

Leucine의 섭취가 고지방 식이를 섭취한 흰쥐의 체중 감소에 미치는 영향*

박훈정 · 이은주 · 김주희 · 김지연 · 권오란 · 김미경[§]

이화여자대학교 식품영양학과

Effect of Leucine Intake on Body Weight Reduction in Rats Fed High Fat Diet*

Park, Hoon Jung · Lee, Eun Ju · Kim, Joohee · Kim, Ji Yeon · Kwon, Oran · Kim, Mi Kyung[§]

Department of Nutritional Science and Food Management, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

The principal objective of this study was to determine the effects of leucine on body weight reduction in high fat diet-induced overweight rats. To induce overweight, six-month-old male Sprague-Dawley rats (n = 80) were divided into 8 groups; one group of 10 rats was fed on a normal fat diet and the remaining 70 rats were fed on a high-fat diet (40% of energy as fat) for 14 weeks. Then, 10 rats fed on the normal fat diet and another 10 rats fed on the high fat diet were sacrificed to identify overweight induction. The remaining 60 rats were divided randomly into 6 groups according to body weight and fed on one of the diets with different dietary fat levels (9.6% or 40% of energy as fat) and leucine levels (0, 0.6 or 1.2 g/kg BW) for the following 5 weeks of experiments. The body weight loss in the Leu-administered groups (0.6 g, 1.2 g/kg BW) was significantly higher than those of Leu non-administered groups. The perirenal fat pad weights in the Leu-administered groups were significantly lower than those of the Leu non-administered groups. Of the hepatic enzymes, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activities were reduced significantly in the Leu-administered groups than in the Leu non-administered groups. With the oral glucose tolerance test (OGTT), the incremental areas under the curve of the glucose response (IAUC) of the Leu-administered groups were significantly lower than those of the Leu non-administered groups. The fasting glucose concentration and HOMA-IR of the Leu-administered groups were significantly lower than those of the Leu non-administered groups. In conclusion, the results of this study suggest that one of the possible mechanisms of leucine in the observed body weight reduction might involve the inhibition of lipogenic enzyme activities such as glucose-6-phosphate dehydrogenase, rather than the activation of lipolysis enzymes. Additionally, leucine administration resulted in improved glucose metabolism. (Korean J Nutr 2009; 42(8): 714~722)

KEY WORDS: leucine, dietary fat level, body weight, hepatic enzyme activities, blood glucose.

서 론

비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체내 지방 축적량이 과도한 상태라고 정의 내릴 수 있다. 이러한 비만은 만성 질병이라고 할 수 있는 심장 질환, 고혈압, 고지혈증, 제 2형 당뇨병과 같은 합병증을 유발하는 원인이 되어 인류의 건강을 위협 하고 있다.¹⁾ World Health Organization (WHO)

에 따르면, 2004년에 1.6억 이상의 인구가 과체중 (BMI \geq 25.0 kg/m²)이며 이중 4억이 비만 (BMI \geq 30.0 kg/m²) 이라고 보고 하였다. 또한 2015년에는 그 수치가 증가하여 대략 23억의 인구가 과체중이 되고 7억 이상의 인구가 비만이 될 것이라고 추정하고 있다.²⁾ 비만의 발병 원인은 매우 복잡하고 다양한 요인들이 상호 복합적으로 작용하지만, 과다한 에너지 섭취와 신체적 활동부족의 두 가지 생활 습관이 가장 큰 원인으로 제시되고 있다. 특히, 비만의 예방 및 치료를 위해서는 식이를 조절할 것을 강조하고 있다.³⁾ 초기에 비만 예방을 위한 식이 조절은 단순히 열량 섭취를 줄이는 데 초점을 두었으나 단순한 열량 섭취의 제한은 체지방 뿐만 아니라 체단백의 손실을 가져 올 수 있으므로, 특정 영양소나 물질의 효과에 관심이 집중되고 있다.⁴⁻⁶⁾

접수일 : 2009년 10월 19일 / 수정일 : 2009년 12월 5일

채택일 : 2009년 12월 10일

*This work was supported by Sungshin Cement Co., Ltd. of Seoul, Korea and the second stage of the Brain Korea 21 project in 2008.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mkk@ewha.ac.kr

