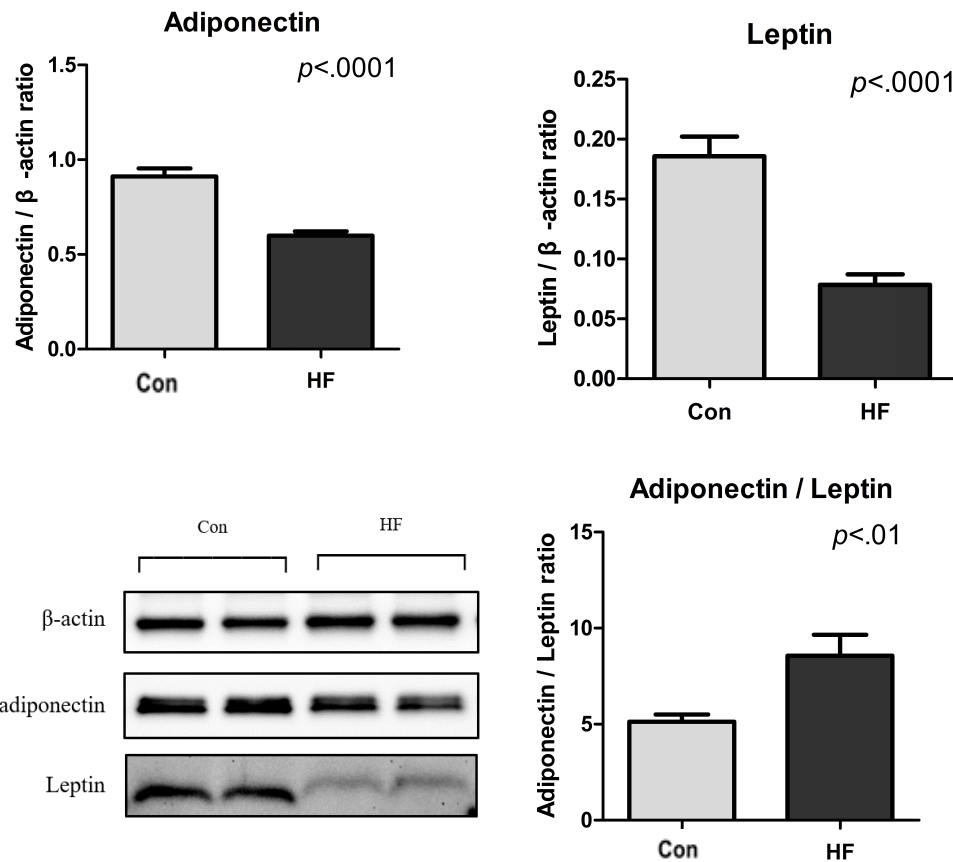


Figure 12. Expression of inflammatory (leptin) and anti-inflammatory cytokines (adiponectin) and their ratio in fat tissues in 2 weeks diet treatments with the HF and Con diets. Data were assessed by independent sample t-test. ( $*p < .05$ ,  $**p < .01$ ,  $***p < .001$ )

## IV. 요약 및 결론

비만을 유도하는 high fat diet-induced obesity (DIO) 모델 디자인은 항비만 약물 및 기능성 식품개발에 널리 사용하고 있다. 그러나 fat % (45~60%)와 투여기간 (4~12주)에 따라 간 독성 등 부작용 문제 등이 비만 연구의 장애가 되고 있다. 본 연구의 목적은 60% 고지방식이를 단기간 (2주) 투여하여 다양한 조직에서의 손상 정도, 염증지표 및 지방생성 및 인슐린/렙틴 저항성 등을 조사하여 연구목적에 따른 DIO 모델의 활용성을 다양화하는데 기여하고자 한다.

대조군 (Con; chow diet; 9% fat) 대비 2주간 투여한 HF군 (60% fat)에서 간독성 (AST, ALT) 및 기관무게 (간, 비장, 신장)의 차이는 없으며 체중과 식이효율, 혈당, 지방조직 (신장, 내장지방, 부고환)무게, 간 조직의 지방합성 단백질 발현 (PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP $\beta$ ), 염증유도 사이토카인 (TNF- $\alpha$ , IL-6) 등이 유의적으로 증가하였다. Con군 대비 HF군에서 혈중 중성지방과 콜레스테롤은 감소하였으나 간에서 중성지방의 축적을 확인하였다. H&E 염색기반 지방 조직의 변화로 HF군의 간 조직에서 결절과 지질의 축적 및 생성되는 변화를 확인하여 지방간이 형성됨을 확인하였다. 반면 Con 대비 HF군의 지방 조직에서 분비되는 사이토카인으로 식이조절에 관여하는 비만유전자 leptin과 항비만 사이토카인인 adiponectin이 동시에 감소하였다.

