

발 간 등 록 번 호

안내서-0134-02

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘혈중 중성지방 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편

2019. 6.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(‘혈중 중성지방 개선에 도움을 줄 수 있음’편)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 ‘예’에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2019년 6 월 일 담당자 확 인(부서장) 이 혜 영		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2019년 6월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2016-1-001	2016.6.27.	제정
2	안내서-0134-01	2017.6.1.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.)
3	안내서-0134-02	2019.6.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 Ⅰ 서 론	5
 Ⅱ 일반적 사항	5
1. 개요	5
2. 보건학적 중요성	21
 Ⅲ 기능성 시험 방법	22
1. 바이오마커의 선정	22
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	31
3. 시험 설계 시 고려사항	46
 Ⅳ 참고문헌	49

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

건강기능식품법률 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

ACC1	acetyl-CoA carboxylase 1
ACL	ATP citrate lyase
ACS	acyl CoA synthetase
AMPK	AMP-activated protein kinase
Apo	apolipoprotein
ATGL	adipose triglyceride lipase
AUC	postprandial total area under the curve
BSA	bovine serum albumin
β -NADH	β -nicotinamide adenine dinucleotide
CD36	cluster of differentiation 36
CETP	cholesterol ester transfer protein
CGI-58	comparative gene identification 58
CM	chylomicron
CM remnant	cylomicron remnant
CoA	coenzyme A
CPT	carnitine palmitoyl transferase
CRP	c-reactive protein
DG/DAG	diacylgcerol
DGAT	diacylglycerol acyltransferase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FABPs	fatty acid binding proteins
FAS	fatty acid synthase complex
FATP	fatty acid transport protein
FBS	fetal bovine serum
G-3-P	glycerol-3-phosphate
GK	glycerol kinase
GLUT4	glucose transporter type 4
GPAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase
GPO	glycerol phosphate oxidase
HDL	high density lipoprotein
HNF 4 α	hepatocyte nuclear factor 4 α
HRP	horseradish peroxidase
HSL	hormone sensitive lipase

HSPG	heparan sulfate proteoglycans
HTGL	hepatic triglyceride lipase
IAUC	incremental area under the curve
IL-6	interleukin-6
KBr	potassium bromide
LDL	low density lipoprotein
LPA	lysophosphatidic acid
LPL	lipoprotein lipase
LSC	liquid scintillation counter
LXR	liver X receptor
MG/MAG	monoacylglycerol
MGL	monoacylglycerol lipase
MDH	malic dehydrogenase
ME	malic enzyme
MGAT	monoacylglycerol acyltransferase
NEM	N-ethylmaleimide
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAP	phosphatidate phosphohydrolase
PCTV	pre-chylomicron transport vesicle
PGC-1	peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1
PLA	total plasma lipolytic activity
p-NPB	p-Nitrophenyl butyrate
PPAR α	peroxisome proliferator-activated recepto alpha
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RCT	randomized controlled trial
sdLDL	small dense LDL
SREBP	sterol response element binding protein
TG/TAG	triglyceride/triacylglycerol
TLC	thin layer chromatogram
TNF- α	tumor necrosis factor- α
VLDL	very low density lipoprotein
VLDL1	large VLDL
VLDL2	small VLDL
WHR	waist to hip ratio
MG	monoacylglycerol
2-MG	2-Monoacylglycerol

I

서론

이 가이드라인은 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 기능성(혈중 중성지방 개선에 도움)에 대한 바이오마커 등의 정보를 제공함으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 개요

가. 혈중 중성지방의 변화

(1) 중성지방

중성지방(triglyceride, TG)은 1분자의 글리세롤(glycerol)과 3분자의 유리지방산(free fatty acid)이 에스테르 결합(ester bond)을 한 형태이다(그림 1). 글리세롤에 결합되어 있는 지방산의 수에 따라 모노아실글리세롤(monoacylglycerol, MAG 또는 MG), 디아실글리세롤(diacylglycerol, DAG 또는 DG), 트리아실글리세롤(triacylglycerol, TAG 또는 TG)로 구분한다. 중성지방은 글리세롤에 결합되어 있는 지방산의 종류에 따라 중성지방의 물리적 성질이 달라지고 건강에 미치는 영향이 다르다. 이중결합이 없는 포화지방산이 결합된 경우에는 상온에서 고체인 지방(fat)의 형태이고, 이중결합이 있는 불포화지방산이 결합된 경우에는 대개 상온에서 액체인 기름(oil)의 형태이다.

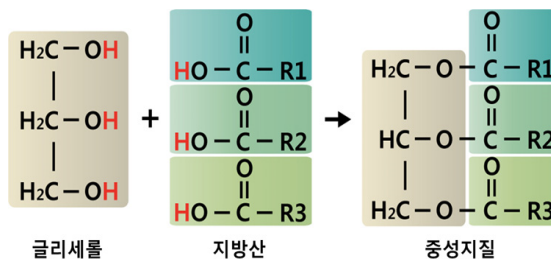


그림 1. 중성지방의 구조

식사를 통해서 섭취한 지방의 95%는 중성지방이며 나머지 소량은 인지질과 콜레스테롤 등이다. 중성지방은 1g 당 9kcal의 에너지를 생산하는 효율적인 에너지원이며, 체내에 저장되는 에너지의 형태도 대부분이 중성지방이다. 잉여의 중성지방은 지방조직에 저장되는데, 탄수화물을 많이 섭취하여도 간과 지방조직에 중성지방이 축적된다.

(2) 공복 혈중 중성지방

공복 상태에서는 저장되어 있던 중성지방이 간에서 초저밀도지단백질(very low density lipoprotein, VLDL) 형태로 혈액으로 분비되고, 공복 시 혈중 중성지방 농도는 주로 VLDL에 존재하는 중성지방을 반영하게 된다. 일반적으로 12시간 공복 상태에서 혈중 중성지방을 측정하여 150 mg/dL 미만인 경우는 정상, 150~199 mg/dL인 경우는 경계성 고중성지방혈증, 200~499 mg/dL이면 고중성지방혈증, 500 mg/dL 이상이면 매우 높은 고중성지방혈증으로 분류한다(표 1).

표 1. 혈중 중성지방 수준에 따른 고중성지방혈증 분류

혈중 중성지방 수치	판정 기준
< 150 mg/dL	정상수준(적정수준)
150~199 mg/dL	위험해질 수 있는 수준(경계수준)
200~499 mg/dL	위험수준(높은 수준)
≥ 500 mg/dL	고도위험수준(매우 높은 수준)

[출처: 한국지질동맥경화학회, 이상지질혈증 치료지침, 2015]

(3) 식후 혈중 중성지방

식사로 지방을 섭취하면 혈액 중의 중성지방 농도는 수 시간 동안 상승하였다가 12시간 이내에 정상화된다. 고지방 식사 후 혈액에서 순환하는 중성지방의 90% 이상은 소장에서 킬로미크론(chylomicron, CM)형태로 흡수되므로 식후 중성지방 농도는 킬로미크론에 존재하는 중성지방농도를 의미한다. 공복 상태에서 측정한 혈중 중성지방농도는 잠재적인 고중성지방혈증을 간과할 수 있다는 문제점이 있다. 건강한 성인에 있어서도 식후 증가된 중성지방으로 인하여 동맥 경화의 초기 단계에서 볼 수 있는 혈관 내피세포 기능 이상이 나타나기 때문이다. 그러므로 식후 0~8시간 사이의 혈중 중성지방농도 측정은 잠재적인 고중성지방혈증 위험을 확인하는 지표로 이용되며, 기준은 표 1을 참고한다.

나. 중성지방의 소화와 흡수

(1) 중성지방의 소화

식으로 섭취한 중성지방은 지방 소화효소인 리파아제에 의하여 모노아실글리세롤과 2개의 유리지방산으로 가수분해 된다. 리파아제는 구강 및 위장에서도 소량 분비되나, 성인이 섭취한 대부분의 중성지방은 췌장에서 분비되는 췌장 lipase(pancreatic lipase)에 의하여 가수분해 된다. 췌장 lipase의 작용을 받으려면 중성지방은 담즙산에 의한 유화과정을 거쳐야 한다.

(2) 중성지방의 흡수

지방의 흡수는 소장내막세포에서 일어난다. 담즙산과 지방 소화물질인 모노아실글리세롤, 유리지방산, 인지질, 콜레스테롤은 장관 내에서 micelle을 형성하여 소장내막세포로 흡수된다. 짧은 사슬 지방산(탄소 수: 4-6개)은 직접 소장내막세포에서 문정맥으로 이동되고 혈액 내에 존재하는 알부민(albumin)과 결합하여 다른 조직으로 이동한다. 반면에 중간 사슬 지방산(탄소 수: 8-12개)과 긴 사슬 지방산(탄소 수: 14개 이상)은 지방산 특이 수송체(fatty acid transport protein)인 CD36 (cluster of differentiation 36) 또는 FATP4(fatty acid transport protein 4)을 통해 소장내막세포로 흡수되고, 모노아실글리세롤과 결합하여 중성지방으로 재합성되어 림프관으로 이동된다(그림 2).

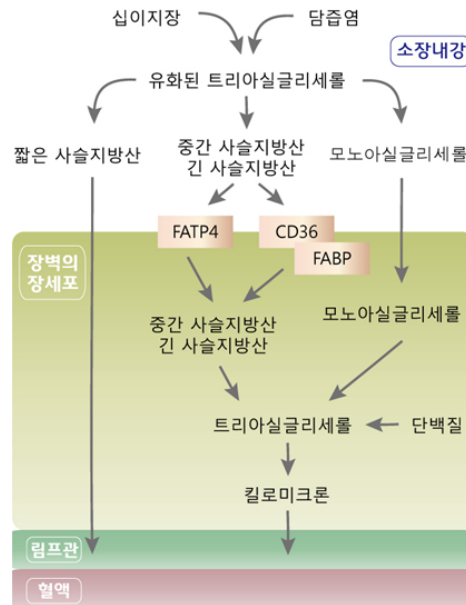


그림 2. 중성지방의 소화·흡수 과정

(3) 중성지방 흡수 조절 유전자

(가) Fatty Acid Transport Protein 4(FATP4)

FATP4는 소장내막세포막에 위치하여 장관에서 중성지방으로부터 분해된 지방산 중 중간 사슬 또는 긴 사슬 지방산을 소장내막세포막으로 수송하는 수송 단백질이다. FATP4에 의해서 소장내막세포로 수송된 지방산은 중성지방 합성에 사용되며, 킬로미크론 형태로 간으로 이동한다. FATP4 유전자를 제거한 동물에서는 혈중 중성지방 감소가 나타나 중성지방 개선의 공통 기전 연구의 바이오마커로 사용된다.

(나) Cluster of differentiation 36(CD36)

CD36은 지방세포에서 fatty acid binding protein(FABP) 및 FATP와 상호작용하여 지방산 흡수를 촉진시키는 단백질이다. CD36은 class B scavenger receptor family에 해당하는 막단백질로 단핵구, 대식세포, 혈소판, 근육세포, 지방세포 등에서 발현된다. 비만 실험동물모델의 간 및 지방 조직에서 CD36 발현이 증가한다. CD36 발현이 감소하면 지방산 흡수가 감소되어 지방합성이 억제되므로 중성지방 개선 효과를 기대할 수 있다.

다. 중성지방의 체내 이동

지방은 소수성 물질이므로 지단백질(lipoprotein)의 형태로 혈액을 순환한다. 지단백질은 구형으로 표면은 수용성인 단백질과 인지질 같은 물질로 싸여있고 그 중심에는 중성지방, 콜레스테롤에스테르 같은 소수성 물질이 존재한다. 이러한 형태는 소수성 물질인 지방성분이 혈액 내 순환하는 것을 가능하게 한다. 중성지방을 필요한 조직과 기관으로 이동시키는 주요 지단백질은 킬로미크론과 초저밀도 지단백질(very low lipoprotein, VLDL)이다. 지단백질 표면에 있는 수용성 단백질을 아포지단백질(apolipoprotein, Apo)이라고 한다. 중성지방 이동에 관여하는 주요 아포지단백질은 ApoA-1, ApoB-48, ApoB-100, 및 ApoCII 가 있다(그림3).

(1) 아포지단백질(apolipoprotein, Apo)

아포지단백질은 지단백질을 분비하는 간과 소장세포에서 합성되는데, ABC 명명법으로 분류되어 고밀도지단백질(high density lipoprotein, HDL)의 주요 아포지단백질은 A, 저밀도지단백질(low density lipoprotein, LDL)과 킬로미크론의 주요 아포지단백질은 B이다. 아포지단백질 C는 킬로미크론, VLDL, 및 HDL에 모두 결합하여 중성지방의 이동 및 가수분해를 조절한다.

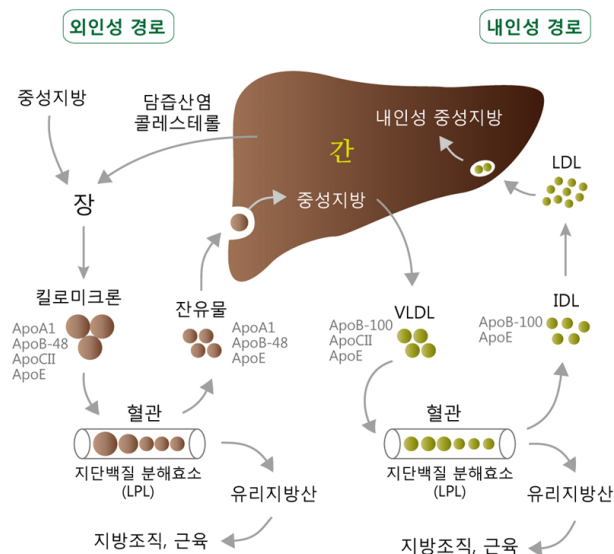


그림 3. 내인성 및 외인성 중성지방의 체내 이동 대사

ApoA-1은 소장과 간에서 합성되며 킬로미크론과 HDL에 존재하며, 소장세포내에서 킬로미크론과 결합하여 중성지방의 이동시키는 역할을 한다. 뿐만 아니라, ApoA-1은 HDL과 결합하여 간으로 이동시키는 역할을 한다. ApoB는 ApoB-48과 ApoB-100의 2가지 형태가 있다. ApoB-48은 소장에서 합성되며 킬로미크론에 존재하고 ApoB-100은 간에서 합성되어 VLDL 및 LDL에 포함되어 있다. ApoCII는 간과 소장에서 합성되며, 주로 킬로미크론과 VLDL에 함유된 중성지방을 분해하는 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase, LPL)의 보조 인자로서 중요한 역할을 수행한다.

(2) 킬로미크론(chylomicron, CM)

킬로미크론은 지단백질 중에서 가장 크기가 크며(100~1,000nm), 밀도는 제일 낮다. 소장에서 생성되며, 음식으로 섭취된 식이 지방을 간과 말초세포로 이동시키는 운반체의 기능을 한다. 중성지방(80~90%)이 주성분이고 그 외에 인지질(2~7%), 콜레스테롤(3~8%), 아포지단백질(1~2%; ApoA-1, ApoB-48 등)로 구성되어 있다. 건강한 사람의 경우, 킬로미크론은 혈액을 순환하는 동안 지단백질 분해효소와 간 중성지방 분해효소(hepatic triglyceride lipase, HTGL)의 작용을 받아 중성지방 함량이 현저하게 감소한다. 이러한 과정을 거쳐 중성지방이 감소된 입자를 킬로미크론 잔유물(chylomicron remnant, CM remnant)이라 부르며, 간으로 이동되어 제거된다. 그러나 지단백질 분해효소 및 간 중성지방 분해효소의 유전자에 이상이 있거나, 이러한 분해 효소의 결핍 등의 문제가 있으면 킬로미크론 또는 킬로미크론 잔유물이 혈액에 축적되어 고중성지방혈증이 유발된다. 특히 킬로미크론 잔유물은 동맥경화의 위험을 증가시킨다.

(3) 초저밀도 지단백질(very low lipoprotein, VLDL)

VLDL의 구조 및 구성은 킬로미크론과 유사하나 크기가 더 작고(25~100nm) 중성지방량이 더 적다(중성지방 50~60%, 인지질 15~20%, 콜레스테롤 20~25%, ApoB-100 5~10%). VLDL은 간에서 생성되며, 중성지방을 말초조직으로 이동한다. 혈액을 순환하는 동안 VLDL은 지단백질 분해효소에 의해 중성지방이 분해되어 함량이 감소하면서 전체적으로 중성지방비율이 감소하고 콜레스테롤비율이 증가한 LDL로 전환된다.