Leucine은 필수 아미노산이자 isoleucine, valine을 포함하는 branched chain amino acid (BCAA) 중의 하나이며 신체 내에서 합성이 되지 않으므로 식이에 의해 공급 받아야만 한다.⁷⁾ Leucine은 영양 대사적 측면에서 다양한 역할을 수행한다고 알려져 있다. 골격근에서는 단백질 합성의 translation initiation의 중요한 조절인자로서의 역할을 수행하고,⁸⁾ insulin/P31-kinase signaling을 조절하며,⁹⁾ 골격근에서 알라닌과 글루타민의 생산을 위한 주요 nitrogen donor로서의 역할을 수행한다고 알려져 있다.¹⁰⁾ Donato 등¹¹⁾의 연구에서는 6주 동안의 칼로리 제한 동안에 leucine 0.3 g/kg BW/day를 섭취하는 것은 많은 체지방 손실을 가져오고 간과 근육 단백질의 합성을 증진한다고 보고하였으며, Kimball 등⁸⁾의 연구에서는 공복 시나 에너지 제한 시에 근육 단백질 합성을 자극한다고 보고하였다. 식물성 단백질 및 단백질 가수 분해물들이 고지방식이 섭취로 비만을 유도한 흰 쥐의 체중 감소에 미치는 영향을 알아본 Kim 등¹²⁾의 연구에서는 실험동물의 체중이 BCAAs, 특히 유리아미노산 형태의 leucine 함량이 높았던 옥수수 글루텐 가수분해물을 섭취한 군에서만 감소하여 체중이 증가한 다른 군들과 비교하여 유의적인 차이를 보였다. 이 연구에서는 옥수수 글루텐 가수분해물이 다른 시험물질에 비하여 유리아미노산 형태의 leucine 함량이 높았지만, 다른 아미노산들의 함량 및 형태(유리 아미노산/결합 아미노산)에도 차이가 존재하였기 때문에 이러한 체중 감소 효과가 다량의 leucine 섭취 때문인지는 확실하지 않 수 없었으며 leucine의 섭취로 인한 간에서의 지질 대사 관련 효소 활성 변화, 인슐린 저항성의 영향 등을 확인하기 위한 후속 연구를 제안하였다.

따라서 본 연구에서는 Kim 등¹²⁾의 연구결과를 바탕으로 leucine의 체중감소 효과를 확인하는 후속 연구를 수행하였다. Leucine은 식이와 별도로 separate feeding으로 공급하였으며, 투여량은 Kim 등의 연구에서 사용된 0.6 g/kg BW/day 및 유사한 효과를 보인 다른 연구들에서 사용된 1.2 g/kg BW/day으로 설정하였다. 또한, leucine의 체중 감소 효과 기전을 살펴보기 위하여 지방 대사관련 효소인 carnitine palmitoyl transferase (CPT), malic enzyme (ME) 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)의 활성을 분석하였고 대대사 관련 지표들을 분석하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 생후 6개월의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 80마리 [(주)오리엔트, Korea]를 대상으로 하였다. 실험

동물은 한 마리씩 stainless steel cage에서 사육하였고 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 동물 사육실은 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 내외로 유지시켰으며, lighting cycle은 12시간 주기로 일정하게 하였다. 실험동물은 1주일 간 고형 배합 사료 [(주)삼양, Korea]로 적응 시킨 후 체중이 550.31 ± 5.07 g인 쥐들을 체중에 따른 난괴법에 의해서 10마리씩 8군으로 나누어 정상지방 식이 군 ($n = 10$)은 AIN-93M diet (9.6% of energy as fat), 나머지 실험동물들 ($n = 70$)은 고지방으로 조성된 AIN-93M diet (40% of energy as fat)를 14주 간 공급하여 과체중을 유도하였다. 과체중이 유도된 실험동물들 ($n = 70$)은 다시 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)으로 군당 10마리씩 7군으로 나누었다. 이 중 임의의 1군 ($n = 10$)은 과체중 유도기간 중 함께 사육된 정상지방 식이 군 ($n = 10$)과 함께 희생하였으며, 나머지 여섯 군 ($n = 60$)은 leucine과 지방의 섭취량을 각각 다르게 하여 5주간 사육하였다. 지방은 총 열량의 9.6% 및 40%이 되도록 하였으며, leucine은 0, 0.6, 1.2 g/kg BW이 되도록 sucrose agar gel (0.15% sucrose, 0.25% agar) 1 mL에 섞어서 기본 식이와는 별도로 2회 (아침 10시와 오후 5시)에 separate feeding 하였다. 실험에 사용한 식이의 구성은 Table 1과 같았다. 식이의 탄수화물 급원으로는 옥수수 전분 [(주)대성, Korea], 단백질 급원으로는 casein (Murray Goulburn Co., Australia), 지방 급원으로는 라드 (Feedlab Co., Korea) 및 대두유 (CJ Co., Korea)를 사용하였다. 무기질, 비타민 (Dyets Inc., USA)은 AIN-93M diet 구성에 따라 혼합한 것을 각각 식이에 섞었다.