60% 고지방식이 2주간 투여한 DIO 모델은 간 조직의 지방합성 및 염증성 지방간 형성 연구에는 적절하여 비만을 기반으로 하는 NAFLD 및 NASH 등과 연계된 식품 및 약물 개발 등에 본 연구모델은 동물윤리를 준수하면서 경제적이고 효율적이라고 생각한다. 단, 조직 간 지질대사 항상성

을 확인하는 사이토카인 기전 등을 확인하기에는 투여 기간이 부족하여 향후 목적에 따른 비만연구 모델을 위한 식이 지방 비율과 투여 기간과 관련된 연구가 필요하다고 생각한다.

## 참 고 문 헌

- [1] Lee, S., & Lee, M. (2021). MEK6 Overexpression Exacerbates Fat Accumulation and Inflammatory Cytokines in High-Fat Diet-Induced Obesity. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13559.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222413559>
- [2] World Health Organization. (2021, June 9). Overweight and obesity. World Health Organization;  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- [3] KOSIS(질병관리청, 국민건강영양조사), 참조일자 2022년 10월 31일,  
[https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=177&tblId=DT\\_11702\\_N101&conn\\_path=I2](https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=177&tblId=DT_11702_N101&conn_path=I2)
- [4] 서영성. (2002). 고려해야 할 비만의 원인. *생물치료정신의학*, 8(2), 218-224.
- [5] 강재현. (2008). 일반부인과학 : 비만과 관련된 내분비질환. *대한산부인과학회 연수강좌*, 39(0), 133-135.
- [6] Martins, T., Ferreira, T., Nascimento-Gonçalves, E., Castro-Ribeiro, C., Lemos, S., Rosa, E., ... & Oliveira, P. A. (2022). Obesity Rodent Models Applied to Research with Food Products and Natural Compounds. *Obesities*, 2(2), 171-204.

- [7] Kumanyika, S., Jeffery, R. W., Morabia, A., Ritenbaugh, C., Antipatis, V. J., & Public Health Approaches to the Prevention of Obesity (PHAPO) Working Group of the International Obesity Task Force (IOTF) (2002). Obesity prevention: the case for action. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(3), 425 - 436. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801938>
- [8] Bray, G. A., Kim, K. K., Wilding, J. P. H., & World Obesity Federation (2017). Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18(7), 715 - 723. <https://doi.org/10.1111/obr.12551>
- [9] Rector, R. S., Thyfault, J. P., Wei, Y., & Ibdah, J. A. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World journal of gastroenterology*, 14(2), 185 - 192. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.185>
- [10] Chaput, J. P., Doucet, E., & Tremblay, A. (2012). Obesity: a disease or a biological adaptation? An update. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 13(8), 681 - 691. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.00992.x>
- [11] Byung-Soo Lee, 김지수, 김세연, 변민지, 이정하, 김진범. (2019).

대사증후군 요소와 치주염의 관련성: 35-79세 한국인. 대한구강보건학회지, 43(3), 142-148.

[12] Bosello, O., & Zamboni, M. (2000). Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 1(1), 47 - 56.

<https://doi.org/10.1046/j.1467-789x.2000.00008.x>

[13] Seidelmann, S. B., Claggett, B., Cheng, S., Henglin, M., Shah, A., Steffen, L. M., Folsom, A. R., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Solomon, S. D. (2018). Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *The Lancet. Public health*, 3(9), e419 - e428.

[https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30135-X](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30135-X)

[14] Weiss, R., & Caprio, S. (2005). The metabolic consequences of childhood obesity. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 19(3), 405 - 419. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.04.009>

[15] Anderson, J. W., & Konz, E. C. (2001). Obesity and disease management: effects of weight loss on comorbid conditions. *Obesity research*, 9 Suppl 4, 326S - 334S. <https://doi.org/10.1038/oby.2001.138>

[16] Sarma, S., Sockalingam, S., & Dash, S. (2021). Obesity as a multisystem disease: Trends in obesity rates and obesity-related complications. *Diabetes, obesity & metabolism*, 23 Suppl 1, 3 - 16.