(4) 저밀도 지단백질(low density lipoprotein, LDL)

VLDL은 중성지방을 세포로 옮긴 후에는 밀도와 콜레스테롤 비율이 높아진 LDL의 형태로 전환된다. LDL은 콜레스테롤 45%, TG 10%, 단백질 25%, 인지질 20% 등으로 구성되고

세포막에 있는 LDL 수용체와 결합해 세포내로 운반된다. 중성지방을 상대적으로 많이 함유한 LDL은 small dense LDL(sdLDL)로 변화되어 혈관벽에 쉽게 침투하여 동맥경화 등 여러 심혈관계 질환을 유발할 위험이 증가한다.

(5) 고밀도 지단백질(High density lipoprotein, HDL)

HDL은 주로 간에서 만들어지며 단백질 50%, 인지질 22%, 콜레스테롤 17%, TG 8% 등으로 구성된다. 혈중 중성지방 농도가 증가하면 증가된 중성지방을 대사하기 위해 cholesterol ester transfer protein(CETP, cholesterol과 TG로 교환하는 역할)이 방출되어 과도한 중성지방을 LDL입자뿐 아니라 HDL 입자에게도 전달된다. 중성지방이 많은 HDL은 hepatic TG lipase(HTGL)에 의해 급속히 대사되고 중성지방이 많고 크기가 작아진 HDL2로 전환된다. 그러므로 혈중 중성지방이 개선되면 LDL 및 HDL cholesterol 개선에 도움이 된다.

라. 중성지방의 합성

중성지방의 합성은 지방산 합성과 중성지방 합성 과정을 거치게 된다.

(1) 지방산 합성경로

지방세포에 저장된 중성지방은 가수 분해되어 유리지방산(non-esterified fatty acid, NEFA)의 형태로 간으로 전달된다. 간으로 전달된 유리지방산은 먼저 아실-CoA 합성효소(acyl-CoA synthetase)에 의해 코엔자임 A(coenzyme A)와 결합하여 활성화된 지방산의 형태인 fatty acyl-CoA로 전환된다. 장관에서 흡수된 유리지방산 또한 fatty acyl-CoA로 전환된다. 인슐린저항성이 있는 상황에서는 카테콜아민이나 글루코르티코이드 등의 호르몬의 자극에 대해 지방세포가 민감하게 반응하기 때문에 많은 양의 유리지방산이 생산되며, 이는 간으로 흡수되어 중성지방을 만드는 원료로 쓰인다. 활성화된 유리 지방산은 어떠한 전사인자의 활성화에 의한 것인지에 따라 중성지방 또는 콜레스테롤 생합성경로를 거치게 된다. SREBP-1c의 전사인자 활성을 거치면 중성지방이 합성되며, SREBP-2를 거치면 콜레스테롤 합성이 일어난다. 특히 인슐린 저항성과 같은 상태에서는 간에서 과도한 중성지방이 만들어지게 된다.

포도당에서도 지방산이 합성되는데, 포도당은 일련의 화학 반응(해당 작용, glycolysis)을 통해 최종적으로 피루브산(pyruvate)으로 전환된다. 피루브산은 미토콘드리아에서 아세틸

-CoA(acetyl-CoA)로 전환되어 시트르산 회로로 들어가 지방산 합성의 전구물질인 시트르산을 생성한다. 시트르산은 지방산 합성을 위해 세포질로 운반되어 옥살아세트산(oxaloacetate)과 아세틸-CoA로 분해된다. 아세틸-CoA는 acetyl-CoA carboxylase(ACC)의 작용에 의하여 말로닐-CoA(malonyl-CoA)로 전환되어 지방산합성효소복합체(fatty acid synthase complex, FAS)의 작용에 의하여 지방산을 합성하게 된다(그림 4).

(2) 중성지방 합성경로

식이로부터 섭취한 지방산이나 세포내에서 생성된 지방산은 fatty acyl CoA를 형성한 후 글리세롤과 결합하여 중성지방을 합성된다. 중성지방의 체내 합성은 glycerol-3-phosphate (G-3-P)와 monoacylglycerol(MAG) 경로로 일어난다. G-3-P 경로 및 MAG 경로에서 각각에서 DAG(diacylglycerol)를 합성되고 최종적으로 중성지방이 합성된다(그림 4).

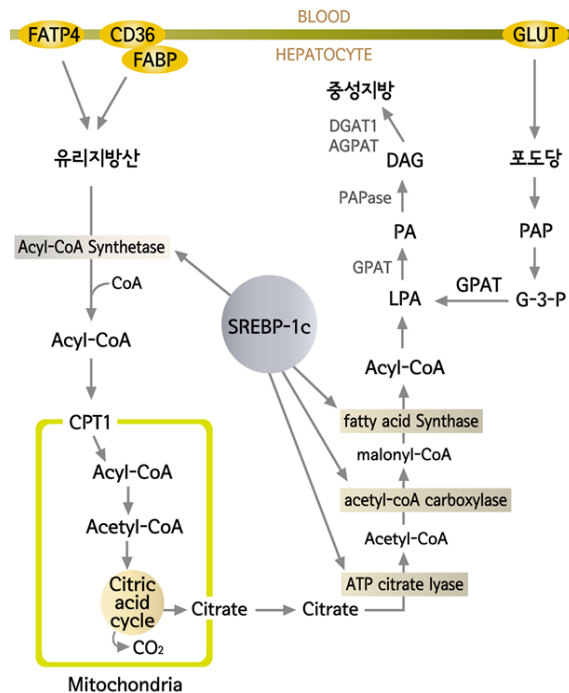


그림 4. 유리지방산과 포도당으로부터 중성지방 합성 대사

(가) Glycerol-3-phosphate(G-3-P) 경로

G-3-P 경로는 주로 간 조직과 지방조직에서의 중성지방 생합성 경로로 이용된다. G-3-P는 glycerol-3-phosphateacyltransferase(GPAT)에 의해 에스테르화 되어 lysophosphatidic

acid(LPA)로 전환된다. LPA는 phosphatidic acid phosphohydrolase (PAPase)에 의해 아실화와 탈 인산화가 일어나 DAG(diacylglycerol)가 된다. DAG는 최종적으로 diacylglycerol acyltransferase(DGAT)에 의해 중성지방으로 합성된다.

(나) Monoacylglycerol(MAG) 경로

MAG 경로는 식이를 통해 섭취된 중성지방이 췌장 lipase에 의해 유리지방산과 모노아실 글리세롤 형태로 장의 상피세포를 통해 흡수된 후, 중성지방으로 재합성되는 경로이다. 중성 지방이 생합성 되는 두 경로의 마지막 과정을 촉매 하는 효소는 monoacylglycerol acyltransferase(MGAT)와 DGAT이다. MGAT는 모노아실글리세롤과 fatty acyl-CoA로부터 DAG를 합성하는데 이용되는 효소로, 주로 장 점막(intestinal mucosa)에서 중성지방 합성에 관여한다. DGAT는 중성지방 합성 마지막 단계에서 DAG의 하이드록실기에 fatty acyl-CoA를 결합시켜 중성지방을 합성하는 효소이다. 이렇게 합성된 중성지방은 킬로미크 론에 함유되어 림프관을 통해 혈액 내로 들어오게 되고 내피 세포에 존재하는 지단백질 분해 효소(lipoprotein lipase)에 의해 글리세롤과 지방산으로 분해된다. 이때 생성된 지방산은 지방세포 내에서 다시 중성 지방으로 합성되어 저장된다. DGAT는 두 경로에서 중성지방 합성 마지막 단계에 공통으로 사용되는 효소로 특히 많이 연구되고 있다.

(3) 중성지방 합성 조절 유전자

(가) Sterol response element binding protein-1c(SREBP-1c)

SREBP-1c는 지방조직과 간 조직에서 중성지방 합성에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. 간 조직에서 특히 SREBP-1c의 발현이 우세하며, 간세포에서의 중성지방 합성과 관련된 FAS, ACC, ATP-citrate lyase(ACL), malic enzyme(ME)과 같은 효소의 유전자 발현을 조절한다. SREBP-1c 발현을 억제하면 지방산 합성이 감소하고 결과적으로 간 조직에 중성 지방 축적을 억제된다.

(나) Liver X receptor(LXR)

LXR α 는 주로 간, 지방 조직, 장, 대식 세포, 신장에서 발현되고, LXR β 는 모든 장기에서 발현된다. LXR은 지방산과 중성지방 합성의 전사인자인 SREBP-1c의 발현을 증가시킨다. 따라서 LXR의 발현이 감소되면 SREBP-1c 발현이 감소하여 중성지방 합성이 억제되므로 혈중 중성지방 농도가 감소하는 효과가 기대 된다.

(다) Fatty Acid Binding Proteins(FABPs)

FABPs는 세포막에서 지방산 이동을 촉진하는 지방산 결합단백질들이다. 간-FABP (Liver-FABP, L-FABP)는 식이로 섭취한 중성지방을 킬로미크론 형태로 간으로 이동하기 위한 pre-CM 수송 운반체(pre-chylomicron transport vesicle, PCTV)의 활성을 촉진한다. FABP(adipocyte FABP, adipocyte protein 2, aP2, FABP4 라고도 함)는 지방세포와 대식세포에서 주요하게 발현되는 단백질로 지방세포내로 지방산 흡수를 촉진시키는 단백질이다. FABP 유전자를 제거한 동물에서는 혈당 감소 및 혈중 중성지방감소가 나타나 고혈당과 중성지방 개선의 공통 기전 연구의 바이오마커로 사용된다.

(라) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ)

PPAR γ 는 주로 지방 조직에 발현되는 전사인자로 아디포넥틴(adiponectin)과 같은 인슐린 감수성 아디포카인(adipokine)의 생성에 관여함으로써 지방세포 내 지방이 축적되는 것을 조절한다. 중성지방합성에도 관여하며 FABP 및 LPL과 같은 단백질의 유전자 전사를 유도한다. 따라서 PPAR γ 의 발현이 감소되면 지방조직에서의 중성지방 합성이 감소하여 혈중 중성지방 개선의 효과가 기대된다.

(마) Glucose transporter type 4(GLUT4)

GLUT4는 세포내로 포도당을 수송하는 단백질로, 발현이 증가하면 세포내 포도당의 유입이 증가하여 중성지방 합성도 증가한다. GLUT4는 특히 근육과 지방세포로의 포도당의 수송을 촉진한다. 탄수화물을 과잉 섭취 할 경우, 지방세포내로 포도당 유입이 증가하고 중성지방 합성이 증가하여 고중성지방혈증이 유발되며 인슐린대사와의 관련성으로 인해 GLUT4의 발현은 당뇨병과 고중성지방혈증개선 연구에서 바이오마커로 이용된다.

마. 중성지방의 분해

중성지방 분해 조절은 크게 지단백질대사에 관여하는 효소 활성 조절과 중성지방 가수분해로 생성된 유리지방산의 산화(β -산화)로 나누어진다.

(1) 지단백질대사에 관여하는 주요 효소

지단백질의 중성지방을 분해하는 주요 효소들은 혈관내에 존재하는 지단백질 분해효소(LPL), 간세포 및 내피세포에 존재하는 간 중성지방 분해효소(hepatic triglyceride lipase,

HTGL), 지방조직에서 활성을 보이는 호르몬 민감성 지방분해효소(hormone sensitive lipase, HSL), adipose triglyceride lipase(ATGL) 등이 있다. HTGL 및 LPL은 주로 혈관 내피세포에 존재하며 HSL은 지방조직에 존재하는 효소이다.

(가) 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase, LPL)

LPL은 지방을 저장하거나 에너지원으로 이용하는 지방조직, 심장조직, 그리고 골격근에서 주로 합성된다. LPL은 중성지방대사에 특히 중요한 가수분해 효소로, 혈관 내피세포에 존재하다가 킬로미크론 및 VLDL의 ApoCII에 의해 활성화되면 중성지방을 분해하여 유리지방산과 글리세롤로 분해시킨다. 지방조직에서 LPL은 식후 상태에서 활성화되고 공복상태에서는 활성이 저하된다. 반면에 근육조직의 LPL은 공복상태에서 활성화되어 중성지방을 분해하여 에너지원으로 사용한다. 정상 혈액에는 소량 존재하지만 헤파린(heparin)을 정맥투여하면 혈관 내피세포에 부착되어 있던 효소가 유리되면서 활성이 높아진다. LPL 활성이 증가하면 중성지방 분해가 증가하므로 혈중 중성지방 개선 효과를 기대할 수 있다.

(나) 간 중성지방 분해효소(hepatic triglyceride lipase, HTGL)

간에서 합성되고, 보조인자의 도움 없이 중성지방이나 인지질을 가수분해한다. 중성지방이 풍부한 지단백질에 작용하여 VLDL을 LDL로 전환시키고, HDL 대사에서는 HDL3를 HDL2로 전환시키는 역할을 한다. 간세포 및 내피세포 표면에 있는 heparan sulfate proteoglycans (HSPG)에 결합되어 있어 헤파린을 제거하면 간에서 혈액으로 다량 유출된다. 총 혈장지질분해 활성(total plasma lipolytic activity, PLA)은 혈장에서 LPL과 HTGL활성을 합하여 계산하는데 일반적으로 PLA 활성은 두 효소의 특성을 고려하여 pre-헤파린 혈장과 post-헤파린 혈장에서 모두 측정한다.

(다) Adipose triglyceride lipase(ATGL)

ATGL은 근육이나 고환, 부신 등의 다양한 장기에 분포하긴 하지만, 지방조직에서 주로 활성화 된다. ATGL은 HSL에서 활성화로 인해 perilipin에서 분리된 comparative gene identification-58(CGI-58)이라 불리는 co-factor와 결합하여 활성화 된다. 활성화된 ATGL은 중성지방 TG로부터 DG와 유리지방산으로 분해한다.

(라) 호르몬 민감성 지방분해효소(hormone sensitive lipase, HSL)

HSL은 근육이나 고환, 부신 등의 다양한 장기에 분포하긴 하지만, 지방조직에서 주로 활성화 된다. 에피네프린이나 글루카곤과 같은 호르몬이 분비되면 adenylate cyclase가 활성화 된다. 활성화된 adenylate cyclase는 ATP를 cAMP로 전환시킨다. cAMP은 protein kinase A와 결합하여 protein kinase A를 활성화시키고 활성화된 protein kinase A은 HSL를 인산화시켜 활성형으로 만든다. 활성형 HSL은 DG로부터 MG와 유리지방산으로 분해하는 작용을 한다. 식후에는 인슐린의 농도가 높아져 HSL 활성이 억제되므로, 중성지방의 분해를 막고 중성지방을 축적하는 방향으로 대사가 진행된다.

(2) 지방산의 β -산화(β -oxidation)

식이 중성지방이나 체내 축적된 중성지방(체지방)에서 분해된 유리지방산의 산화를 촉진 시킴으로서 혈중 중성지방 농도를 개선할 수 있다. 지방산이 산화되기 위해서는 먼저 지방산은 acyl-CoA synthetase의 촉매 작용으로 acyl-CoA로 활성화 되어야 한다. 이 반응에는 CoA-SH와 ATP가 필요하다. 지방산 산화에 필요한 효소들은 미토콘드리아 내막 및 matrix에 존재하므로 활성화된 지방산은 carnitine palmitoyl transferase(CPT) 효소에 의해 미토콘드리아 내부로 이동한다. 미토콘드리아 내부로 들어온 지방산은 β -산화 과정(탈수소반응→가수반응→탈수소반응→thio 분해반응)을 통해 지방산의 카르복시 말단으로부터 2개의 탄소가 절단되어 acetyl-CoA 형태로 방출하고 처음보다 탄소수가 2개 적은 지방산인 acyl-CoA가 생성된다. 이렇게 생성된 아세틸-CoA는 시트르산 회로로 들어가 완전 산화되어 분해되거나, 생체에 필요한 물질을 생합성하는데 이용된다.

(3) 지방산 산화 관련 유전자 발현

미토콘드리아에서의 지방산 산화는 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1(PGC-1), peroxisome proliferator-activated receptors(PPAR α), AMP-activated protein kinase(AMPK)등의 유전자에 의해 조절된다(그림 5).