식이 섭취량은 일주일에 3회, 체중은 주 1회 같은 시각에 측정하였으며, 식이 섭취에서 오는 갑작스런 체중의 변화를 막기 위하여 체중 측정 2시간 전에 식이 그릇을 빼주었다.

실험동물의 혈액 및 장기의 채취

실험 기간이 종료된 동물들은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10 mL 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 이때 주사기는 혈액 응고를 방지하기 위하여 heparin (25,000 IU/5 mL)용액으로 혈액 10 mL당 100~200 IU가 되도록 내부를 coating하여 사용하였다. 채취된 혈액은 원심 분리관에 담아 ice bath에서 20분간 방치한 후 2,800 rpm, 4°C 에서 30분간 원심 분리 (Union32R Plus, Hanil, Korea)하여 혈장을 분리하였으며 -80°C deep freezer에 보관하였다. 혈액을 채취한 후 ice bath 위에서 즉시 간을 떼어 ice bath saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 바로 -80°C

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

Ingredients	Groups ¹⁾	Overweight-inducing period (14 wks)		Leucine supplement period (5 wks)					
		Control	High fat	CLO	CLL	CLH	HLO	HLL	HLH
Corn starch		465.692	324.792	465.692	465.692	465.692	324.792	324.792	324.792
Dextrinized cornstarch		155.0	110.0	155.0	155.0	155.0	110.0	110.0	110.0
Sucrose		100.0	70.0	100.0	100.0	100.0	70.0	70.0	70.0
Casein (>85% protein)		140.0	174.0	140.0	140.0	140.0	174.0	174.0	174.0
Lard		–	100.0	–	–	–	100.0	100.0	100.0
Soybean oil		40.0	100.0	40.0	40.0	40.0	100.0	100.0	100.0
Fiber		50.0	60.0	50.0	50.0	50.0	60.0	60.0	60.0
Mineral mix ²⁾		35.0	42.0	35.0	35.0	35.0	42.0	42.0	42.0
Vitamin mix ³⁾		10.0	14.0	10.0	10.0	10.0	14.0	14.0	14.0
L-cystine		1.8	2.2	1.8	1.8	1.8	2.2	2.2	2.2
Choline bitartrate		2.5	3.0	2.5	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0
Tert-butyl hydroquinone		0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Total amount		1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
Total calories (kcal)		3776.4	4503.6	3776.4	3776.4	3776.4	4503.6	4503.6	4503.6
Energy ratio (%)	Carbohydrate	77.4	46.3	77.4	77.4	77.4	46.3	46.3	46.3
	Protein	13.0	13.6	13.0	13.0	13.0	13.6	13.6	13.6
	Fat	9.6	40.1	9.6	9.6	9.6	40.1	40.1	40.1

1) Control: AIN-93M diet (9.6% of energy as fat), High fat: AIN-93M diet (40% of energy as fat), CLO: AIN-93M diet (9.6% of energy as fat), CLL: AIN-93M diet (9.6% of energy as fat) + 0.6 g/kg BW Leu, CLH: AIN-93M diet (9.6% of energy as fat) + 1.2 g/kg BW Leu, HLO: AIN-93M diet (40% of energy as fat), HLL: AIN-93M diet (40% of energy as fat) + 0.6 g/kg BW Leu, HLH: AIN-93M diet (40% of energy as fat) + 1.2 g/kg BW Leu

2) Mineral mix (AIN-93M-MIX) (g/kg mixture): calcium carbonate 357.00, potassium phosphate monobasic 250.00, potassium citrate H₂O 28.00, sodium chloride 74.00, potassium sulfate 46.60, magnesium oxide 24.00, ferric citrate U.S.P. 6.06, zinc carbonate 1.65, manganese carbonate 0.63, cupric carbonate 0.30, potassium iodate 0.01, sodium selenate 0.01025, ammonium paramolybdate 4 H₂O 0.00795, sodium metasilicate 9H₂O 1.45, chromium potassium sulfate 12H₂O 0.275, lithium chloride 0.0174, boric acid, 0.0815 sodium fluoride 0.0635, nickel carbonate 0.0318, ammonium vanadate 0.0066 and sucrose finely powdered 209.806.