<https://doi.org/10.1111/dom.14290>

[17] KOSIS(질병관리청, 국민건강영양조사), 참조일자 2022년 12월 01일,  
[https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=177&tblId=DT\\_11702\\_N105&vw\\_cd=MT\\_ZTITLE&list\\_id=117\\_11702\\_B01\\_002&seqNo=&lang\\_mode=ko&language=kor&obj\\_var\\_id=&itm\\_id=&conn\\_path=MT\\_ZTITLE](https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=177&tblId=DT_11702_N105&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=117_11702_B01_002&seqNo=&lang_mode=ko&language=kor&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE)

[18] Scheen A. J. (2003). Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta clinica Belgica*, 58(6), 335 - 341. <https://doi.org/10.1179/acb.2003.58.6.001>

[19] 원규장. (2022). Diabetes Fact Sheet in Korea 2022. 대한당뇨병학회.

[20] 이은주. (2011). 한국인 고혈압 환자의 소금 민감성 특성과 DASH 다이어트의 효과 (국내박사학위논문). 가톨릭대학교 대학원, 경기도.

[21] Cambien, F., Chretien, J. M., Ducimetiere, P., Guize, L., & Richard, J. L. (1985). Is the relationship between blood pressure and cardiovascular risk dependent on body mass index?. *American journal of epidemiology*, 122(3), 434 - 442.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114124>

[22] Subramanian, S., & Chait, A. (2012). Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochimica et biophysica acta*, 1821(5), 819 - 825.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbali.2011.10.003>

- [23] Jung, M. K., & Yoo, E. G. (2018). Hypertriglyceridemia in Obese Children and Adolescents. *Journal of obesity & metabolic syndrome*, 27(3), 143 - 149. <https://doi.org/10.7570/jomes.2018.27.3.143>
- [24] 한국지질·동맥경화학회. (2022). Korean Guidelines for the Management of Dyslipidemia (the 5th edition). 한국지질·동맥경화학회
- [25] Mitra, S., De, A., & Chowdhury, A. (2020). Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Translational gastroenterology and hepatology*, 5, 16. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.09.08>
- [26] Rehm, J., Samokhvalov, A. V., & Shield, K. D. (2013). Global burden of alcoholic liver diseases. *Journal of hepatology*, 59(1), 160 - 168. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.007>
- [27] 절주ON(보건복지부, 한국건강증진개발원), 참조일자 2023년 01월 05일, <https://www.khepi.or.kr/board/view?linkId=24811&menuId=MENU00645>
- [28] Mann, R. E., Smart, R. G., & Govoni, R. (2003). The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 27(3), 209 - 219.
- [29] Chang, Y., Ryu, S., Sung, E., & Jang, Y. (2007). . *Clinical chemistry*, 53(4), 686 - 692. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.081257>

- [30] Abenavoli, L., Milic, N., Di Renzo, L., Preveden, T., Medić-Stojanoska, M., & De Lorenzo, A. (2016). Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*, 22(31), 7006 - 7016.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7006>
- [31] Chang, Y., Ryu, S., Sung, E., & Jang, Y. (2007). Higher concentrations of alanine aminotransferase within the reference interval predict nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical chemistry*, 53(4), 686 - 692. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.081257>
- [32] Lian, C. Y., Zhai, Z. Z., Li, Z. F., & Wang, L. (2020). High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chemico-biological interactions*, 330, 109199.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109199>
- [33] Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1343 - 1351.  
<https://doi.org/10.1172/JCI23621>
- [34] 대한간학회. (2021), 2021 대한간학회 비알코올 지방간질환 진료 가이드라인, 참조일자 2022년 12월 01일,

<https://www.kasl.org/bbs/index.html?code=guide&category=&gubun=&idx=&page=1&number=4630&mode=view&order=&sort=&keyfield=&key=>

[35] Balak, D. M. W., Piaserico, S., & Kasujee, I. (2021). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Patients with Psoriasis: A Review of the Hepatic Effects of Systemic Therapies. *Psoriasis (Auckland, N.Z.)*, 11, 151 - 168. <https://doi.org/10.2147/PTT.S342911>

[36] Younossi, Z. M., Otgonsuren, M., Henry, L., Venkatesan, C., Mishra, A., Erario, M., & Hunt, S. (2015). Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62(6), 1723 - 1730. <https://doi.org/10.1002/hep.28123>

[37] Younossi Z. M. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *Journal of hepatology*, 70(3), 531 - 544. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.033>

[38] Non-alcoholic Fatty Liver Disease Study Group, Lonardo, A., Bellentani, S., Argo, C. K., Ballestri, S., Byrne, C. D., Caldwell, S. H., Cortez-Pinto, H., Grieco, A., Machado, M. V., Miele, L., & Targher, G. (2015). Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 47(12), 997 - 1006.