(가) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1(PGC-1)

PGC-1은 에너지항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 장기간의 단식은 PGC-1의 발현을 증가시키고 지방산의 산화를 증가시켜 단식 중에 필요한 에너지를 공급한다. PGC-1의 발현 증가와 혈중 중성지방 개선에 관련된 기전은 다음과 같다. PGC-1은 FXR mRNA 발현을 유도하기 위해, FXR promoter의 DR-1에 결합된 PPAR 및/또는 HNF 4을 활성화 시킨다, 또한 PGC-1은 FXR 표적 유전자의 전사를 강화하기 위하여 FXR에 직접적으로 작용하기도

한다. PGC-1에 의해 활성화된 FXR 및 FXR 표적 유전자들은 SREBP-1c의 발현 감소시키고 중성지방 분해에 관여하는 유전자의 발현이 증가시킨다.

(나) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha(PPAR α)

PPAR α 는 핵수용체의 하나로서 주로 간, 심장, 근육, 신장에서 발현되어 지방산의 산화와 아포지단백질의 합성을 조절한다. PPAR α 발현이 증가하면 간 지방산결합단백질(L-FABP) 발현을 유도하여 미토콘드리아내로의 지방산 이동을 증가시키고, CPT1의 발현을 증가시켜 지방산 산화를 증가시킨다. PPAR α 는 또한 LPL 발현촉진, ApoCII 발현감소, 간의 지방산 산화를 촉진시켜 중성지방 분해가 증가한다.

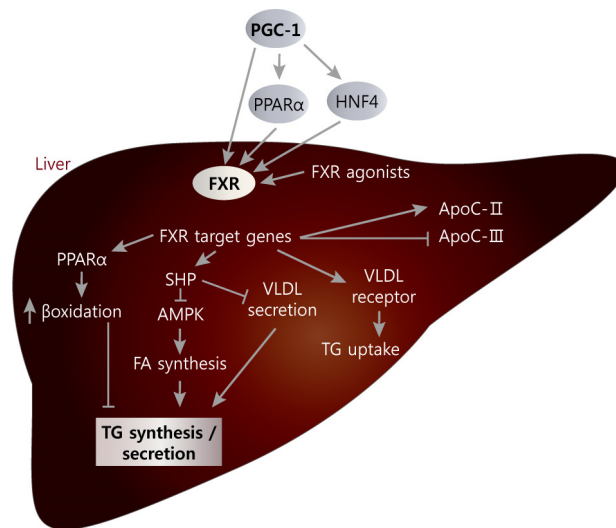


그림 5. 중성지방 분해 관련 유전자 발현

(다) AMP-activated protein kinase(AMPK)

AMPK는 골격근에서 지방산 대사에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. SREBP-1c와 PPAR γ 의 발현을 억제하고 FAS와 같은 지방합성 효소의 발현을 억제함으로써 중성지방 생성을 억제시키며, 또한 ACC의 억제와 CPT1의 활성을 통해 지방산 β -산화를 촉진시킨다. AMPK의 발현이 증가하면 간에서 지방산 산화를 증가시키고 지방산 생합성을 감소시키며 지방조직에서 지방분해를 증가시키고 지방합성을 감소시킨다. 또한 근육에서 지방산 산화를 증가시키고 포도당 유입이 증가하여 에너지로 사용한다.

바. 조직에서의 중성지방 합성과 분해

(1) 간(liver)

식이 중성지방은 킬로미크론 잔유물의 형태로 간에 들어온다. 간에 존재하는 킬로미크론 잔유물은 HTGL에 의해 유리지방산과 글리세롤로 분해되고 유리지방산은 중성지방으로 재합성되거나 산화되어 에너지로 사용된다. 대부분의 중성지방은 VLDL형태로 혈액을 통해 다른 기관(지방조직, 심장, 근육, 대식세포)등으로 이동한다. 또한 지방조직에서 중성지방이 분해되어 생성된 유리지방산은 알부민과 결합하여 간과 골격근으로 운반된다. 간에서 유리지방산은 중성지방 합성의 기질로 이용된다. 간에 들어온 포도당 또한 중성지방 합성의 기질로 이용된다.

(2) 지방조직(adipose tissue)

지방조직은 잉여의 중성지방이 저장되는 중요한 장소이다. 중성지방은 킬로미크론 잔유물이나 VLDL의 형태로 전신 혈관계를 거쳐 지방조직으로 운반되는데, 여기에서 모세혈관에 붙어있는 LPL의 작용으로 중성지방이 유리지방산으로 분해되어 지방세포 내로 이동하게 된다. 지방조직에서는 포도당으로부터 합성된 글리세롤 3-인산과 지단백질로부터 유리된 지방산을 이용하여 중성지방이 합성된다. 따라서 포도당유입을 위한 GLUT4 등의 활성이 필요하므로 인슐린이 중성지방 합성을 조절된다. 반대로 금식 등으로 에너지원이 부족한 경우 지방세포 내에 저장된 중성지방을 분해하는 과정은 카테콜라민에 의하여 활성화된 HSL 역할이 중요하다. 저장된 중성지방은 지방세포 내 HSL에 의해서 활성화된 ATGL 및 HSL에 의해 분해되고 유리지방산은 에너지원이 필요한 간이나 근육으로 이동한다.

장기간의 영양 과잉은 지방세포 내 유리지방산 및 중성지방 축적과 대식세포가 지방세포에 침윤되는 것을 촉진시킨다. 지방조직에서 분비되는 아디포카인(adipokine)들도 대식 세포를 불러오는 역할을 하며, 대식세포들은 사이토카인을 분비하여 지방세포의 기능 부전, 지방세포의 인슐린 저항성 및 염증 반응을 촉진한다.

(3) 심장(heart)과 근육(muscle)

심장과 근육은 지방산이 산화되어 에너지원으로 이용되는 주 장소로, 두 조직 모두에서 LPL이 높게 발현된다. 즉 심장 및 근육의 내피세포에 존재하는 LPL에 의해 중성지방은 분해되고, 생성된 유리지방산은 에너지원으로 이용됨. 혈중 유리지방산의 증가는 근육에서의 인슐린 저항성을 유발한다. 정상적으로 인슐린은 근육 세포의 인슐린 수용체와 결합하여

근육에서 포도당 이동을 촉진한다. 그러나 과잉의 유리지방산은 인슐린 작용을 억제하고 근육 세포의 인슐린 매개 포도당 흡수를 억제하여 인슐린 저항성을 유발한다.

사. 기타

혈중 중성지방 개선과 관련 있는 아래 지표들은 인체적용시험의 2차 종말점(secondary endpoint)으로 사용된다. 내장 중성지방 축적은 아디포사이토카인(adipocytokine, 또는 아디포카인이라 함)의 분비 불균형을 초래하여 렙틴(leptin), 아디포넥틴(adiponectin), tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin-6(IL-6), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 생산 촉진 및 아디포넥틴(adiponectin)의 생산저하를 유발한다.

(1) 내장지방

내장지방은 피하지방보다 중성지방을 더 쉽게 축적하며 필요시에 더 쉽게 중성지방을 에너지원으로 이용한다. 내장지방이 과다 축적되면, 공복 시에 중성지방의 분해산물인 유리 지방산과 글리세롤이 과다하게 방출된다. 내장지방은 문맥과 이어져 있기 때문에 방출된 유리지방산과 글리세롤은 간으로 유입되면 간 내 포도당 생성이 증가하고, 또한 유리지방산은 중성지방 합성에 사용하게 되어 간의 중성지방이 축적된다. 간은 중성지방을 함유한 VLDL을 과다 생성 분비하게 되어 인슐린 저항성 및 고중성지방혈증이 동반된다.

(2) 렙틴(leptin)

지방세포에서 분비되는 단백질 중 가장 잘 알려진 것은 렙틴이다. 렙틴은 지방조직의 양에 비례하여 증가하는데, 내장지방이 축적되면 중추 및 말초의 렙틴의 내성으로 인해 렙틴의 농도가 상승한다. 장기간 고지방식사를 하면 혈액 내 렙틴이 증가하고 고중성지방혈증이 나타난다. 렙틴이 증가하면 또한 염증지표물질도 증가한다. 따라서 렙틴 발현이 억제되면 AMPK 발현 증가 및 지방산 산화가 증가하고 중성지방 축적이 감소하고 혈중 중성지방 농도가 개선된다.

(3) 아디포넥틴(adiponectin)

아디포넥틴은 지방세포에서 생성되는 247개 아미노산으로 구성된 단백질로, 중성지방 축적을 억제하는 작용을 한다. 아디포넥틴의 발현이 증가하면 지단백질 분해효소의 활성이 높아져 VLDL의 분해를 촉진하고 혈중 중성지방 농도가 저하된다. 아디포넥틴 농도가 증가하면 염증반응의 척도인 $\text{TNF}\alpha$, IL-6, 및 C-reactive protein(CRP)이 감소하게 된다.

(4) 염증 매개 물질($\text{TNF}\alpha$ 또는 IL-6)

고중성지방혈 증은 혈중 유리지방산의 증가를 동반한다. 증가된 혈중 유리지방산은 직접적으로 간세포 및 골격근 세포에 독성을 준다. 간에서의 유리지방산 증가는 사이토크롬 P450 4A와 같은 자유라디칼(free radical)을 생성하는 효소 활성 증가 및 지질 과산화와 $\text{TNF}\alpha$ 와 IL-6등의 염증성 사이토카인 생성을 증가시킨다.

(5) 혈전형성 촉진인자(PAI-1)

지방조직에 중성지방이 과다 축적되면 아디포사이토카인 분비가 증가하는데 특히 혈전형성 촉진인자인 PAI-1의 생산이 촉진되어 혈전증이 나타날 수 있다. PAI-1는 혈관 내피 세포에서 생성되어 혈소판에 저장되는데 혈소판이 활성화 되면 PAI-1 분비가 증가하고 피브린(fibrin)과 단단히 결합하게 되어 혈전 생성이 증가한다.

2. 보건학적 중요성

가. 혈중 중성지방 개선의 의의

중성지방은 체내 효과적인 에너지원으로 공복 시에는 뇌와 적혈구를 제외한 모든 장기의 주요 에너지원으로 사용된다. 그러나 중성지방이 체내에서 과다하게 합성되고 축적되면, 인슐린의 기능을 저해하고, 대사증후군, 당뇨병, 및 심혈관계 질환 등 여러 질병의 발생위험을 높일 수 있다. 고중성지방혈증에 의한 심혈관계 질환의 발병기전은 콜레스테롤과 독립적이다. 즉 콜레스테롤이 낮아도 중성지방이 높으면 심혈관계 질환이 더 잘 발생하므로 혈중 콜레스테롤을 낮추는 것뿐만 아니라 혈중 중성지방을 낮추는 방법이 병행되어야 한다.

당뇨병 환자나 대사증후군 환자의 경우 중성지방 수치가 높으면 심혈관 질환의 발생 위험이 높아지므로 혈중 중성지방 수치를 적정수준으로 유지해야 한다. 성별로는 여성이 남성보다 중성지방 영향을 더 많이 받는다. 여성들은 LDL 콜레스테롤 수치의 높낮이와 상관없이 혈중 중성지방 수치만 높아도 대사증후군 발생 위험이 더 높은 것으로 알려져 있다.

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

혈중 중성지방 개선 기능성을 확인하기 위한 연구유형별 바이오마커는 표 2와 같다.

표 2. 혈중 중성지방 개선 기능성 평가를 위한 바이오마커

구분	바이오마커		측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
혈중 중성지방 변화	공복 혈장 중성지방 농도			○	○
	식후 혈장 중성지방 농도(0-8시간 후)			○	○
	Area under the curve(AUC)/incremental area under the curve(IAUC)			○	○
소화 흡수	중성지방 흡수	췌장 lipase 활성	○	○	
		소장 중성지방 흡수율		○	
		변 중성지방 농도		○	○
	관련 유전자 발현	Fatty acid transport protein 4(FATP4)	○	○	
		Cluster of differentiation 36(CD36)	○	○	
중성지방의 체내 이동	Apoprotein	Apoprotein B 농도		○	○
		Apoprotein CII 농도		○	○
		Apoprotein AI 농도		○	
	Chylomicron	Chylomicron 내 중성지방 농도		○	○
		Chylomicron 내 apoprotein B-48 농도		○	○
	Very Low Density Lipoprotein (VLDL)	VLDL 내 중성지방 농도		○	○
		VLDL 내 apoprotein B-100 농도		○	○
		VLDL-apo B-100 생성률		○	
		VLDL-중성지방 생성률		○	
		Large VLDL(VLDL1)-중성지방 생성률			○

구분	바이오마커		측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
중성 지방 합성	지방산 합성	혈중 포도당농도		○	○
		혈중 인슐린 농도		○	○
		Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 활성	○	○	
		혈중 유리지방산 농도		○	○
		Acetyl-CoA Carboxylase1(ACC1) mRNA 발현	○	○	
		ATP citrate lyase(ACL) 활성	○	○	
		Fatty acid synthase(FAS) 활성	○	○	
	중성지방 합성	Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) 활성	○	○	
		Diacylglycerol acyltransferase(DGAT) 활성	○	○	
		Monoacylglycerol acyltransferase(MGAT) 활성	○	○	
		Phosphatidate phosphohydrolase(PAP) 활성	○	○	
		조직(간, 지방) 중성지방 농도	○	○	
		중성지방 합성율	○	○	
	관련 유전자 발현	Sterol response element binding protein(SREBP1c) mRNA 발현	○	○	
		Liver X receptor(LXR) mRNA 발현	○	○	
		Fatty acid binding proteins(FABPs)	○	○	
		Peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ)	○	○	
		Glucose transporter type 4(GLUT4)	○	○	
중성 지방 분해	중성지방 분해효소	Lipoprotein lipase(LPL) 활성		○	○
		Hormone sensitive lipoprotein lipase (HSL) 활성	○	○	
		Liver hepatic 중성지방 lipase(HTGL) 활성		○	○
		Adipose triglyceride lipase(ATGL) 활성	○	○	
	지방산 산화	Acyl CoA synthetase(ACS) 활성	○	○	
		Carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) 활성	○	○	
		지방산 산화율(fatty acid oxidation rate)	○	○	
		조직 Glycerol release 측정	○	○	
	관련 유전자 발현	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1(PGC-1)	○	○	
		Peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR α)	○	○	
		AMP-activated protein kinase(AMPK)	○	○	
기타	내장비만	허리둘레 또는 허리- 엉덩이 둘레 비			○
		Tumor necrosis factor α (TNF α)농도		○	○
		Interleukin(IL)-6 농도		○	○
		Plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1)		○	○

★ 혈중 중성지방 개선과 관련한 바이오마커 해석 ★

- ✓ 임상에서 혈중 중성지방 개선과 관련한 바이오마커로는 중성지방 수치가 가장 중요함
- ✓ 중성지방 외 다른 바이오마커는 심혈관질환 위험도를 평가하는 지표로 사용되거나, 혈중 중성지방 수치가 감소한 기전을 설명하기 위해서 사용하는 마커로 활용함

나. 바이오마커 설명

(1) 혈중 중성지방 변화

(가) 공복 혈장 중성지방 농도

공복 시 혈중 중성지방 농도는 주로 체내에서 생성된 중성지방(내인성 중성지방)의 농도를 반영하기에 내인성 중성지방을 검사 할 수 있는 지표이다.

(나) 식후 혈장 중성지방 농도

식사로부터 섭취한 지방은 혈중에 CM형태로 순환한다. 따라서 식후 4-8시간의 중성지방 농도는 외인성 중성지방의 변화를 반영한다. 고지방식이 또는 고지방 용액 섭취 후, 중성 지방 농도가 최고치에 이르는 시간이 건강인의 경우 식후 4시간째 이며 그 이후 줄어들어 24시간이 되면 공복시 중성지방 농도와 비슷해진다. 식후 4시간 이후의 중성지방 농도 측정은 공복 지질이 정상인 사람에서서 잠재적인 고중성지방혈 증을 확인할 수 있다.

(다) Area under the curve(AUC)/incremental area under the curve(IAUC)

중성지방의 함량을 수치로 나타낸 값으로 중성지방의 함량의 변화는 AUC면적과 비례하며, 점진적인 중성지방의 변화는 IAUC면적과 비례한다.