3) Vitamin mix (AIN-93-VX) (g/kg mixture): niacin 3.00, calcium pantothenate 1.60, pyridoxine HCl 0.70, thiamine HCl 0.60, riboflavin 0.60, folic acid 0.20, biotin 0.02, vitamin E acetate (500 IU/g) 15.00, vitamin B12 (0.1%) 2.50, vitamin A palmitate (500,000 IU/g) 0.80, Vitamin D3 (400,000 IU/g) 0.25, Vitamin K1/Dextrose Mix (10 mg/g) 7.50 and sucrose 967.23

deep freezer에 보관하였다. 그 외 신장 주변 지방, 부고환 지방을 떼어서 무게를 측정하였다.

간 지질 대사 관련 효소의 활성

간 조직의 carnitine palmitoyl transferase (CPT)의 활성은 Bieber 등^{13,14)}의 방법으로 측정하였으며, malic enzyme (ME)의 활성은 Geer 등¹⁵⁾의 방법으로 측정하였다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)의 활성은 Noltmann 등¹⁶⁾의 방법에 의해 측정하였다.

경구 당부하검사

실험동물을 희생하기 5일전에 12시간 절식시킨 후 50% 포도당 용액을 이용하여 체중 kg당 포도당 1 g이 되도록 경구 투여하였다. 포도당 투여 전 (공복혈당), 포도당 투여 후 30, 60, 90, 120분에 꼬리 정맥을 통하여 혈액을 채취하여 혈당 측정기 (Accu-check, Germany)로 혈당을 측정하였고, WinNolin Program (Ver 1.1)을 이용하여 포도당 반응 면적 (Incremental area under the curve)을 구하였다.

공복 혈당, 혈장 인슐린, 글루카곤 농도

실험 기간이 종료된 실험동물의 심장에서 혈액을 채취한 후, 포도당 농도는 즉시 Accu-check (Roche diagnostics, Germany)을 이용하여 측정하였다. 인슐린 농도는 mercodia rat insulin kit (Mercodia AB, Sweden)를 이용하여 two-site enzyme immunoassay로 측정하였으며, 혈장의 glucagon 농도는 YK090 Glucagon EIA kit (Yanaiharu, Japan)를 이용하여 측정하였다. 공복 혈당과 인슐린농도 값을 이용하여 Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR, Fasting plasma insulin (μ U/mL) x fasting blood glucose (mmol/L)/22.5)을 계산하였다.

통계 처리

모든 실험 결과는 window용 SAS package program을 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 실험 결과는 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 duncan's multiple range test에

Table 2. Food intake and body weight in rats fed diets with different levels of dietary fat during and after overweight induction period

Group ¹⁾	Food intake (g/day)	Calorie Intake (kcal/day)	Body weight gain (g/14 weeks)	Weight change/Calorie intake (g/100 kcal)	Perirenal fat pad (g)	Epididymal fat pad (g)
Control	25.03 ± 0.92 ^{2)(a3)}	94.53 ± 3.46 ^(NS4)	134.08 ± 12.85 ^b	1.40 ± 0.09 ^b	22.54 ± 2.13 ^{NS}	16.72 ± 1.31 ^b
High fat	22.02 ± 0.81 ^b	99.16 ± 3.67	206.69 ± 17.06 ^a	2.02 ± 0.10 ^a	23.56 ± 1.27	21.73 ± 1.65 ^a

- 1) See Table 1
- 2) Mean ± standard error (S.E)
- 3) Values within a column with different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by Student's t test
- 4) Values within a column are not significant at $\alpha = 0.05$ level by Student's t tes

Table 3. Food intake, calorie intake and body weight in rats fed diets with different levels of fat and/or leucine