<https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.08.004>

[39] Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 64(1), 73 - 84.  
<https://doi.org/10.1002/hep.28431>

[40] Kotronen, A., Westerbacka, J., Bergholm, R., Pietiläinen, K. H., & Yki-Järvinen, H. (2007). Liver fat in the metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(9), 3490 - 3497.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-0482>

[41] Vilar Gomez, E., Rodriguez De Miranda, A., Gra Oramas, B., Arus Soler, E., Llanio Navarro, R., Calzadilla Bertot, L., Yasells Garcia, A., & Del Rosario Abreu Vazquez, M. (2009). Clinical trial: a nutritional supplement Viusid, in combination with diet and exercise, in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 30(10), 999 - 1009.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2009.04122.x>

[42] El-Agroudy, N. N., Kurzbach, A., Rodionov, R. N., O'Sullivan, J., Roden, M., Birkenfeld, A. L., & Pesta, D. H. (2019). Are Lifestyle Therapies Effective for NAFLD Treatment?. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 30(10), 701 - 709.

<https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.013>

[43] Sjödin, A., Hellström, F., Sehlstedt, E., Svensson, M., & Burén, J. (2020). Effects of a Ketogenic Diet on Muscle Fatigue in Healthy, Young, Normal-Weight Women: A Randomized Controlled Feeding Trial. *Nutrients*, 12(4), 955. <https://doi.org/10.3390/nu12040955>

[44] Sinha, S. R., & Kossoff, E. H. (2005). The ketogenic diet. *The neurologist*, 11(3), 161 - 170.

<https://doi.org/10.1097/01.nrl.0000160818.58821.d2>

[45] Masino, S. A., & Rho, J. M. (2012). Mechanisms of Ketogenic Diet Action. In J. L. Noebels (Eds.) et. al., *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. (4th ed.). National Center for Biotechnology Information (US).

[46] Zinn, C., Lenferna De La Motte, K. A., Rush, A., & Johnson, R. (2022). Assessing the Nutrient Status of Low Carbohydrate, High-Fat (LCHF) Meal Plans in Children: A Hypothetical Case Study Design. *Nutrients*, 14(8), 1598. <https://doi.org/10.3390/nu14081598>

[47] Samaha, F. F., Iqbal, N., Seshadri, P., Chicano, K. L., Daily, D. A., McGrory, J., Williams, T., Williams, M., Gracely, E. J., & Stern, L. (2003). A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *The New England journal of medicine*, 348(21), 2074 - 2081.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa022637>

[48] Hall, K. D., & Chung, S. T. (2018). Low-carbohydrate diets for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 21(4), 308 - 312.

<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000470>

[49] Sacks, F. M., Bray, G. A., Carey, V. J., Smith, S. R., Ryan, D. H., Anton, S. D., McManus, K., Champagne, C. M., Bishop, L. M., Laranjo, N., Leboff, M. S., Rood, J. C., de Jonge, L., Greenway, F. L., Loria, C. M., Obarzanek, E., & Williamson, D. A. (2009). Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *The New England journal of medicine*, 360(9), 859 - 873.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804748>

[50] Asrih, M., & Jornayvaz, F. R. (2014). Diets and nonalcoholic fatty liver disease: the good and the bad. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 33(2), 186 - 190. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.11.003>

[51] Buechler, C., Wanninger, J., & Neumeier, M. (2011). Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World journal of gastroenterology*, 17(23), 2801 - 2811. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i23.2801>

[52] Goossens G. H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior*, 94(2), 206 - 218. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.10.010>

[53] Buechler, C., Wanninger, J., & Neumeier, M. (2011). Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. World journal of gastroenterology, 17(23), 2801 - 2811. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i23.2801>

[54] Angulo P. (2006). NAFLD, obesity, and bariatric surgery. Gastroenterology, 130(6), 1848 - 1852. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.03.041>

[55] Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2005). Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. Biochemical Society transactions, 33(Pt 5), 1078 - 1081. <https://doi.org/10.1042/BST0331078>