(2) 소화와 흡수

(가) 췌장 lipase 활성

췌장에서 소장으로 분비되는 지방가수분해효소(pancreatic lipase)는 중성지방을 지방산과

글리세롤로 분해한다. 췌장 lipase 활성을 억제하면 중성지방의 가수분해를 저해하여 소장 점막을 통한 지방흡수가 억제되므로 중성지방 개선에 도움이 됨을 의미한다.

(나) 소장 중성지방 흡수율

소장에서 중성지방 흡수율은 식이 중성지방이 체내에서 림프관을 통해 어느 정도 흡수되었는지를 나타낸다. 소장 림프순환계로 흡수되는 중성지방의 양이 실험물질에 의해 유의적으로 감소하면 소장 내에서 실험물질이 식이성 중성지방과 함께 투여했을 때 그 소장 중성지방 흡수 억제를 유도하는 것으로 해석한다.

(다) 변 중성지방 농도

변 중성지방 농도는 섭취한 식이지방 중에서 흡수되지 않은 중성지방의 함량을 의미한다. 변의 중성지방 농도가 높은 것은 중성지방 흡수가 저해됨을 의미하므로 혈중 중성지방 개선 효과로 볼 수 있다.

(라) 중성지방 흡수 관련 유전자 발현

TG에서 분해된 중간 사슬 지방산 또는 긴 사슬 지방산을 장관에서 소장내막세포로 수송하는 단백질인 Fatty acid transpoter proteins 4(FATP4), Cluster of differentiation 36(CD36)의 mRNA 발현량 증가는 소장 내막세포 내 지방산이 증가하여 중성지방 합성도 증가를 의미한다.

(3) 중성지방의 체내 이동

(가) 아포지단백질(apolipoprotein) 농도

지단백질 표면에 있는 수용성 단백질을 아포지단백질(apolipoprotein, Apo)이라고 한다. 중성지방 이동에 관여하는 주요 아포지단백질은 ApoA-1, ApoB-48, ApoB-100, 및 ApoCII 가 있다. ApoB-48, ApoB-100의 증가는 중성지방이 주성분인 킬로미크론 또는 VLDL과 같은 지단백질의 증가를 의미한다.

(나) 킬로미크론 내 중성지방 및 apolipoprotein B-48 농도

식사 후에 혈액 내 순환하는 중성지방의 90% 이상은 소장에서 CM으로 분비되므로, 식후 중성지방 농도는 킬로미크론에 존재하는 중성지방농도를 의미한다. 킬로미크론은 중성지방에 아포지단백질인 ApoA-1, ApoB-48와 결합한 지단백질의 형태로 소장에서 생성된다.

(다) VLDL 내 중성지방 및 apolipoprotein B-100 농도

간에서 합성된 중성지방은 다른 조직으로 이동하기 위해서 아포 지단백질인 ApoB-100과 결합하여 지단백질인 VLDL을 생성한다. VLDL내의 중성지방 감소하면 특히 공복시의 혈중 중성지방농도 개선 효과를 기대할 수 있다.

(라) VLDL-ApoB-100 및 중성지방 생성율(production rate)

공복상태에서 혈청 중성지방 함량이 높은 것은 간에서의 중성지방 및 ApoB-100 생성율이 증가했음을 나타낸다. VLDL 내의 중성지방 및 ApoB-100 생성율의 감소는 혈액에 순환되는 중성지방량의 감소를 의미한다.

(마) Large VLDL(VLDL1) 내 중성지방 생성율(production rate)

간에서 분비되는 VLDL 입자는 밀도(0.94-1.06g/ml), 직경(20-75) 및 부유율[Svedberg 부유율(SF) 20-400]에 따라 세분화되는데, VLDL 중에서 가장 크기가 크고 밀도가 가장 큰 것을 VLDL1(large VLDL, SF 60-400)라고 한다. 고중성지방혈증에서는 VLDL1 입자내의 중성지방 생성율을 측정하여 내인성 중성지방 대사의 지표로 사용되고 있다.

(4) 중성지방의 합성**(가) 혈중 포도당 및 인슐린 농도**

고 탄수화물 섭취로 인해 혈중 포도당 농도가 증가하면 인슐린이 분비가 증가하게 되고 잉여 포도당을 피하지방에 저장하여 고중성지방혈증을 유발한다.

(나) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 활성

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)는 dihydroxyacetone phosphate에서 glycerol-3-phosphate(G-3-P)을 생성하는 효소로 G-3-P는 중성지방합성에 필요한 탄소 골격의 기질로 사용된다. GPDH 활성은 중성지방 생성이 증가하면 증가한다.

(다) 혈중 유리지방산 농도

혈중 유리지방산은 간에서 중성지방 및 VLDL 합성에 필요한 기질로 사용되므로, 혈중 유리지방산의 농도는 고중성지방혈증과 관련 있다. 혈청 유리지방산이 증가하면 중성지방 합성 증가되므로 혈중 유리지방산을 감소시키면 혈중 중성지방 개선에 도움이 된다.

(라) Acetyl-CoA Carboxylase1(ACC1) mRNA 발현

ACC1은 아세틸-CoA로부터 말로닐-CoA 합성에 관여하는 효소로 지방산 합성과정에서 속도조절 효소이다. 간에서 ACC1 활성이 감소하면 지방산 생성이 감소하여 혈중 중성지방 농도가 감소한다.

(마) ATP citrate lyase(ACL) 활성

ATP citrate lyase(ACL)은 citrate를 acetyl-CoA로 전환하는 효소로, 생성된 acetyl-CoA는 malonyl-CoA로 전환되어 지방산 합성의 전구체로 사용된다. ACL 활성이 감소하면 지방산 합성이 감소하여 혈중 중성지방 농도가 감소한다.

(바) Fatty acid synthase(FAS) 활성

Fatty acid synthase(FAS)는 acetyl CoA와 malonyl-CoA, NADPH를 사용하여 긴 사슬 지방산(long chain fatty acids)을 합성하는 주요한 효소이다. FAS의 활성이 감소하면 지방산 합성이 감소하고 더 나아가 중성지방 합성이 감소하게 된다.

(사) Glycerol-3-phosphate acyltransferase(GPAT), diacylglycerol acyltransferase (DGAT), monoacylglycerol acyltransferase(MGAT) 활성

GPAT는 glycerol-3-phosphate로부터 lysophosphatidic acid(LPA)를 합성하는데 관여하는 효소로 LPA는 일련의 화학반응을 통해 중성지방으로 합성된다. MGAT는 monoacylglycerol (MAG)과 acyl-CoA를 이용하여 diacylglycerol(DAG)을 합성하는데 이용되는 효소이며 DGAT은 DAG에서 중성지방(TG)를 합성하는 효소이다. GPAT, DGAT, MGAT 활성 감소는 간과 지방조직에서 중성지방 합성이 감소한다.

(아) 간 phosphatidate phosphohydrolase(PAP) 활성

간의 중성지방은 glycerol-3-phosphate 경로에서 합성되며, 이 경로에서는 PAP는 중성지방 합성의 주요 조절효소이다. PAP 활성증가는 간에서 중성지방 합성에 있어 glycerol-3-phosphate 경로에 중요한 조절 역할을 하는 효소이므로 중성지방 합성 경로 기전을 위한 연구 지표로 이용된다.

(자) 조직(간, 지방) 중성지방 농도

간이나 지방에서 중성지방 농도가 높으면, 혈중으로 다량의 중성지방이 유출되므로 혈중 중성지방 농도도 높아진다. 조직에서의 중성지방농도가 감소하면 혈중 TG 농도도 감소한다.

(차) 중성지방 합성 관련 mRNA 발현

LXR은 지방산과 중성지방 합성의 전사인자인 SREBP-1c의 발현을 증가시킨다. SREBP-1c 발현은 지방과 간조직의 lipogenesis에 관여한다. 따라서 LXR의 발현이 감소되면 SREBP-1c 발현이 감소하여 중성지방 합성이 억제되므로 혈중 중성지방 농도가 감소하는 효과가 기대된다. FABPs는 세포막 사이에서 지방산 이동을 촉진하는 지방산 결합단백질들이다. PPAR γ 는 주로 지방 조직에 발현되는 전사인자로 중성지방합성에도 관여하며 지방-FABP(a-FABP) 및 LPL과 같은 단백질 유전자 전사를 유도한다. CD36은 지방세포에서 FABP 및 fatty acid transport protein(FATP)와 상호작용하여 지방산 이동을 촉진시키는 단백질이다. GLUT4는 세포내로 포도당을 수송하는 단백질로, 발현이 증가하면 세포내 포도당의 유입이 증가하여 중성지방 합성도 증가한다.

(5) 중성지방의 분해

(가) 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase, LPL) 활성

LPL은 중성지방을 유리지방산과 글리세롤로 분해시킨다. LPL은 주로 모세혈관내피세포에서 heparin sulfate와 결합하여 존재하는데, LPL은 혈중에는 미량 존재한다. LPL 활성이 증가하면 중성지방 분해가 증가하여 혈중 중성지방농도가 저하된다.

(나) 간 중성지방 리파아제(hepatic TG lipase, HTGL) 측정

HTGL는 중성지방이 풍부한 지단백질에 작용하여 VLDL을 LDL로 전환시키고, HDL 대사에서는 HDL3를 HDL2로 전환시키는 역할을 한다.

(다) Adipose triglyceride lipase (ATGL) 및 호르몬 민감성 지단백질 분해효소 (hormone sensitive lipoprotein lipase HSL) 활성

ATGL과 HSL은 근육이나 고환, 부신 등의 다양한 장기에 분포하긴 하지만, 지방조직에서 주로 활성화 되어 중성지방을 분해하는 효소이다. ATGL과 HSL 활성이 증가하면 체지방에 저장된 중성지방 분해가 증가한다.

(라) Acyl-CoA Synthetase(ACS) 활성

세포내로 유입된 지방산은 ACS에 의해 fatty acyl CoA로 지방산이 활성화되어 지방산 산화의 기질로 사용된다. ACS 활성 증가로 활성화된 지방산을 많이 생산되면 지방산 산화가 촉진된다.

(마) Carnitine Palmitoyl Transferase(CPT) 효소 활성

CPT는 활성화된 지방산이 산화되려면 미토콘드리아의 막(외막과 내막)을 통과해야 하는데, 이 과정을 촉매하는 효소이다. CPT 활성이 증가하면 활성화된 지방산을 세포질에서 미토콘드리아내로 이동시켜 지방산 산화가 촉진된다.

(바) 지방산 산화율(fatty acid oxidation rate)

지방산 산화율은 지방산이 에너지원으로 전환되는 비율을 의미한다. Fat oxidation rate이 증가하면 중성지방이 빠르게 에너지로 이용되어 혈액 중성지방의 농도가 낮아짐을 유추할 수 있다.

(사) 지방 조직 glycerol 함량 측정

중성지방은 가수 분해되어 glycerol과 fatty acid이 되므로, glycerol의 함량이 많아지는 것은, 중성지방의 분해가 증가되었음을 의미한다. 지방은 glycerol과 fatty acid로 분해되므로 glycerol의 함량이 많아지는 것은 지방세포에서 중성지방의 분해가 증가되었음을 의미한다.

(아) 지방산 산화 관련 mRNA 발현

간 또는 근육에서 지방산의 산화 증가 기전 규명을 위해서는 peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1(PGC-1), peroxisome proliferator-activated receptors(PPAR α), AMP-activated protein kinase(AMPK) 유전자 발현을 분석한다. PGC-1 발현이 증가하면 간에서 지방산 산화 증가 및 중성지방 합성 감소가 나타난다. PPAR α 는 주로 간, 심장, 근육, 신장에 발현하여 지방산의 산화와 아포 지단백질의 합성을 조절한다. 간에서 AMP-activated protein Kinase(AMPK) 증가는 SREBP-1c 발현을 감소시킬 뿐만 아니라, SREBP-1c의 표적 유전자를 감소시켜 간에서의 중성지방 합성을 억제한다. AMPK 발현이 증가하면 지방산 산화가 증가하여 중성지방 합성이 억제되는 것으로 해석된다. 또한 AMPK 발현이 증가하면 고혈당 개선에 도움이 되는지 알아볼 수 있다.

(6) 기타 지표

아래 지표들은 혈중 중성지방 개선을 위한 기능성 원료 평가에서 특히 인체적용시험에서 직접적인 평가 기준이 아닌 부가적인 기준으로 사용될 수 있다.

(가) 허리둘레 측정

허리둘레는 내장비만을 반영하는 유용한 지표이다. 허리둘레가 감소하면 혈중 중성지방 농도 저하도 기대할 수 있다. 복부비만의 판정기준은 허리둘레가 남자 90 cm 이상, 여자 85 cm 이상으로 판정한다. 또는 허리-엉덩이둘레 비율(Waist to hip ratio, WHR)로 판정하기도 한다. 허리-엉덩이둘레 비율이란 엉덩이 둘레에 대한 허리둘레의 비율에 의해 복부 비만을 판정하는 지표이다. 계산은 허리둘레를 엉덩이둘레로 나누면 된다. 판정은 WHR이 남자의 경우 0.95 이상, 여자의 경우 0.85 이상이면 복부비만으로 판정한다.

(나) Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), Plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1)

지방조직에 중성지방이 과다 축적되면 아디포사이토카인 분비가 증가하는데 특히 TNF- α , IL-6, PAI-1등의 cytokine이 증가한다. 혈중 중성지방농도 개선은 아디포사이토카인 생성 저하와 연관성을 나타낸다.

2. 주요 바이오마커의 측정방법

가. 혈중 중성지방 변화

(1) 공복 혈중 중성지방 농도

동물시험과 인체적용시험에서 측정가능하다. 동물의 경우, 시험식이 섭취 후 1일 금식 후에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈장을 분리한다. 인체적용시험에서는 최소 10시간 이상 금식한 후에 혈액을 수집하여 혈청 중성지방 농도를 분석한다. 혈청 중성지방농도는 효소비색법(enzymatic colorimetric assay)을 이용한 kit를 사용하여 분석한다. 즉 증류수(blank), 중성지방 표준액, 혈청 시료를 준비한다. 중성지방 및 그 가수분해물들의 반응을 촉매하는 효소들, 즉, lipoprotein lipase(LPL), glycerol kinase(GK), glycerol phosphate oxidase(GPO), peroxidase가 들어있는 중성지방 키트 시약을 첨가하고 혼합한다. 일련의 작용으로 생성되는 키노이드 색소를 550nm에서 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정한다. 생성되는 색깔의 정도는 중성지방의 양과 직접적으로 비례하게 되며 표준액의 흡광도와 비교하여 혈청시료의 중성지방 함량을 계산한다. 공복시 혈청 중성지방은 대부분은 초저밀도 지단백질(very low density lipoprotein, VLDL)에 존재하므로, 공복 혈청 중성지방 함량은 VLDL 함량과 관련 있다.

(2) 식후 중성지방 농도

식후 혈장 중성지방 농도는 동물과 인체에서 측정할 수 있다. 동물시험의 경우 실험동물의 특성에 따라 식후에 시간에 따른 중성지방 최고치(TG peak)가 나타나는 시간이 다르므로 예비실험을 통해 식후에 중성지방 최고치가 나타나는 시점을 찾고, 그 시점 부근에서 식후 중성지방 농도를 측정한다. 토끼를 이용한 동물시험의 경우, 토끼의 식후 혈장 TG 수준은 feeding 시작 후 15-21시간에 최고치가 나타나기 때문에 혈장 샘플은 식후 15-21시간에 걸쳐 귀의 동맥에서 혈액을 채취한다. 식후 혈장 중성지방농도는 키트 시약으로 분석한다.

인체 실험의 경우 최소 10-12시간이상 공복 상태 하에서 표준화된 고지방 용액(standardized fat overload, 25% 유지방 크림 200g 과 난황 50g 이루어짐)을 섭취하게 한다. 섭취 후 8시간 동안 매 시간마다 혈액을 채취하여 중성지방 농도를 효소 비색법으로 측정하여 비교한다. 시험이 완료 될 때까지 음식이나(물 제외) 음료를 제공하지 않는다.