Group ¹⁾	Food intake (g/day)	Calorie intake (kcal/day)	Weight change (g/5 weeks)	Weight change /Calorie intake (g/100 kcal)
CLO	21.01 ± 0.78 ^{2)(a3)}	79.32 ± 2.96 ^(NS4)	-53.94 ± 9.93 ^b	-0.73 ± 0.16 ^b
CLL	20.59 ± 0.77 ^a	77.76 ± 2.89	-58.19 ± 9.24 ^b	-0.80 ± 0.15 ^b
CLH	20.12 ± 0.80 ^{ab}	75.96 ± 3.03	-54.25 ± 11.07 ^b	-0.78 ± 0.19 ^b
HLO	18.39 ± 0.62 ^{bc}	82.84 ± 2.78	1.78 ± 7.59 ^a	0.01 ± 0.08 ^a
HLL	17.32 ± 0.41 ^c	77.99 ± 1.84	-37.56 ± 7.61 ^b	-0.49 ± 0.10 ^b
HLH	16.92 ± 0.63 ^c	76.20 ± 2.83	-41.15 ± 8.56 ^b	-0.56 ± 0.12 ^b
Significant factor ⁵⁾	A	-	A, B, AB	A, B

- 1) See Table 1
- 2) Mean ± standard error (S.E)
- 3) Values within a column with different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test
- 4) Values within a column are not significant at $\alpha = 0.05$ level by Duncan's multiple range test
- 5) Statistical significance of experimental factors was calculated using two-way ANOVA. A: Effect of dietary fat level was significant at $\alpha = 0.05$, B: Effect of leucine level was significant at $\alpha = 0.05$, AB: Interaction of dietary fat and leucine level was significant at $\alpha = 0.05$

의하여 각 실험 군 평균치 간의 유의성을 검정하였다. 또한 각 실험 인자 (A: 식이 지방 섭취량, B: leucine 섭취량)의 영향과 이들의 상호 작용 (A*B: 식이 지방 섭취량 * leucine 섭취량)의 영향은 이원 배치 분산 분석 (two-way analysis of variance)을 하여 각 요인과 요인 간의 상호 효과를 $\alpha = 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

과체중 유도 확인

14주 동안 과체중을 유도한 후 희생한 실험동물들의 일일 평균 식이섭취량, 열량 섭취량 및 체중증가량, 지방 조직의 무게는 Table 2와 같았다. 일일 식이섭취량, 체중증가량, 열량효율, 부고환 지방의 무게가 고지방 식이군에서 정상지방 식이군에 비하여 유의적으로 높아 고지방 식이로 인한 체지방 증가가 유의적으로 유도된 것을 확인할 수 있었다.

식이섭취량과 체중 변화

고지방 식이로 과체중이 유도된 실험동물들을 다시 5주간 지방과 leucine의 섭취량을 달리하여 사육한 실험동물들의

식이 섭취량, 열량 섭취량 및 체중 변화량은 Table 3과 같았다. 식이 섭취량은 정상지방 식이로 전환한 군들이 고지방 식이를 유지한 군들에 비하여 유의적으로 높았으나, leucine 섭취량에 따라서는 유의적인 차이가 없었다. 열량 섭취량은 모든 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 체중 변화량과 변화율은 식이 내 지방의 섭취량과 leucine 섭취량, 이들의 상호 작용이 모두 유의적이었다. 즉, 고지방 식이를 유지한 군들에 비하여 정상지방 식이로 전환한 군들에서 체중 감소가 컸고, leucine 보충의 효과는 고지방 식이를 지속적으로 유지한 군들에서 뚜렷하여 leucine 섭취군들이 대조군 들에 비하여 체중 감소가 유의적으로 컸다. 고지방 식이를 유지한 군들에서는 대조군은 1.78 ± 7.59 g의 체중증가를 보였으나 leucine 0.3 g/kg bw/day 섭취는 37.56 ± 7.61 g, 0.6 g/kg bw/day 섭취는 41.15 ± 8.56 g의 감소를 보였다. 체중 변화량을 섭취 열량 100 kcal 당으로 환산하여 본 결과 역시 체중 변화량의 결과와 비슷한 경향을 보여서 정상식이로 전환한 군들은 leucine의 섭취 여부와 관련 없이 체중 감소를 보이나, 고지방 식이를 유지한 군들에서는 leucine의 섭취에 따라 농도 의존적으로 100 kcal 당 체중 감소량이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