[56] Ahima, R. S., Saper, C. B., Flier, J. S., & Elmquist, J. K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. Frontiers in neuroendocrinology, 21(3), 263 - 307. <https://doi.org/10.1006/frne.2000.0197>

[57] Schäffler, A., Schölmerich, J., & Büchler, C. (2005). Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology, 2(2), 103 - 111. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0090>

[58] Ouchi, N., & Walsh, K. (2007). Adiponectin as an anti-inflammatory factor. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry,

380(1-2), 24 - 30. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.01.026>

[59] Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A. J., Gojobori, T., & Isenovic, E. R. (2021). Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in endocrinology*, 12, 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>

[60] Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(4), 798 - 808. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>

[61] Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., & Bauer, T. L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine*, 334(5), 292 - 295. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>

[62] Antuna-Puente, B., Fève, B., Fellahi, S., & Bastard, J. P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & metabolism*, 34(1), 2 - 11. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2007.09.004>

[63] Iikuni, N., Lam, Q. L., Lu, L., Matarese, G., & La Cava, A. (2008). Leptin and Inflammation. *Current immunology reviews*, 4(2), 70 - 79.

<https://doi.org/10.2174/157339508784325046>

[64] Giannessi, D., Maltinti, M., & Del Ry, S. (2007). Adiponectin circulating levels: a new emerging biomarker of cardiovascular risk. *Pharmacological research*, 56(6), 459 - 467.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.09.014>

[65] Fang, H., & Judd, R. L. (2018). Adiponectin Regulation and Function. *Comprehensive Physiology*, 8(3), 1031 - 1063.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>

[66] Ursavas, A., Ilcol, Y. O., Nalci, N., Karadag, M., & Ege, E. (2010). Ghrelin, leptin, adiponectin, and resistin levels in sleep apnea syndrome: Role of obesity. *Annals of thoracic medicine*, 5(3), 161 - 165.  
<https://doi.org/10.4103/1817-1737.65050>

[67] Forny-Germano, L., De Felice, F. G., & Vieira, M. N. D. N. (2019). The Role of Leptin and Adiponectin in Obesity-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 12, 1027.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01027>

[68] Abenavoli, L., & Peta, V. (2014). Role of adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Reviews on recent clinical trials*, 9(3), 134 - 140. <https://doi.org/10.2174/1574887109666141216102458>

[69] Lim, S., Quon, M. J., & Koh, K. K. (2014). Modulation of

adiponectin as a potential therapeutic strategy. *Atherosclerosis*, 233(2), 721 - 728. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.051>

[70] Niepoetter, P. A., Medavaka, S., Ogle, A., Daughrity, S., Hackmann, E., & Gopalan, C. (2022). Comparison of Intermittent Fasting and Voluntary Wheel Running on Mental and Physical Fatigue in High Fat induced Obese and Non obese Rats. *The FASEB Journal*, 36

[71] Astrup A. (2005). The role of dietary fat in obesity. *Seminars in vascular medicine*, 5(1), 40 - 47. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871740>

[72] Warwick, Z. S., & Schiffman, S. S. (1992). Role of dietary fat in calorie intake and weight gain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 16(4), 585 - 596. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80198-8](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80198-8)

[73] Koh, Y. M., Jang, S. W., & Ahn, T. W. (2019). Anti-obesity effect of Yangkyuksanwha-tang in high-fat diet-induced obese mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 246. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2669-3>

[74] Sim, W. S., Choi, S. I., Cho, B. Y., Choi, S. H., Han, X., Cho, H. D., Kim, S. H., Lee, B. Y., Kang, I. J., Cho, J. H., & Lee, O. H. (2019). Anti-Obesity Effect of Extract from *Nelumbo Nucifera* L., *Morus Alba* L., and *Raphanus Sativus* Mixture in 3T3-L1 Adipocytes and C57BL/6J Obese Mice. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(5), 170.

<https://doi.org/10.3390/foods8050170>

[75] Gauthier, MS, Favier, R., & Lavoie, JM (2006). 쥐의 고지방식이 유도 비만에 대한 비알코올성 간 지방증 발병의 시간 경과. *The British Journal of Nutrition* , 95 (2), 273 - 281. <https://doi.org/10.1079/bjn20051635>

[76] Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 1 - 8.