(3) Area under the curve(AUC)

동물시험과 인체적용시험에서 측정 가능하다. 동물시험(wister rats)의 경우 24시간 금식 후에 1.5 mL의 올리브 오일을 구강으로 섭취시키고, 혈액을 0-6시간 동안, 매시간 채취하여 혈장 중성지방 농도를 측정한다. 인체적용시험에서는 실험자를 10시간 이상 금식하게 한 후 카테터를 전주정맥에 배치하고 30분 동안 휴식한다. 혈액 채취한 후에, 시험 식이(고지방식이 또는 지방유제)를 섭취하게 한 후 동안 8시간 동안 시간마다 혈액을 채취하여 중성지방 농도를 측정한다. 혈장에서 측정한 중성지방 농도와 시간간의 곡선을 그리고 그 아래 면적을 사다리꼴 규칙(trapezoidal rule)에 의해 계산한다(단위는 농도 × 시간임). 곡선하에서 증분 영역 (IAUC)측정은 AUC 측정에 이용된 각각의 시간 지점에서 실험 시작 전 75분에 측정한 중성 지방 농도를 감산하여 계산한다. 실험식이의 AUC/IAUC가 대조군 보다 유의적으로 저하되면 중성지방 개선 효과가 있다고 판단한다.

나. 소화와 흡수

(1) 췌장 lipase 활성

시험관 실험에서 췌장 lipase 활성을 측정한다. 돼지 pancreatic lipase 수용액에 버퍼를 첨가하여 효소액을 준비한다. 시험시료를 효소액과 섞어 15분 동안 37°C에서 기질 수용액 (10 mM p-nitrophenyl butyrate, p-NPB)과 함께 배양시킨다. Lipase 활성은 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 p-NPB가 p-nitrophenol로 가수분해 되는 양을 측정하여 계산한다. 계산법은 다음과 같다: 저해율(%) = 1 - (시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 - 시료를 첨가한 반응군의 흡광도)/시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 × 100).

(2) 소장 중성지방 흡수율

동물시험으로 측정하며 실험동물에게 triolein(isotope화된 중성지방)을 경구 투여하고 변으로 배설되는 동위원소를 측정하여 경구로 공급된 동위원소와 변으로 배설되는 동위원소의 비를 비교한다. 소장흡수율 측정모델(intestinal mesenteric lymph duct-cannulated rat model)을 이용하여, 중성지방의 흡수율을 측정할 수도 있다. 실험방법은 위장으로 실험물질을 포함한 지질유화액 triolein, 담즙산 포함)을 투여하고, 동시에 8시간 동안 시간대 별로 림프 순환계로 분비되는 중성지질을 측정한다. 실험동물은 림프관 우회수술(mesenteric lymph ductcannulation surgery)을 하기 전에 16시간 절식시킨 후 실험동물을 개복하여 소장

림프관으로 림프시로 채취관을 수술적인 방법으로 옆구리에 배관한다. triolein의 흡수량은 각 시간별 림프의 triolein의 방사선 활성도와 지질유화액의 제조에 사용된 triolein의 방사선 활성도를 퍼센트 농도(% dose)로 나타낸다.

(3) 변 중성지방 농도

동물시험 및 인체 실험에서 측정 가능하다. 동물시험의 경우 변은 사육기간 마지막 1~5일 동안 수집한 것을 사용한다. 인체적용시험의 경우, 실험식이 기간 완료일 전부터 미리 칭량 플라스틱 용기에 수집한다. 수집한 시료를 60℃ 오븐에서 하룻밤 건조하여 사용한다. 시료 100mg을 클로로포름-메탄올을 사용하여 2분간 균질화한다. 균질액을 원심분리하여 녹지 않은 부분을 제거하고 지질 추출액을 얻는다. 0.9% NaCl 용액을 넣고 수 초간 교반기로 섞은 후 원심분리하여 두 층으로 분리한다. 상층액을 제거한 후 아래층에서 지질을 추출함. 추출된 지질을 에탄올 녹여서 중성지방 분석에 사용한다. 중성지방농도는 분석용 키트를 사용하여 분석한다.

(4) 중성지방 흡수 관련 유전자 발현

실험방법은 다양한 농도의 시험물질에 노출시킨 세포 또는 실험동물 조직에서 RNA를 추출한 후 정량한다. RNA(2ug)에 oligo(dT) primer를 사용하여 FATP4, CD36, 각각의 cDNA를 합성한다. SYBR Green PCR Master Mix, cDNA, primers, 그리고 RNase-free water를 넣고 PCR로 증폭시킨다. Sequence Detector software를 사용하여 Amplification data를 분석한다. Relative mRNA expression 수준은 mathematical formulas를 사용하여 분석한다.

다. 중성지방의 체내 이동

(1) 아포지단백질(apolipoprotein) 농도

동물시험과 인체적용시험에서 공복 또는 식후 혈액을 수집하고 원심분리하여 혈장을 분리한다. 효소결합면역흡착검사(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용한 키트 시약으로 아포지단백질 농도를 측정한다. ApoB-48 측정의 경우 Well plate에 ApoB-48 항체를 넣어 코팅한 후 증류수(blank), ApoB-48 표준액, 시료(혈장)를 각각 넣어 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다. ApoA-1, ApoB-48 항체를 각각 반응시킨 후에

horseradish peroxidase(HRP)와 반응시키고 stop solution을 넣어 반응을 종결시킨다. 450nm 파장에서 흡광도를 측정하고 표준액의 흡광도와 비교하여 시료의 ApoB-48 함량을 계산한다.

(2) 킬로미크론 내 중성지방 및 apolipoprotein B-48 농도

킬로미크론 내 중성지방 및 apolipoprotein A-1, apolipoprotein B-48 농도를 측정하기 위해서는 동물시험(실험쥐의 경우)의 경우 2주 동안 지방 식품/지방 유제를 섭취 후 30분, 90분, 180분, 5시간에 걸쳐 동물꼬리 정맥에서 혈액을 채취한다. 인체적용시험의 경우, 킬로미크론 분획에서 중성지방을 측정하기 혈중 중성지방이 최고치를 나타내는 0~4시간내의 혈액을 채혈한다. 킬로미크론을 분리하기 위해서는 혈액을 먼저 4°C에서 3,500 rpm으로 15분간 원심 분리하여 혈장을 얻는다. 혈장에 밀도 1.019 g/mL KBr 용액을 넣은 후 혈장을 속도 16,000×g로 20분간 초고속 원심 분리하고 상층액을 취하여 킬로미크론을 분리해낸다. 킬로미크론 내의 중성지방과 ApoA-1, ApoB-48 농도는 위에서 서술한 방법으로 측정한다.

(3) VLDL 내 중성지방 및 apolipoprotein B-100 농도

동물시험(SD rat)에서는 실험 기간 내에 장에서 분비되는 apo B-48와 킬로미크론 분비를 억제하기 위해 최소 7시간 공복 상태를 유지시키고, Triton WR-1339의 정맥 주입(600 mg/kg 20% NaCl(w/v))한 후 30분, 90분, 180분, 5시간에 동물의 꼬리정맥에서 혈액을 채취한다. 인체적용시험의 경우 최소 10시간 이상 공복상태에서 혈액을 채혈한다. 혈액을 원심분리한 후 혈장에서 위에 서술한 방법으로 킬로미크론을 분리해낸다. 킬로미크론이 제거된 혈장을 다른 튜브에 옮기고 혈장 위에 밀도 1.006g/ml KBr 용액을 넣고 초고속원심분리(435,680×g, 2시간, 15°C)한 후, 상층액을 취하여 VLDL을 분리해낸다. VLDL 내의 중성지방 및 ApoB-100 농도는 위와 같은 방법으로 측정한다.

(4) VLDL-ApoB-100 및 중성지방 생성율(production rate)

동물시험과 인체적용시험에서 측정한다. 동물시험의 경우 Triton WR-1339 물질을 정맥 주사하면 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase, LPL)의 활성이 억제되므로 VLDL-ApoB 생성율은 시간에 따른 VLDL 내 ApoB 농도에 비례하며, VLDL 내 중성지방 생성율은 VLDL 내 중성지방 농도에 비례한다. 그러므로 시간별 혈장 중성지방 또는 혈장 ApoB-100의 농도를 측정하여 농도-시간 반응식에서 생성률을 계산한다. 동물시험에서는 Triton WR-1339(500

mg/kg) 또는 P-407(1,000 mg/kg)를 주사하고 혈장 TG 농도를 24시간에 걸쳐 측정한다. 일부의 경우, 마우스는 약물을 주사하기 4시간 전에 절식 또는 무 지방(옥수수 플레이크) 다이어트로 전환한다. 그 후에 주사 이전에, 주사 다음 1, 2, 6 및 24시간에서 헤파린이 포함된 튜브에 혈액 샘플을 수집한다.

인체적용시험에서도 측정하는데 실험자에게 지질 유제(intra-lipid, chylomicron-like 중성지방 emulsion)를 섭취시키면 체내 킬로미크론이 합성되며 체내에서 분비되는 지단백질 분해효소(LPL)은 킬로미크론을 우선적으로 분해하여, 혈중 VLDL은 그대로 남아있게 된다. 실험 방법은 10시간 금식 후에 정맥으로 20% 지질유제(0.1 g/kg)을 1분 이내에 정맥 주사하고 그 이후에는 10% 지질유제(0.1 g/kg/h)를 75분 동안 주사한다(LPL에 의한 VLDL제거를 방지하기 위해 75분간 투여함). 주사 후 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 및 75분에 혈액을 채혈한다. 이때 주의할 점은 혈장 샘플에 들어 있는 지질 유제 내 중성지방 농도를 측정하여 보정해 주어야 정확한 VLDL-중성지방 측정이 가능하다. 혈장에서 위와 같은 방법으로 VLDL를 분리하고 시간별로 혈장 VLDL 내 중성지방 농도 및 ApoB 농도를 측정하고 반응식(시간-농도)을 이용하여 기울기를 계산하여 생성률을 계산한다.

(5) Large VLDL(VLDL1) 내 중성지방 생성율(production rate)

Large VLDL(VLDL1)에서 중성지방 생성을 측정하는 방법은 VLDL-TG 생성을 방법과 동일하지만, 혈장 VLDL에서 VLDL1을 분리하여 VLDL1내의 중성지방 농도를 시간별로 측정해야 한다. VLDL에서 VLDL1과 VLDL2의 분리는 누적 밀도구배 초고속원심분리법(ultracentrifugation density gradient technique)에 의해 시행한다. 즉 혈장에 1.019g/mL의 농도의 NaCl 용액을 혼합하고 2시간 동안 초고속원심분리한 후 상층액을 취한다. 총 VLDL 혈장 샘플은 혈장 밀도를 1.118 g/mL 가 되도록 solid NaCl를 첨가하고, 그 후에 다시 1.182g/mL KBr 용액을 첨가하여 밀도를 1.0988-1.0588 g/mL가 되도록 만든다. VLDL1은 혈장 샘플을 초고속원심분리(39,000 rpm, 1시간 20분)한 후 상층액 1.0 mL(밀도 1.0588 g/mL)를 취하면 된다. 상층액 1 mL를 분리 후 다시 밀도 1.0588 g/mL용액을 첨가하여 원심분리(18,500 rpm, 15시간 30분, 23°C)하여 상층액 0.5 g/mL를 취하면 VLDL2가 된다. 인체 적용시험에서의 VLDL1-중성지방 생성을 계산 예시는 다음과 같다. VLDL1-중성지방 생성율 = 기울기 (mg/mL/min) × 혈장 부피(dL, 4% of body mass) × 60분

예를 들어서, 중성지방 기울기 1.0589, 혈장 3.38l 가정하면 VLDL-중성지방 생성율 = $1.0589 \times 33.8 \times 60 = 2.147$ mg/h이다.

라. 중성지방의 합성

(1) 지방산 합성

(가) 혈중 포도당 및 인슐린 농도

고 탄수화물 섭취로 인해 혈중 포도당 농도가 증가하면 인슐린이 분비가 증가하게 되고 잉여 포도당을 피하지방에 저장하여 고중성지방혈증을 유발한다.

(나) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 활성

시험관 시험과 동물시험에서 측정 가능하다. 시험관 시험에서는 시험시료를 처리한 후 지방전구세포(3T3-L1 cell), 또는 간세포(HeG2 cell)를 얼음물 온도로 냉각된 PBS로 두 번 세척한 뒤, cell lysisation buffer를 이용하여 세포단백질을 추출하여 샘플시료로 한다. 동물 시험에서는 시험시료를 섭취한 쥐를 희생하여 간 또는 지방조직을 적출한 뒤, 조직 균질액을 만든다. 균질액을 2회 원심 분리 (10,000 g, 4°C)하여 cytosolic 상층액을 분리하여 샘플 시료로 사용한다. GPDH 활성측정은 100 mM triethanolamine-HCl buffer, pH 7.5, 0.12 mM NADH, 2.5 mM EDTA, 0.2 mM dehydroxy acetone phosphate, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 동일한 양의 단백질을 사용하여 340 nm에서 1분 간격으로 10분간 흡광도 변화를 측정하여 GPDH의 활성을 계산한다. 효소활성 1unit는 1nmol NADH/min이 산화되는 것으로 한다. 단백질 정량은 Bradford법을 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정한 후 단백질 함량을 계산하여 세포 내 총 단백질량을 측정한다.

(다) 혈중 유리지방산 농도

동물시험과 인체적용시험에서 가능하며 금식한 후에 혈액을 수집하고, 원심분리하여 혈청을 준비한다. 혈청 샘플을 효소비색법을 이용한 키트 시약으로 분석한다. 즉 증류수(blank), 유리지방산 표준액, 혈청 시료에 반응액을 첨가하여, 37°C에서 5분간 반응시킨다. 그 후 546nm에서 흡광도를 측정하고 표준액의 흡광도와 비교하여 유리지방산 농도를 계산한다.

(라) Acetyl-CoA Carboxylase1(ACC1) mRNA 발현

시험관 시험과 동물시험에서 측정 가능하다. 시험관 시험에서는 시험시료를 처리한 후 간세포(HeG2 cell)를 plate에 분주하여 후보물질을 함유한 배지에서 48시간 동안 배양한다. 완충용액으로 2회 세척하고, 1시간 동안 완충용액으로 배양한 후, Trizol 시약(또는 RNA 분리 kit)으로 RNA를 추출한다.

동물시험에서는 실험동물을 희생하여 간 조직을 적출하고 균질화 하여 균질액 샘플을 만들어서 샘플안의 총 RNA를 추출한다. 샘플별로 추출한 RNA 함량을 동일하게 맞춘다. 추출한 RNA를 oligo(DT) primer 이용하여 cDNA를 합성한다. 실험동물의 종에 맞추어 ACC1 primer를 제작한다. 제작된 primer에 맞추어 반응온도와 cycle을 조절하여 quantitative RT-PCR을 실시하여 ACC1 유전자의 발현 양을 정량한다. 이때 endogenous control 유전자로 normalization한다.

(마) ATP citrate lyase(ACL) 활성

시험관 시험과 동물시험에서 측정 가능하다. 시험관 시험에서는 시험 물질을 처리한 간 세포를 PBS로 두 번 세척한 뒤, 효소 추출 완충용액을 첨가하고 원심분리하여 상층액을 얻어 실험 샘플로 한다.

동물시험에서는 간 균질액을 실험샘플로 준비한다. 준비된 실험 샘플은 기질용액(20 mM citrate, 0.5 U/mL malic dehydrogenase(MDH), 0.33 mM CoASH, 0.14 mM NADH)을 첨가하여 두 세트로 준비한다. 한 세트에는 5 mM ATP를 첨가하고, 나머지 한 세트에는 ATP를 첨가하지 않는다. ACL 촉매 반응에 의해 생성되는 옥살아세트산(oxaloacetate)의 수율은 37°C에서 MDH-촉매반응에 의해 소비된 NADH의 양을 340 nm의 흡광도의 변화로서 측정한다. ATP를 첨가하지 않은 시료(대조군)의 흡광도 값을 감산한 후, ACL 활성 (U/mg/min)은 추출물의 총 단백질 농도로 보정하여 계산한다.

(바) Fatty acid synthase(FAS) 활성

시험관 시험과 동물시험에서 측정 가능하다. 시험관 시험에서는 시험 물질을 처리한 간 또는 지방세포를 PBS로 두 번 세척한 뒤, 효소추출 완충용액을 첨가하고 원심분리 하여 상층액을 얻어 실험 샘플로 한다. 동물시험에서는 조직 균질액을 원심분리하여 cytosolic 상층액을 실험 샘플로 준비한다. 실험 샘플에 효소원(β - mercaptoethanol, acetyl-CoA, malonyl-CoA, NADPH)을 순서대로 넣고 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 4분간 흡광도를 측정한다. 효소원의 단백질 농도를 측정하고 효소활성은 1분당 단백질 1 mg이 생성하는 NADPH의 양(nmol/min/mg protein)으로 나타낸다.