지방조직 무게 및 감소율

내장지방 무게의 지표로 널리 사용되는 신장 주변 지방과 부고환 지방의 무게를 측정하고 체중 100 g당 무게로 환산하여 Fig. 1에 나타내었다. 신장 주변 지방의 무게는 지방의 섭취량에는 영향을 받지 않았으나, 정상식으로 전환한 군들에서 leucine의 섭취에 따라 유의적으로 낮았다. 고지방 식이를 유지한 군들에서는 leucine의 섭취에 따라 신장주변 지방 조직 무게가 유의적이지는 않으나 낮아지는 경향을 나타내었다. 부고환 지방의 무게는 지방의 섭취량 및 leucine 보충에 따라 유의적인 변화를 보이지는 않았으나, leucine을 섭취시킨 군들에서 모두 낮아지는 경향을 보였다. 특히 신장 주변 지방 무게 변화량은 leucine 섭취량에 따라 유의적인 영향이 있음이 확인되었으나 ($\alpha = 0.05$), 식이 중의 지방 함량과 leucine 섭취량과의 상호작용은 유의성이 나타나지 않았다.

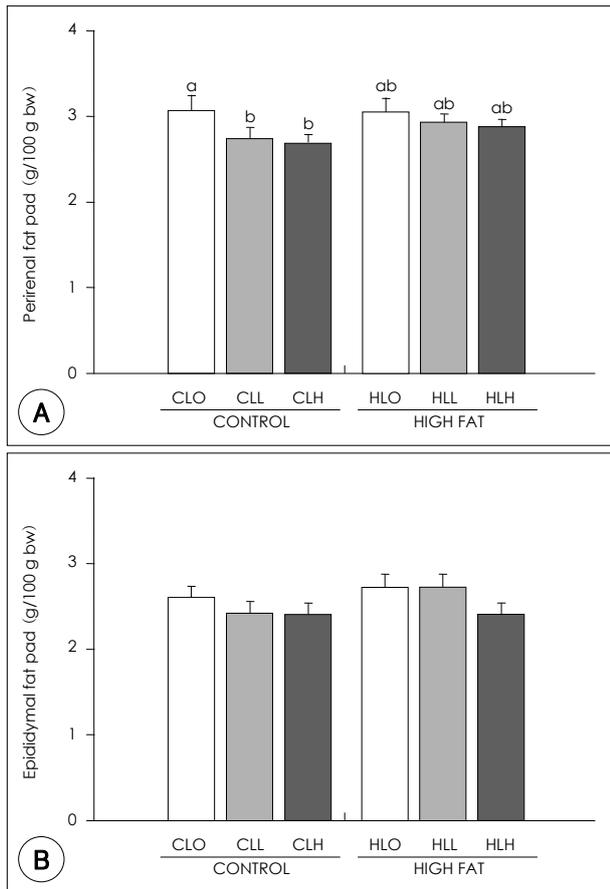


Fig. 1. Perirenal fat pad (A) and epididymal fat pad (B) in rats fed diets with different levels of dietary fat and/or leucine (see Table 1 for group description). The high fat induced animals were orally administered Leucine as separate feeding for 5 weeks with control diet or continuous high fat diet. Values are expressed as mean \pm SE shown by vertical bars. Values with different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by one-way ANOVA.

간 지질 대사 관련 효소의 활성

간에서의 지질 대사 관련 효소의 활성은 Fig. 2와 같았다. CPT는 모든 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 G6PDH의 활성은 고지방 식이와 정상지방 식이군들 모두 leucine 섭취군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. ME는