<https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>

[77] Choi, S. S., & Diehl, A. M. (2008). Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Current opinion in lipidology*, 19(3), 295 - 300. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282ff5e55>

[78] Cerqueira, N. M., Oliveira, E. F., Gesto, D. S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H. N., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2016). Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry*, 55(39), 5483 - 5506. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00342>

[79] 배수미, 김지은, 배은영, 김경아, & 이선영. (2019). 염증유도 RAW264.7 세포와 동물모델에서 구기자과 구기엽의 항염 효능. *Journal of Nutrition and Health*, 52(2), 129-138.

[80] Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in*

biology, 6(10), a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>

[81] Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., David, M., Fabra, R., Trullenque, R., & Heinrich, P. C. (1990). Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 12(5), 1179 - 1186. <https://doi.org/10.1002/hep.1840120517>

[82] R. Raskin Erusan, D. Nalini, G. Manohar and R. Malathi, "Correlation between Obesity and Inflammation in Cardiovascular Diseases – Evaluation of Leptin and Inflammatory Cytokines," *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, Vol. 2 No. 2, 2012, pp. 7-15. <http://doi.org/10.4236/ojemd.2012.22002>.

[83] Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H., & Kim, D. H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PloS one*, 7(10), e47713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>

[84] Yu, S., Matsusue, K., Kashireddy, P., Cao, W. Q., Yeldandi, V., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., Gonzalez, F. J., & Reddy, J. K. (2003). Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *The Journal of biological chemistry*, 278(1), 498 - 505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210062200>

[85] Freytag, S. O., Paielli, D. L., & Gilbert, J. D. (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes & development*, 8(14), 1654 - 1663. <https://doi.org/10.1101/gad.8.14.1654>

[86] Mancuso P. (2016). The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and therapy*, 5, 47 - 56. <https://doi.org/10.2147/ITT.S73223>

[87] Kowdley, K. V., & Pratt, D. S. (2005). Adiponectin--tipping the scales from NAFLD to NASH?. *Gastroenterology*, 128(2), 511 - 513. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.10.047>

[88] Finelli, C., & Tarantino, G. (2013). What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease?. *World journal of gastroenterology*, 19(6), 802 - 812. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i6.802>

# ABSTRACT

## Effect of short-term(2 weeks) high-fat diet on non-alcoholic fatty liver in SD rats.

Kim, Narae

Department of Food and Nutrition

Graduate School of

Sungshin Women's University

### Background

The high-fat diet-induced obesity (DIO) model design, which induces obesity by using a high-fat diet, is commonly used in experiments on drugs and functional foods that suppress obesity. However, high-fat diets are composed of various percentages of energy values from 45% to 60%, with advantages or disadvantages in vivo study. Our purposes are to reduce the side effects, such as metabolic abnormalities with high-fat diets, and to induce a short-treated DIO model according to goals.

### Methodologies

This study investigated weight gain for the body and organs, blood biochemistry (TG, TC), liver toxicity (ALT, AST), lipid metabolism in liver and fat tissues (TG and TC levels, H&E staining, western blot for adipogenesis biomarkers. and inflammatory/anti-inflammatory cytokines

such as TNF- $\alpha$ , IL-6, leptin, and adiponectin) in two groups, HF (60% fat) and the Cont (regular diet) for 2weeks-feeding.

## **Results**

There were no differences in hepatotoxicity (AST, ALT) and organs' weights (liver, spleen, kidney) between HF and the Cont groups(Con; chow diet; 9% fat). The fat tissues weights (kidney, visceral fat, epididymis), protein expression of adipogenesis (PPAR- $\gamma$  and C/EBP $\beta$ ) in fat tissues, and inflammatory cytokines expression (TNF- $\alpha$ , IL-6) in liver tissue were significantly increased in HF group compared to the Con. Blood TG and TC decreased in the HF group compared to the Con; however, we confirmed fatty liver in the HF group because TG accumulation (TG levels) and lots of lipid droplets (H&E staining) were found in liver that feed HF diet. Leptin, the obesity gene, and adiponectin, the anti-obesity biomarker, which are cytokines secreted from the adipose tissue, were reduced by the HF diet compared to the Con.

## **Conclusion**

In this study, the fatty liver with inflammation status was induced by only a 2weeks feeding of 60% HF diet. However, more than the administration period is needed to find how to generate the process from NAFLD to NASH. Therefore, the mechanism of causality between a dietary fat diet with an administration period and obesity prevalence with NAFLD might be performed in the future.