(2) 중성지방 합성효소

(가) Glycerol-3-phosphate acyltransferase(GPAT), diacylglycerol acyltransferase (DGAT), monoacylglycerol acyltransferase(MGAT) 활성

실험관 실험에서 microsome 샘플 준비는 시료가 처리된 세포(간 세포 및 지방전구세포)를 세척하여 microsomal buffer A(250 mM sucrose, 10mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA)를 넣고 균질화한다. 균질액을 $600\times g$, 15분 및 $4^{\circ}C$ 에서 원심분리하여 상층액을 취하고, 이를 다시 $100,000\times g$, 60분 및 $4^{\circ}C$ 에서 원심분리하여 microsome 분획을 분리한다. 수집된 microsome 분획을 microsome buffer B(250 mM sucrose, 10 mM Tris(pH 7.4)에 재현탁하고 샘플안의 단백질의 농도를 측정된 후에 샘플로 사용한다.

동물 시험에서 micorsome 샘플 준비를 위해 실험동물의 조직(지방 복막, 간, 소장)을 분리하여 세척하고, 장 점막은 핀셋으로 긁어서 수집한다. 간 및 지방 조직은 가위를 이용하여 작은 조직 조각으로 절단한다. 조직들을 microsomal buffer A로 세척한 후에 균질화한다. 이 균질액을 $4^{\circ}C$, $14,000\times g$ 에서 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻는다. 상층액은 $100,000\times g$ 에서 1시간 동안 원심 분리하고 얻어진 침전물은 microsome buffer B를 첨가하여 현탁액을 만든다.

GPAT 효소 활성 측정을 위한 효소 기질 반응액으로는 palmitoyl-CoA와 [^{14}C] glycerol-3-phosphate(G-3-P)를 사용한다. DAGT 실험에는 기질 반응액으로 1,2-dioleoylglycerol과 [^{14}C] palmitoyl-CoA를 첨가한다. MAGT 실험에서는 기질반응액으로 2-monoolein과 [^{14}C] palmitoyl-CoA를 사용한다. 실험 순서는 기질 반응액에 시험 시료 및 2mM N-Ethylmaleimide (NEM)을 첨가하여 15분간 반응시킨다. mitochondrial protein을 넣은 다음 $26^{\circ}C$ 에서 20분 동안 반응시킨 후, stop solution 1ml를 가하여 반응을 정지시킨다. 생성된 [^{14}C]을 분리하여, 수용성 liquid scintillation counter (LSC) cocktail을 첨가한다. 생성된 방사능의 양을 측정하여 대조군과 비교하여 GPAT의 효소 활성 저해율(% inhibition)을 계산한다. MAGT와 DAGT도 기질 반응액을 달리하여 동일한 시험 방법으로 분석한다.

(나) 간 phosphatidate phosphohydrolase(PAP) 활성

시험관 시험과 동물시험에서 측정 가능하며, PAP 활성 측정을 위해 microsome 분획 샘플을 위에 서술한 방법으로 실험 세포 및 실험동물 조직에서 준비한다. PAP의 기질 반응액으로 0.05 M Tris-HCl(pH 7.0), 1.25 mM Na_2 -EDTA, 1.0 mM $MgCl_2$, 1 mM phosphatidate, phosphatidylcholine을 이용하고 효소원으로 간 microsomal protein 시료를 가하여 반응을 시작한다. $37^{\circ}C$ 에서 15분간 반응시키고, stop solution을 가하여

반응을 정지시킨다. 샘플액에 1.25% ascorbic acid, 0.32% ammonium molybdate, 0.13% sodium dodecylsulfate를 가하여, 45℃에서 20분간 가온 발색시킨 후 820 nm에서 흡광도를 측정한다.

(다) 조직 (간, 지방) 중성지방 농도

시험관 시험에서는 시험물질을 처리하여 배양한 세포를 harvest한 후 원심분리용 tube로 옮긴다. 원심분리하여 배양액을 제거하고, 0.5 mL의 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.4를 pellet에 첨가하여 2번 세척한다. 세포 내 지질을 chloroform-methanol 2:1 (v/v)로 추출한 후 원심분리 후 상층액을 취하여 용매를 질소 가스로 날려버린 후 10% Triton X-100을 함유한 2-propanol에 녹인다. 상층액에서 중성지방 농도는 분석용 kit를 사용하여 분석하고 total cell protein에 대한 농도로 나타낸다.

실험동물의 간 또는 지방조직에서 중성지방을 측정하기 위해서는 조직 균질액을 사용한다. 균질액을 원심분리하여 분리된 시료의 물층과 조직은 버리고 맨 아래 CHCl₃층만을 분리한다. 감압수기를 아래에 놓고 그 위에 깔대기와 거름종이를 올리고 sodium sulfate를 넣은 다음 분리한 CHCl₃ 층을 넣어 수분을 제거하며 걸러준 다음 감압 농축기를 이용하여 용액을 모두 날린다. 감압수기의 무게를 측정한 후 chloroform으로 감압수기의 지질을 용해한다. 용해한 지질중 중성지방 함량은 효소비색법을 이용한 kit 시약을 사용하여 분석한다.

(라) 중성지방 합성율(production rate)

중성지방 합성율은 동위원소를 이용하여 세포 또는 조직에서의 citrate cleavage enzyme, acetyl-CoA carboxylase와 fatty acid synthetase 활성을 측정하여 기질에서 중성지방으로의 전환비율을 이용하여 계산한다. 시험관 시험에서 세포에 표지된 5 μ Ci/ml [³H]oleate 용액을 첨가하여 CO₂ incubator에서 배양한다. 1시간 후 배양액을 버리고, 세포를 ice-cold PBS로 잘 세척하고 2M NaOH를 첨가하여 세포를 떨어뜨리고 지질의 비누화가 일어나도록 1시간 동안 95℃에서 배양한다. Recovery marker로 [³H]oleate (20,000dpm/시료)을 첨가하고 지질을 chloroform- methanol 2:1(v/v)로 추출한다. Thin layer chromatogram(TLC)에서 지질을 분리한 후 중성지방에 해당하는 밴드를 긁어서 scintillation vial에 넣고 측정한다. 결과는 단백질 당 영입된 oleate농도(nmoles oleate incorporated/mg protein)으로 나타낸다.

동물시험에서는 실험동물(Sprague-Dawley rats, 200~300 g; C57Bl/6J mice, 16~18 g)에게 water를 2.5% 체수분량(body water, 체중의 60%가 수분이라 가정함)이 되도록 꼬리정맥 또는 복강내 주사하고 그 후 12주 동안 마시는 물에 4% water를 넣어 사육한다. 12주 후에 간 또는 지방 조직을 추출하여 이중 유리 조직 분쇄기에 넣고 methanol-

chloroform(2:1) 용액으로 균질화시킨 후 원심 분리하여 단백질을 제거한다. 단백질이 제거된 추출물을 chloroform과 증류수로 추출한다. 수용성 분획은 버리고 지방산을 에스테르화하기 위해 지질분획을 3N methanolic HCl으로 60분간(55°C) 처리한다. 지방산 메틸 에스테르를 글리세롤로부터 분리하여 수용성 분획(글리세롤 함유)을 동결 건조하고, 글리세롤을 acetic anhydride-pyridine(2:1)으로 처리하여 글리세롤 트리아세테이트로 전환시킨다. 일부 샘플을 추출하고 박층크로마토그래피(TLC)에 의해 다른 acylglycerides로부터 중성지방을 분리한다. 중성지방은 상업용 키트 시약으로 분석한다.

(3) 중성지방 합성 관련 mRNA 발현

간세포 및 간 조직에서는 sterol response element binding protein(SREBP1), fatty acid binding protein(FABP), cluster of differentiation 36(CD36)의 mRNA 발현을 측정한다. 지방세포 및 지방조직에서는 peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ), adipocyte fatty acid binding protein(aP2), glucose Transporter type 4(GLUT4)등의 mRNA 발현을 측정한다.

실험방법은 다양한 농도의 시험물질에 노출시킨 세포 또는 실험동물 조직에서 RNA를 추출한 후 정량한다. RNA(2ug)에 oligo(dT) primer를 사용하여 SREBP1, FABP, CD36, PPAR γ , aP2, GLUT4 각각의 cDNA를 합성한다. SYBR Green PCR Master Mix, cDNA, primers, 그리고 RNase-free water를 넣고 PCR로 증폭시킨다. Sequence Detector software를 사용하여 Amplification data를 분석한다. Relative mRNA expression 수준은 mathematical formulas를 사용하여 분석한다.

마. 중성지방의 분해

(1) 지단백질대사에 관여하는 주요 효소

(가) 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase, LPL) 활성

① post-heparin 혈장에서 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase, LPL) 활성

LPL은 중성지방을 유리지방산과 글리세롤로 분해시킨다. LPL은 주로 모세혈관내피세포에서 heparin sulfate와 결합하여 존재하는데, LPL은 혈중에는 미량 존재한다. heparin 정맥 주사하여 LPL을 혈중으로 다량 유리시킨 후에 일반적으로 LPL활성을 측정한다. 동물 시험 및 인체적용시험에서 측정한다. 실험동물에서는 동물을 절식시킨 후 헤파린을 정맥 주사하고 10분 후 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈장을 얻는다. 인체 실험의 경우, 공복 상태에서 heparin을 체중 1kg 당 30 단위로 정맥주사하고, 15분 후에 채혈한다. 2 mM glycerol-tri[9,10 (n)-³H] oleate, 189ng/ml L- α -포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 14 mg/mL 소혈청 알부민(Bovine serum albumin, BSA), 140 mM Tris-HCl(pH 8.0), 15% glycerol, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)으로 기질 용액을 준비한다. LPL 활성을 측정하기 위해서는 hepatic 중성지방 lipase(HTGL)활성을 억제하는 sodium dodecyl sulfate 를 50 mmol/L을 기질 용액에 첨가하고 혈장을 섞어 37°C에서 30분간 배양한다. stop solution으로 반응을 종결시킨 후에 메탄올/클로로포름/헵탄을 넣고 섞고 원심분리한다. 상층액을 취하여 ACS II을 넣고 섬광 계측기로 방사능값을 측정한다. LPL 활성은 혈장 1 mL 당 1시간 동안 생성된 유리지방산(올레산)의 농도($\mu\text{mol/h/mL}$)로 나타낸다.

② Pre-heparin 혈장 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase, LPL)

Pre-heparin 혈장에서 지단백질 분해효소 측정은 공복시에 혈액을 채취하고 혈장을 분리하여 위와 동일한 방법으로 혈장 지단백질 분해효소 효소 활성을 측정한다. post-heparin 혈액에서는 지단백질 분해효소 다량 유출되는 장점이 있으나 단시간(급성) 고지방식이 등의 평가에는 제한점이 있다. heparin을 투입하지 않은 pre-heparin 혈액에는 LPL이 미량 존재한다. 그러나 pre-heparin 방법은 heparin 때문에 일어날 수 있는 여러 지질 수준의 교란, 즉 헤파린-유도 혈액 응고, 헤파린 투여로 인한 조직 복원 대응 지연 및 헤파린에 의한 지방 분해 등의 문제점을 최소화 할 수 있는 장점이 있다.

(나) 간 중성지방 리파아제(hepatic TG lipase, HTGL) 측정

LPL 효소 활성 측정과 같은 방법으로 동물시험과 인체적용시험에서 혈액을 수집하고 HTGL 효소 활성을 측정한다. 실험방법은 LPL측정방법과 동일하나, HTGL 측정에서는, 혈장에서 LPL 활성을 억제하기 위해 tris buffer, pH 8.8(0.75 mol/L NaCl 포함)를 기질용액에 첨가하여 배양한다. 혈장에서 총 리파아제 활성(total plasma lipolytic activity(PLA)는 LPL 활성과 HTGL 활성을 합하여 계산한다.식이 물질이 내피 지방 분해 효소에 영향을 주는지 아니면, 췌장 지방 분해효소에 의한 것인지를 구분하기 위해서는 pre-heparin 및 post-heparin 혈장에서 리파아제 측정이 필요하다. 만약 실험물질과 대조군의 섭취에 pre-와 post-heparin에서 측정한 리파아제 활성에 차이가 없고, 췌장 lipase 활성만 증가했다고 가정하면 중성지방 개선 효능은 췌장 중성지방 소화 억제와 관련이 있다고 해석한다.

(다) Adipose triglyceride lipase (ATGL) 및 호르몬 민감성 지단백질 분해효소 (hormone sensitive lipoprotein lipase HSL) 활성

실험동물의 지방 조직(100mg)을 4℃에서 균질화시킨 후 원심분리하여 지방부분을 제거한 무지방 샘플액에서 ATGL과 HSL 효소활성을 측정한다. 기질용액으로(1(3)-mono-[³H]oleyl-2-oleoyl glycerol과 L- α -phosphatidylcholine, BSA, Tris-HCl (pH 8.0), 15% glycerol, 10% FBS을 혼합하고 37℃에서 30분간 배양한다. 0.1M potassium carbonate-borate buffer를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 메탄올/클로로포름/헵탄을 넣고 방사능 표시된 유리 지방산을 분리한다. 상층액을 취하여 섬광 계측기로 방사능값을 측정한다. ATGL과 HSL 활성은 1 nmol 유리 지방산 생성 값을 의미한다. ATGL과 HSL 활성은 시료 중의 총 단백질 농도와도 관련이 있으므로 단백질량으로 보정해야 한다.

(2) 지방산 산화

(가) Acyl-CoA Synthetase(ACS) 활성

실험관 실험과 동물시험에서 측정이 가능하다. 시험관 시험에서는 시험 물질을 처리한 간 또는 지방세포를 PBS로 두 번 세척한 뒤, 효소추출 완충용액을 첨가하고 원심분리 하여 상층액을 얻어 실험 샘플로 한다. 동물시험에서는 일정량의 조직을 잘게 조각을 낸 후, 차가운 균질화 완충용액(homogenization buffer)를 넣고 균질기를 사용하여 균질화시킨다. 균질액을 원심 분리하여 상층액을 샘플로 사용한다.

ACS의 활성 측정은 샘플에 기질 반응액(200 mM tris 완충액, 14.5 mM adenosine 5'-triphosphate 용액(ATP), 42.7 mM phospho(enol) pyruvate 용액(PEP), 72 units/mL myokinase 효소(MK), 120 units/mL PK/LDH 혼합된 효소들, 49 mM Coenzyme A 5.3 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form solution (β -NADH))을 넣고 잘 섞은 후 ACS 용액, 0.25%(v/v) Triton-100, 0.98 mM sodium oleic 용액을 넣고 다시 한 번 잘 섞은 후 큐벳에 옮겨 340nm에서 ACS 농도 변화를 측정한다. ACS 활성은 units/mg protein으로 나타내었다.

(나) Carnitine Palmitoyl Transferase(CPT) 효소 활성

실험관 실험에서는 간세포를 10% BSA가 들어있는 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세정 한 후, 기질 배양액 [50 mM imidazole, 70 mM KCl, 80 mM sucrose, 1 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Kaliumcyanid, 1 mM ATP, 0.1% fatty acid-free BSA, 70 μ M palmitoyl-CoA, 0.25 μ Ci l-[methyl- ^{14}C]-carnitine, and 40ug digitonin]에서 37°C에서 6분 동안 배양한다. 배지에 과염소산(perchloric acid)를 첨가하여 반응을 정지 시킨 후, 세포를 수확하여 원심 분리한다. pellet을 deionized H_2O 에서 재현탁하고 부탄올로 추출한다. 부탄올에 함유된 l-[methyl- ^{14}C]-carnitine를 정량하여 아실 카르니틴 유도체(amount of acylcarnitine derivative)의 양을 나타낸다.