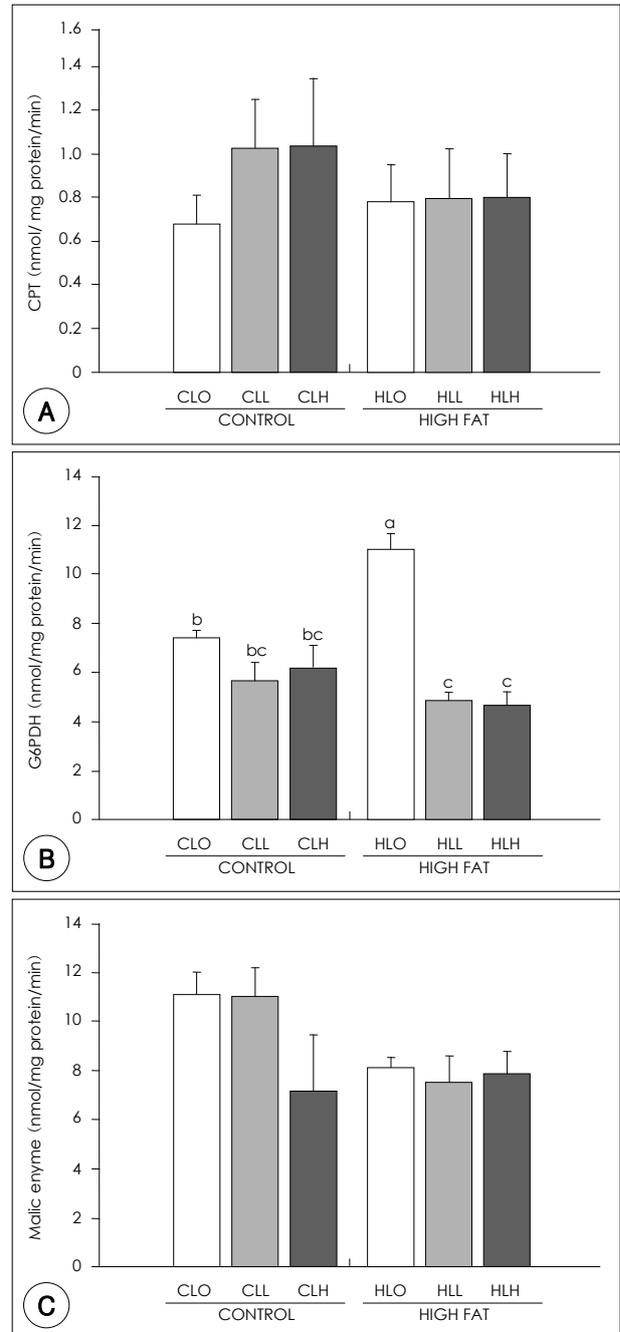


Fig. 2. Activities of carnitine palmitoyl transferase (A), glucose-6-phosphate dehydrogenase (B), and malic enzyme (C) in rats fed diets with different levels of fat and/or leucine. Values are expressed as mean \pm SE shown by vertical bars. Values with different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by one-way ANOVA.

모든 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

경구 당부하 검사

경구 당부하 검사 (oral glucose tolerance test) 결과는 Fig. 3A, B와 같았다. 0, 30, 60 및 120분의 혈당 수준은 고지방 식이를 유지한 군들이 정상지방 식이로 전환한 군들에 비하여 유의적으로 높았으며, leucine을 섭취시킨 군에서의 혈당도 시간대별로 각각의 대조군에 비하여 유의적으로 낮음을 확인할 수 있었다. 포도당 반응 면적 (IAUC) 값은 Fig. 3C와 같이 고지방 식이를 유지한 군들이 정상지방 식이로 전환한 군들에 비하여 유의적으로 높았으며, leucine을 섭취시킨 결과 각각의 대조군들에 비해 유의적으로 낮아짐을 확인할 수 있었다. 포도당 반응 면적을 이원배치 분산 분석을 통해 검정한 결과 leucine 섭취량과 식이지방의 섭취량 사이에 유의적인 상호작용이 있음이 확인되었다 ($\alpha = 0.05$).

공복 혈당, 혈장 인슐린, 글루카곤 농도

공복 혈당은 식이 내 지방 함량에 따라서 볼 때는 유의적인 차이가 없었으나, leucine 섭취량이 높을수록 유의적으로 낮아졌다 (Fig. 4A). 공복 시의 혈당 수준과 혈장 인슐린 및 글루카곤 농도는 Fig. 4B, C와 같았다. 혈장 인슐린 농도와 글루카곤 농도, insulin/glucagon ratio는 모든 군 간에 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 4D). 인슐린 저항성 지표인 HOMA-IR은 정상 식이로 전환한 군들이 고지방 식이를 유지한 군들에 비하여 유의적으로 낮았으며, leucine 섭취량이 많을수록 유의적으로 낮아졌다