동물시험에서는 동물에서 간 및 근육조직을 적출하고 Tris buffer로 균질화한다. 조직에서 미토콘드리아 분획을 분리하여 샘플로 사용한다. 측정방법은 미토콘드리아 분획물을 기질 배양액에서 4분 동안 25°C에서 배양한다. 배양 후에 배양액에 1 μ Ci (0.4 μ mol) of l-[methyl- ^{14}C]-carnitine를 첨가하여 4분간 반응시킨다. 반응액에 차가운 1 N 염산을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 배양액에 들어있는 l-[methyl- ^{14}C]-carnitine양을 부탄올로 추출하고 대조군과 비교하여 CPT % 활성도를 표시한다.

(다) 지방산 산화율(fatty acid oxidation rate)

시험관 시험에서는 세포에 시험시료를 처리하여 2시간 배양 후 배지를 제거하고, 세포를 완충용액(114 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM $MgSO_4$, glucose 11 mM)으로 30분간 배양한다. 배양 후에 세포를 다시 기질 용액(114 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM $MgSO_4$, glucose 11 mM, 2.5 mM palmitate(알부민과 결합된 10 mCi of [1- ^{14}C] palmitate)과 0.8 mM L-카르니틴을 첨가하고 2시간 배양한다. 2시간 후 배양액에 benzothionium hydrochloride를 첨가하여 $^{14}CO_2$ 를 방출하게 하고 바로 배양액에 7% perchloric acid을 첨가해 반응을 정지시키고 benzothionium 염산염을

제거하고 측정된 ^{14}C 의 양을 액체섬광계수기를 통해 분석한다.

동물시험의 경우 실험동물의 위에 관을 삽입하여 $[1-^{14}\text{C}]$ palmitate(2.94 mmol /kg)을 투입한 후에 날숨을 통해 분비되는 CO_2 를 24시간 동안 수집한다. 지방산 산화율은 24시간 동안 수집한 ^{14}C 양을 계산한다. 액체섬광분광계수가 높을수록 많은 양의 ^{14}C 가 배출되었음을 의미하므로, palmitate 지방산이 활발히 산화되었음을 의미한다.

(라) 지방 조직 glycerol 함량 측정

시험관 시험과 동물시험에서 측정 가능하다. 시험관 시험에서는 분화된 3T3-L1 세포에 시료를 처리한 후 48시간 배양한 배지를 튜브에 넣고 70°C 에서 10분간 가열하여 세포로부터 유리된 효소들을 불활성화 시킨다. 배지에 glycerol reagent에 첨가하여 1분간 반응시킨 후 큐벳에 옮겨 넣고 흡광도를 540 nm에서 측정한다. 이때 단백질량을 Bradford 방법으로 정량하여 세포수를 보정한다.

동물시험에서는 CD36 null 마우스의 부고환 지방 패드를 작은 조각(<4 mm)로 절단하여 즉시 세척하고 버퍼(129 mM의 NaCl, 5 mM의 NaHCO_3 , 4.8 mL KCl, 1.2 mM의 KH_2PO_4 , 1.2 mM의 MgCl_2 , 2.8 mM의 glucose, 10 mM의 HEPES, pH 7.4)에 옮긴다. 1시간 동안 세포 배양기에서 배양하고, 배지에서 방출되는 glycerol양을 위와 같은 방법의 kit 시약으로 측정한다. 540 nm에서 흡광도의 증가는 배지 내에서 glycerol 농도 증가를 나타낸다.

(3) 지방산 산화와 관련된 mRNA 발현

실험방법으로는 먼저 간 또는 근육 조직에서 total RNA를 Trizol reagent(또는 RNA extract kit)을 이용하여 추출하고, 순도 및 함량을 확인한다. 추출한 RNA, oligo(dT) primer, dNTP, reverse transcriptase, RT buffer, RNase inhibitor, RNase free water를 이용하여 cDNA를 합성한다. PCR 튜브에 합성한 cDNA(PGC-1 α , FXR, PPAR α , HNF 4 α)의 forward primer와 reverse primer, SYBR Green PCR Master mix(또는 Taqman)를 첨가한다. 제작된 primer에 맞도록 반응온도와 cycle을 조절하여 quantitative RT-PCR을 실시한다. Ct(critical threshold)값을 normalization한 다음 상대적 비율을 비교하여 PGC-1 α , FXR, PPAR α , HNF 4 mRNA 발현 정도를 측정한다.

간과 근육에서의 AMP-activated protein kinase(AMPK) 유전자 발현 측정은 특히 고중성지방과 고혈당의 공통 기전 연구에 대한 바이오마커로 유용하고, GLUT4, SREBP1c, FAS, PPAR α , adiponectin 등의 유전자 발현도 같이 측정한다. AMPK의 유전자 발현은 위에 제시한 방법으로 측정한다.

바. 기타 지표

아래 지표들은 혈중 중성지방 개선을 위한 기능성 원료 평가에서 특히 인체적용시험에서 직접적인 평가 기준이 아닌 부가적인 기준으로 사용될 수 있다.

(1) 허리둘레 측정

허리둘레는 줄자로 쉽게 측정할 수 있으나 해부학적 부위에 따라 차이가 있을 수 있다. 복부비만의 판정기준은 허리둘레가 남자 90 cm 이상, 여자 85 cm 이상으로 판정한다. 또는 허리-엉덩이둘레 비율(Waist to hip ratio, WHR)로 판정하기도 한다. 허리-엉덩이둘레 비율이란 엉덩이 둘레에 대한 허리둘레의 비율에 의해 복부비만을 판정하는 지표이다. 계산은 허리둘레를 엉덩이둘레로 나누면 된다. 판정은 WHR이 남자의 경우 0.95 이상, 여자의 경우 0.85 이상이면 복부비만으로 판정한다.

(2) Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), Plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1)

효소결합면역흡착검사(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용한 키트 시약을 사용하여 혈액의 TNF- α 농도, IL-6 농도 및 PAI-1 측정한다. 동물시험과 인체적용 시험에서 공복 혈액을 수집하고 혈장을 분리하여 시험 시료로 사용한다. 즉 각각의 항체로 코팅 되어 있는 plate에 시료를 넣어 반응시킨 후, 각각의 항체를 반응시킨다. 이후 horseradish peroxidase(HRP) 효소를 넣어 반응시키고, HRP 효소에 대한 기질로 TMB 용액을 넣어 TMB 기질 용액을 넣고 실온에서 11~21분간 반응시킨다. Stop solution(황산)을 넣어 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450 nm에서 흡광도로 측정한다. 표준액의 흡광도와 비교하여 시료의 TNF- α , IL-6, 및 PAI-1 변화를 계산한다. 흡광도가 높을수록 아디포사이토카인의 함량이 높음을 의미한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관시험

(1) 시험계

혈중 중성지방 개선 효과를 확인하기 위하여 인간 간암세포주인 HepG2 세포주와 비만 세포주인 3T3-L1을 사용한다. HepG2 세포주는 정상 세포주에 비해 간 기능이 불완전하여 낮은 대사활동 및 간에 활성을 보이는 시토크롬450 시스템 관련 효소의 낮은 활동으로 인해 중성지방의 개선에 대한 효과를 간세포 기능에 의한 영향을 받지 않고 확인할 수 있는 장점이 있다. 3TS-L1 세포주는 중성지방의 합성 및 축적을 증가되어 중성지방에 증가와 감소를 확인하기에 용이하다.

(2) 바이오마커

원료의 중성지방 개선을 평가하기 위해 예상되는 대사 경로에 위치하고 있는 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 동물시험

(1) 실험동물

혈중 중성지방 개선 효과를 확인하기 위하여 4-9주령 수컷 C57BL/6 mice를 많이 사용한다.

(2) 시험설계

실험동물을 대상으로 식이에 혼합하여 시험물질을 공급하거나, 강제경구 투여할 수 있다.

(3) 바이오마커

혈장 중성지방, 조직(간, 지방)에서의 중성지방 등 다양한 바이오마커를 측정할 수 있다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

다. 인체적용시험

(1) 시험대상

(가) 시험대상자(예시)

공복 시 혈중 중성지방 농도가 정상(150 mg/dL 미만)에서 경계(150~199 mg/dL) 수준에 속하며 약물을 복용하지 않는 자를 대상으로 한다.

* 공복 시 혈중 중성지방 농도가 높음 수준(200~499 mg/dL)에 속하는 자가 일부(윤리적으로 허용되는 범위) 포함될 경우 약물을 복용하거나 약물 처방이 필요한 자는 반드시 제외되어야 함

(나) 대상자 제외기준(예시)

- 첫 번째 방문 전 8주 이내에 지질 대사에 영향을 주는 약물이나 건강기능식품을 지속적으로 복용한 대상자
- 다음의 질환이 있는 대상자
 - ① 심근경색, 뇌졸중, 조절되지 않는 고혈압 환자($\geq 160/100$ mmHg)
 - ② 당뇨병(공복혈당 ≥ 126 mg/dL)으로 진단받고 약물 복용중인 경우 또는 선별 검사에서 공복혈당 126 mg/dL 초과로 확인된 경우
 - ③ 간기능 장애 (AST, ALT 정상 상한치의 3.0배 이상 상승)
 - ④ 신기능 장애 (Creatinine 정상 상한치의 1.5배 이상 상승)
 - ⑤ 갑상선 기능항진증 및 기능저하증
 - ⑥ 악성종양
- 가족성 고콜레스테롤혈증이 있는 자
- 첫번째 방문 전 4주 이내에 임상시험에 참여한 자

- 알코올의존성 확인을 위한 설문도구인 AUDIT-K에서 알코올 중독이 의심되는 점수가 확인된 경우
- 임신부 및 수유부
- 연구자가 본 시험에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 기타 경우 또는 질환
- 3개월 이내 임상 시험자

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다.

(3) 바이오마커

혈장 중성지방 등 다양한 바이오마커를 측정할 수 있다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

IV

참고문헌

1. 건강기능식품 플랫폼 <http://hfplatform.kfri.re.kr>
2. 곽한식 외. 생화학 제6판 라이프사이언스, 2010
3. 길주현, 이정아, 김지영 외. 비만아에서의 leptin, adiponectin, interleukin-6, tumornecrosisfactor에 대한 연구. 대한소아학회지 51(6): 597-603, 2008
4. 김동립, 송기호, 김숙경 외. Lovastatin이 골격근 세포의 지방산 산화에 미치는 영향. Korean J Med 72(6): 600-606, 2007
5. 김민수, 김보연, 박찬선 외. 백자인 추출물에 의한 pancreatic lipase의 저해 효과. J Life Sci 16(2): 328-332, 2006
6. 김보배, 현창기. 고지방식이 유도 비만 마우스에서 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*)의 지방축적 억제 및 인슐린 저항성 개선 작용. 생약학회지 46(1): 65-71, 2015
7. 김성진, 이정은, 이성호 외. 고중성지방혈증 환자에서 Lipoprotein(a) 농도에 대한 피브린산 유도체 효과. Korean Circulation J 35: 30-36, 2005
8. 김숙희 외. 고급영양학. 라이프사이언스, 2009
9. 김지혜, 박정진, 전우진. 발효율금 주정추출물부터 분리된 에틸아세테이트 분획물에 대한 3T3-L1 세포에서의 지방 형성 억제 효과. 한국식품영양과학회지. 43(11): 1681-1687, 2014
10. 박미영, 장환희, 이진영 외. 고지방식으로 유도한 지방간 마우스에서 기장 첨가식이 지방간 및 인슐린 저항성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 41(4): 501-509, 2012
11. 박정은, 기희진, 차연수. C57BL/6J Mice에서 스테비아(*Stevia rebaudiana bertonii*) 잎 추출물의 항비만 효과. 한국식품과학회지 42(5): 586-592, 2010
12. 박재규, 차재영, 전병선 외. 치커리 물 추출물이 흰쥐의 혈청중성지질 및 Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) 활성에 미치는 영향. J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 29(3): 518-524, 2000
13. 배장호, 김권배, 이희자 외. 정상인과 관동맥 질환자에서 고지방 식이후 고중성 지방혈증의 비교 : 식후 고중성 지방혈증의 의의와 Fibrate의 효과. Korean Circulation J 29(7): 680-687, 1999
14. 서동주, 김태혁, 김현숙 외. 회향종자(*Foeniculi fructus*)의 물 추출물이 비만과 관련된 지질 대사 효소의 활성에 미치는 효과. 연구논문 24(2): 181-188, 2011
15. 서윤정, 김주연, 노상규. 흰쥐 모델에서 Capsaicin이 소장 콜레스테롤 및 중성지방 흡수율에 미치는 영향. Korean Soc Food Sci Nutr 38(12): 1712-1717, 2009
16. 신미경, 한성희. 대나무잎 추출물이 지방 및 콜레스테롤 식이 급여에 의한 흰쥐의 지방대사에

- 미치는 효과. 한국식문화학회지 25(4): 560-567, 2002
17. 왕수경, 윤은영, 임영희. 난소화성 텍스트린이 흰쥐의 장기능 및 혈청 지질에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 25(4): 560-567, 1996
18. 이막순, 김애정, 전용필 외. Ginsenoside Rg3가 지방세포 분화과정에서 Adipocyte Fatty Acid Binding Protein mRNA 발현과 Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase 활성화에 미치는 효과. Korean J Lipidol 21: 67-75, 2011
19. 이민희, 남다운, 김옥경 외. 분화된 3T3-L1세포에서 잣송이 초임계 추출물의 지방분해효과. 한국식품영양과학회지 43(9): 1342-1348, 2014
20. 이상국, 한진수, 박용준 외. 홍삼물 추출액의 사포닌 함량 및 맛의 증진을 위한 추출조건. 한국작물학회지 54(3): 287-293, 2009
21. 장미, 김연주, 민진우 외. 산수유로부터 gallicacid 추출 및 HPLC에 의한 정량분석. 한국식품과학회지 14(5): 498-502, 2009
22. 장영선, 정종문. 고지방식이로 유도된 비만쥐에서 식물 혼합추출물의 체지방형성 및 혈청지질에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 39(10): 1439-1445, 2010
23. 전해정, 고정해, 정혜숙 외. 제2형 당뇨병환자에 오메가-3지방산 투여후 저밀도지단백분획, 아디포넥틴 및 아포지단백 B의 변화. Endocrinology and metabolism 26(3): 218-224, 2011
24. 정준호. 식약처 기능성 평가 가이드라인-혈행관련 기능성 시험. 2004
25. 조영숙, 장은미, 장선미 외. 포도씨 열수추출물이 고지방식이로 유도한 비만마우스의 지질대사와 적혈구 항산화 방어계에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 36(12): 1537-1543, 2007
26. 조흥근. 중성지방의 중요성 Korean Society for Health Promotion and Disease Prevention. 대한임상건강증진학회 추계학술대회 S334-S336, 2006
27. 차승운, 장자영, 이유현 외. 분화된 3T3-L1 세포에서 수세미오이 메탄올 추출물의 지방분해 효과. J Korean Soc Food Sci Nutr 한국식품영양과학회지 39(6): 813-819, 2010
28. 최철수. 인슐린 저항성의 치료전략. 차대한내분비학회지 24(2): 65-74, 2009
29. 한기훈. 오메가 3-지방산과 중성지방. 대한내과학회지 83(6): 722-726, 2012
30. Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC et al. Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Trends Cardiovasc Med 5: 170-176, 2001
31. Adiels M, Boren J, Caslake MJ et al. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(8): 1697-1703, 2005

32. Ahn J, Lee H, Kim S et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem. Biophys Res Commun* 373(4): 545-549, 2008
33. Al-Shayji IA, R. Gill JM, Cooney J et al. Development of a novel method to determine very low density lipoprotein kinetics. *J Lipid Res* 48(9): 2086-2095, 2007
34. Al-Shayji IA, Gill JM, Cooney J, et al. Development of a novel method to determine very low density lipoprotein kinetics. *J Lipid Res* 48(9): 2086-95, 2007
35. Amar MJA, Kaler M, Courville AB et al. Randomized double blind clinical trial on the effect of oral α -cyclodextrin on serum lipids. *Lipids in Health and Disease* 15:115, 2016
36. Rivellese AA, Giacco R, Annuzzi G et al. Effects of monounsaturated vs. saturated fat on postprandial lipemia and adipose tissue lipases in type 2 diabetes. *Clinical Nutrition* 27: 133-141, 2008
37. Rivellese AA, Natale CD, Marino LD et al. Exogenous and Endogenous Postprandial Lipid Abnormalities in Type 2 Diabetic Patients with Optimal Blood Glucose Control and Optimal Fasting Triglyceride Levels. *J Clin Endo Meta* 89(5): 2153-2159 2004
38. Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS et al. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 93: 243-252, 2011
39. Awad AB, Begdache LA, Fink CS et al. Effect of sterols and fatty acids on growth and triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells. *J Nutr Biochem* 11(3): 153-158, 2000
40. Bettzieche A, Brandsch C, Weiße K et al. Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats. *Br J Nutr* 99(5): 952-962, 2008
41. Black DD. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption. cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293(3): 519-524, 2007
42. Boban PT, Nambisan B, Sudhakaran PR et al. Hypolipidaemic effect of chemically

- different mucilages in rats. a comparative study. *Br J Nutr* 96(6): 1021-1029, 2006
43. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale M.I.C., Lipolysis and lipases in white adipose tissue-An update. *Arch Endocrinol Metab* 59(4): p335-342, 2015
44. Bouchard-Mercier A, Rudkowska I, Lemieux S et al. Polymorphisms in genes involved in fatty acid β -oxidation interact with dietary fat intakes to modulate the plasma TG response to a fish oil supplementation. *Nutrients* 6(3): 1145-1163, 2014
45. Carstensen M, Thomsen C, Hermansen K. Incremental area under response curve more accurately describes the triglyceride response to an oral fat load in both healthy and type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 52(8): 1034-1037, 2003
46. Chang. H.C, Seidman I, Teebor G et al. Liver acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase. relative activities in the normal state and in here ditary obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 28: 682-686, 1967
47. Natale CD, Annuzzi G, Bozzetto L et al. Effects of a Plant-Based High-Carbohydrate/High-Fiber Diet Versus High-Monounsaturated Fat/Low-Carbohydrate Diet on Postprandial Lipids in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 32: 2168-2173, 2009
48. Coleman. RA. Diacylglycerol acyltransferase and monoacylglycerol acyltransferase from liver and intestine. *Methods Enzymol* 209: 98, 1992
49. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98(4A): 27-33, 2006
50. Natale CD, Annuzzi G, Bozzetto L et al. Effects of a plant-based high-carbohydrate/high-fiber diet versus high-monounsaturated fat/low-carbohydrate diet on postprandial lipids in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 32(12): 2168-2173, 2009
51. Demonty I, Lamarche B, Deshaies Y et al. Role of soy isoflavones in the hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 671-677, 2002
52. Dhingra S, Bansal MP. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. *Chem Biol Interact* 161(1): 49-56, 2006
53. Ejaz A, Wu D, Kwan P et al. Curcumin Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Angiogenesis and Obesity in C57/BL MICE1-3. *J. Nutr* 139: 919-925, 2009

54. Forcheron F, Cachefo A, Thevenon A et al. Mechanisms of the Triglyceride- and Cholesterol-Lowering Effect of Fenofibrate in Hyperlipidemic Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 51: 3486-3491, 2002
55. Fasshauer M, Paschke R, Stumvoll M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie* 86(11): 779-778, 2004
56. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1): 497-509, 1957
57. Frideman JM. A tale of two hormones. *Nat Med* 16(10): 1100-1106, 2010
58. Fujimoto K, Koishi R, Shimizugawa T et al. A 3-null mice show low plasma lipid concentrations by enhanced lipoprotein lipase activity. *Exp Anim* 55(1): 27-34, 2006
59. Gao Y, Zhou Y, Xu A et al. Effects of an AMP-activated protein kinase inhibitor. compound C. on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull* 31(9): 1716-1722, 2008
60. Gerber Y, Goldbourt U, Segev S et al. Indices related to apo CII and CIII serum concentrations and coronary heart disease. a case-control study. *Prev Med* 37(1): 18-22, 2003
61. Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ et al. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest* 78: 1287-1295, 1986
62. Goudriaan JR, DenBoer MAM, Rensen PCN et al. CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance. *J Lipid Res* 46(10): 2175-2181, 2005
63. Hammond LE, Gallagher PA, Wang S et al. Mitochondrial glycerol-3- phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *J Biol Chem* 277(23): 8204-8214, 2002
64. Hao J, Shen W, Yu G et al. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 21(7): 634-644, 2010
65. Houghton. D, Wilcox MD, Chater PI et al. Biological activity of alginate and its effect on pancreatic lipase inhibition as a potential treatment for obesity. *Food*

- Hydrocolloids 49: 18-24, 2015
66. Hudgins LC. Effect of high-carbohydrate feeding on triglyceride and saturated fatty acid synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 225(3): 178-183, 2000
 67. Demonty I, Lamarche B, Deshaies Y et al. Role of soy isoflavones in the hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 671-677, 2002
 68. Jin YJ, Li SZ, Zhao ZS et al. Carnitine palmitoyltransferase-1(CPT-1). activity stimulation by cerulenin via sympathetic nervous system activation overrides cerulenin's peripheral effect. *Endocrinology* 145(7): 3197-3204, 2004
 69. Kastelein JJP, Maki KC, Susekov A et al. Omega-3 free fatty acids for the treatment of severe hypertriglyceridemia. The EpanoVa fOr Lowering Very high triglyceridEs(EVOLVE). *trial Journal of Clinical Lipidology* 8: 94-100, 2014
 70. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 64(6): 636-643, 2010
 71. Kanazawa T, Atsumi M, Mineo H et al. Ingestion of gelatinized potato starch containing a high level of phosphorus decreases serum and liver lipids in rats. *J Oleo Sci* 57(6): 335-343, 2008
 72. Qi K, Fan C, Jiang J et al. Omega-3 fatty acid containing diets decrease plasma triglyceride concentrations in mice by reducing endogenous triglyceride synthesis and enhancing the blood clearance of triglyceride-rich particles. *Clinical Nutrition* 27: 424-430, 2008
 73. Kim SJ, Bok SH, Lee SK et al. Lipid-lowering efficacy of 3, 4-di(OH).-phenylpropionic L-leucine in high-cholesterol fed rats. *J Biochem Mol Toxicol* 19(1): 25-31, 2005
 74. Kim YS, Lee YM, Kim JH et al. *Polygonum cuspidatum* inhibits pancreatic lipase activity and adipogenesis via attenuation of lipid accumulation. *BMC Complement Altern Med* 25(13): 282, 2013
 75. Kinoshita M, Kojima M, Matsushima T et al. Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA. *Clin Chim Acta* 351(1-2): 115-120, 2005
 76. Kohan AB, Wang F, Li X et al. Is apolipoprotein A-IV rate limiting in the intestinal transport and absorption of triglyceride? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304(12): 1128-1135, 2015

77. Kohno M, Hirotsuka M, Kito M et al. Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean beta-conglycinin. *J Atheroscler Thromb* 13(5): 247-255, 2006
78. Kono H, Fujii H, Ogiku M et al. Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and N-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res* 156(5): 282-291, 2010
79. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56(12): 2863-2871, 2007
80. Krusinová E, Pelikánová T. Fatty acid binding proteins in adipose tissue. a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes Res Clin Pract* 82: S127-S134, 2008
81. Kubota H, Morii R, Kojima-Yuasa A et al. Effect of Zizyphus jujuba Extract on the Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Am J Chin Med* 37(3): 597-608, 2009
82. Kuo KL, Weng MS, Chiang CT et al. Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats. *J Agric Food Chem* 53(2): 480-489, 2005
83. Lambert JE, Parks EJ. Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans. *Biochim Biophys Acta* 1821(5): 721-726, 2012
84. Lane. M.D, Wolfgang M, Cha SH et al. Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA. *Int J Obes (Lond)* 32(4): 49-54, 2008
85. Lapointe A, Tchernof A, Lamarche B et al. Plasma adiponectin concentration is strongly associated with VLDL-TG catabolism in postmenopausal women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21(4): 254-260, 2011
86. Larter. C.Z, Yeh MM, VanRooyen DM et al. Roles of adipose restriction and metabolic factors in progression of steatosis to steatohepatitis in obese. diabetic mice. *Gastroenterol Hepatol* 24(10): 1658-1668, 2009
87. Lee MS, Kim CT, Kim Y et al. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Ann Nutr Metab* 54(2): 151-157, 2009
88. Lee SM, Kim CW, Kim JK et al. GCG-rich tea catechins are effective in lowering cholesterol and triglyceride concentrations in hyperlipidemic rats. *Lipids* 43(5):

419-29, 2008

89. Lewin TM, Granger DA, Kim JH et al. Regulation of mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. response to feeding status is unique in various rat tissues and is discordant with protein expression. Arch Biochem Biophys 396(1): 119-127, 2001
90. Ligaarden SC, Axelsson L, Naterstad K et al. A candidate probiotic with unfavourable effects in subjects with irritable bowel syndrome. a randomised controlled trial. BMC Gastroenterol 10(16): 1-7, 2010
91. Luan Y, Hirashima T, Man ZW et al. Pathogenesis of obesity by food restriction in OLETF rats-increased intestinal monoacylglycerol acyltransferase activities may be a crucial factor. Diabetes Res Clin Pract 57(2): 75-82, 2002
92. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, et al. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. Clin Chem 29(3): 538-542, 1983
93. Millar JS, Cromley DA, McCoy MG et al. Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339. J Lipid Res 46(9): 2023-2028, 2005
94. Ton MN, Chang C, Carpentier YA et al. In vivo and in vitro properties of an intravenous lipid emulsion containing only medium chain and fish oil triglycerides. Clin Nutr 24(4): 492-501, 2005
95. Mizutani T, INATOMI S, INAZU A et al. Hypolipidemic effect of Pleurotus eryngii extract in fat-loaded mice. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 56(1): 48-53, 2010
96. Murase. T, Misawa K, Haramizu S et al. a characteristic constituent of grapefruit. stimulates energy metabolism and prevents diet-induced obesity by activating AMPK. Am J Physiol Endocrinol Metab 299(2): 266-275, 2010
97. Navarro-Perez D, Radcliffe J, Tierney A et al. Quinoa seed lowers serum triglycerides in overweight and obese subject: A dose-response randomized controlled clinical trial. Current Developments in Nutrition 1: e001321, 2017
98. Nogaroto V, Rodrigues MRS, Vicari MR et al. High postprandial triglycerides serum levels. is obesity a good predictor? An Acad Bras Cienc 87(1): 437-445, 2015
99. Noh H, Lee H, Kim E et al. Inhibitory effect of a Cirsium setidens extract on hepatic fat accumulation in mice fed a high-fat diet via the induction of fatty acid β -oxidation. Biotechnol Biochem 77(7): 1424-1429, 2013

100. Oh K, Kim M, Lee J et al. Liver PPAR α and UCP2 are involved in the regulation of obesity and lipid metabolism by swim training in genetically obese db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 345(3): 1232-2239, 2006
101. Park SM, Kim DS, Kang S. *Gastrodia elata* Blume water extracts improve insulin resistance by decreasing body fat in diet-induced obese rats: vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde are the bioactive candidates. *Eur J Nutr* 50(2): 107-118, 2011
102. Park YS, William Harris. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *Journal of Lipid Research*. 44(3): 453-463, 2003
103. Parks EJ, Krauss RM, Christiansen MP et al. Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production and clearance 104(8): 1087-1096, 1999
104. Qiao L, Zou C, Westhuyzen DR et al. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes*. 57(7): 1824-1833, 2008
105. Reilly CF, Hutzelmann JE. Plasminogen activator inhibitor-1 binds to fibrin and inhibits tissue-type plasminogen activator-mediated fibrin dissolution. *J Biol Chem* 267(24): 17128-17135, 1992
106. Reynisdottir S, Angelin B, Langin D et al. Adipose tissue lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase. Contrasting findings in familial combined hyperlipidemia and insulin resistance syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(10): 2287-2292, 1997
107. Rivellese AA, Natale CD, Marino LD et al. Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 89(5): 2153-2159, 2004
108. Saito S, Yamaguchi T, Shoji K et al. Effect of low concentration of diacylglycerol on mildly postprandial hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 213(2): 539-544, 2010
109. Shearer GC, Savinova OV, Harris WS et al. Fish oil how does it reduce plasma triglycerides? *Biochimica et Biophysica Acta* 1821: 843-851, 2012
110. Storch J, McDermott L. Structural and functional ANALYSIS of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res* 50: 126-131, 2009

111. Taghibiglou C, Taghibiglou C, Iderstine SC et al. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *J Biol Chem* 275(12): 8416-825, 2000
112. Tandy S, Chung RW.S, Wat E et al. Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis. glycemia and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice. *J Agric Food Chem* 57(19): 9339-9345, 2009
113. Tatsuya Moriyama, Kishimoto K, Nagai K et al. Soybean b-conglycinin diet suppresses Serum Triglyceride Levels in Normal and Genetically Obese Mice by Induction of b-oxidation. Downregulation of fatty acid synthase. and Inhibition of Triglyceride Absorption. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 68(2): 352-359, 2004
114. Tiihonen K, Rautonen N, Alhoniemi E et al. Postprandial triglyceride response in normolipidemic, hyperlipidemic and obese subjects – the influence of polydextrose, a non-digestible carbohydrate. *8(14): 23*, 2015
115. Tomonobu K, Hase T, Tokimitsu I et al. Dietary diacylglycerol in a typical meal suppresses postprandial increases in serum lipid levels compared with dietary triacylglycerol. *Nutrition* 22(2): 128-135, 2006
116. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. NCT00938249. (<http://clinicaltrials.gov>)
117. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. NCT01415388. (<http://clinicaltrials.gov>)
118. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res* 50: 138-143, 2009
119. Wang L, Yu J, Walzem RL. High-carbohydrate diets affect the size and composition of plasma lipoproteins in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Comp Med* 58(2): 151-160, 2008
120. Wang Q, Li S, Jiang L et al. Deficiency in hepatic ATP-citrate lyase affects VLDL-triglyceride mobilization and liver fatty acid composition in mice. *J Lipid Res* 51(9): 2516-2526, 2010
121. Wang TY, Liu M, Portincasa P et al. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest* 43(11): 1203-1223, 2013
122. Wang Y, Lin Q, Zheng P et al. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on chylomicron and VLDL synthesis and secretion in

- Caco-2 cells. Biomed Res Int 2014: 684325, 2014
123. Wree A, Kahraman A, Gerken G et al. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. Digestion 83(1-2): 124-133, 2011
124. Wu CH, Yang MY, Chan KC et al. Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a Nelumbo nucifera leaf flavonoid-rich extract in mice. J Agric Food Chem 58(11): 7075-7081, 2010
125. Xiumei Bai, Drayton J, Liu Y et al. Clofibrate Increases Long-Chain Fatty Acid Oxidation by Neonatal Pigs. Journal of Nutrition 144(11): 1688-1693, 2014
126. Xu A, Wang Y, Keshaw H et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. J Clin Invest 112(1): 91-110, 2003
127. Yang DJ, Chang YY, Hsu CL et al. Antiobesity and hypolipidemic effects of polyphenol-rich longan (Dimocarpus longans Lour.). flower water extract in hypercaloric-dietary rats. J Agric Food Chem 58(3): 2020-2027, 2010
128. Yanwen Wang et al. Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects. Atherosclerosis. 173(2): 269-275, 2004
129. Yasushi Saito, Yokoyama M, Origasa H et al. Effects of EPA on coronary artery disease in hypercholesterolemic patients with multiple risk factors.: Sub-analysis of primary prevention cases from the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). Atherosclerosis 200(1): 135-140, 2008
130. Yasushi Saito, Natale CD, Marino LD et al. Exogenous and Endogenous Postprandial Lipid Abnormalities in Type 2 Diabetic Patients with Optimal Blood Glucose Control and Optimal Fasting Triglyceride Levels. J Clin Endocrinol Metab 89(5): 2153-2159, 2004
131. Zhang Y, Castellani LW, SinalCJ et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. Genes Dev 18(2): 157-69, 2004
132. Zhou D, Samovski D, Okunade AL et al. CD36 level and trafficking are determinants of lipolysis in adipocytes. FASEB J 26(11): 4733-4742, 2012
133. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Sci 306: 1383-1386, 2004

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- ‘혈중 중성지방 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이해영, 권용관, 허수정, 서은채, 국주희, 김준영,
이미영, 오재명, 황경미, 방수진, 이요아, 정혜진,
김선후, 송진희

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2019년 6월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구팀

(043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430)

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘혈중 중성지방 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편



【부패. 공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패.공익신고” 코너
- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담” 코너