고 찰

본 연구의 선행연구인 Kim 등의 연구결과에¹²⁾ 의하면 유리아미노산 형태의 leucine 함량이 높았던 옥수수 글루텐 가수분해물을 섭취한 군에서만 체중이 유의적으로 감소하였다. Kim 등은 옥수수 글루텐 가수분해물의 체중 감소 효과에 대해 여러 가지 가능한 기전들을 제안하였으며, 본 연구는 Kim 등의 연구의 결과가 leucine의 단독 효과 때문인지를 확인하기 위하여 시행되었다. 여러 연구^{7,11,17-19)}에서 leucine의 섭취로 인해 체중이 감소되었다는 연구 결과들이 보고되었으며 본 연구 결과 역시 leucine 섭취가 체중을 감소시킴을 확인하였다. 체중 감소의 원인을 확인하기 위해 체지방 무게를 측정된 결과, 신장 주변 지방의 무게는 정상 식이로 전환한 군들에서 leucine 섭취가 대조군에 비하여 유의적으로 낮았으며, 고지방 식이를 유지한 군들에서는 leucine의 섭취로 인해 신장주변의 지방이 감소하는 경향을 확

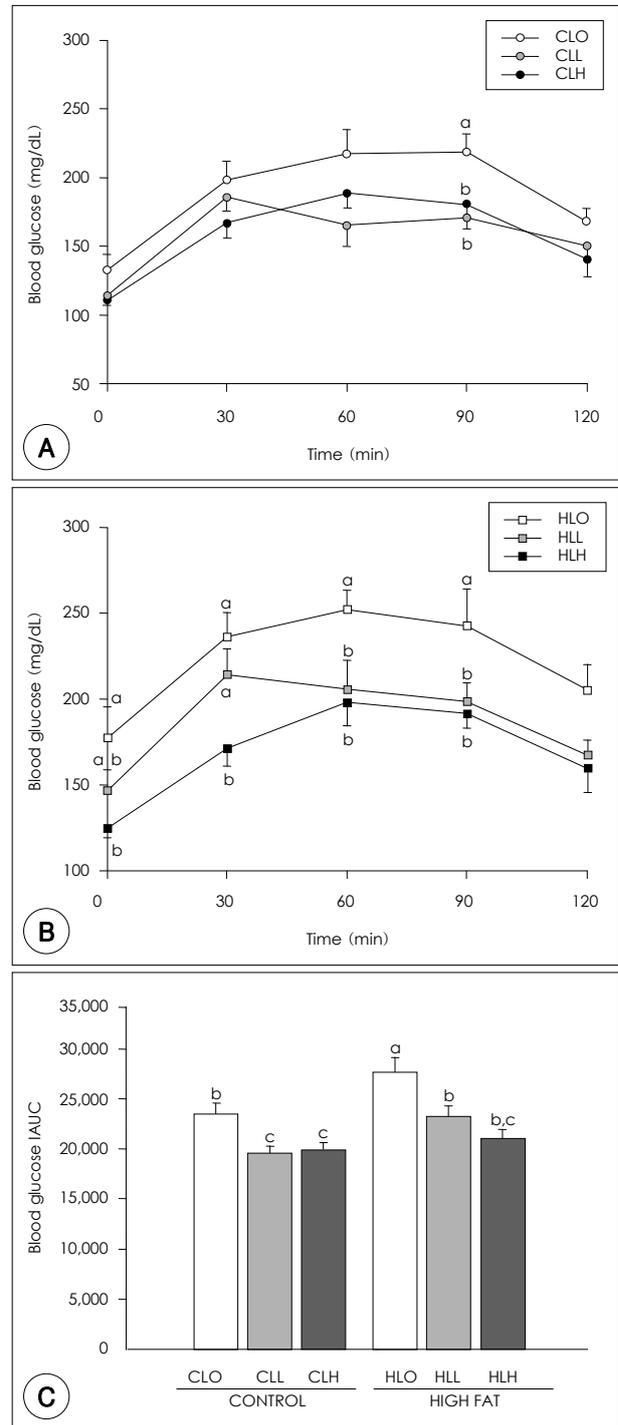


Fig. 3. Blood glucose concentrations during oral glucose tolerance test in rats fed diets with different levels of fat and/or leucine. The animals received orally administered glucose (1 g/kg bw) with or without leucine after overnight fasting for 12 h. Blood glucose levels were determined from tail blood samples at 0, 30, 60, 90, and 120 min and incremental blood glucose concentrations were integrated over a period of 2 h (A: control diet with different leucine levels, B: high fat diet, C: incremental area under the curve of the glucose response). Values are expressed as mean \pm SE shown by vertical bars. Values with different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by one-way ANOVA.

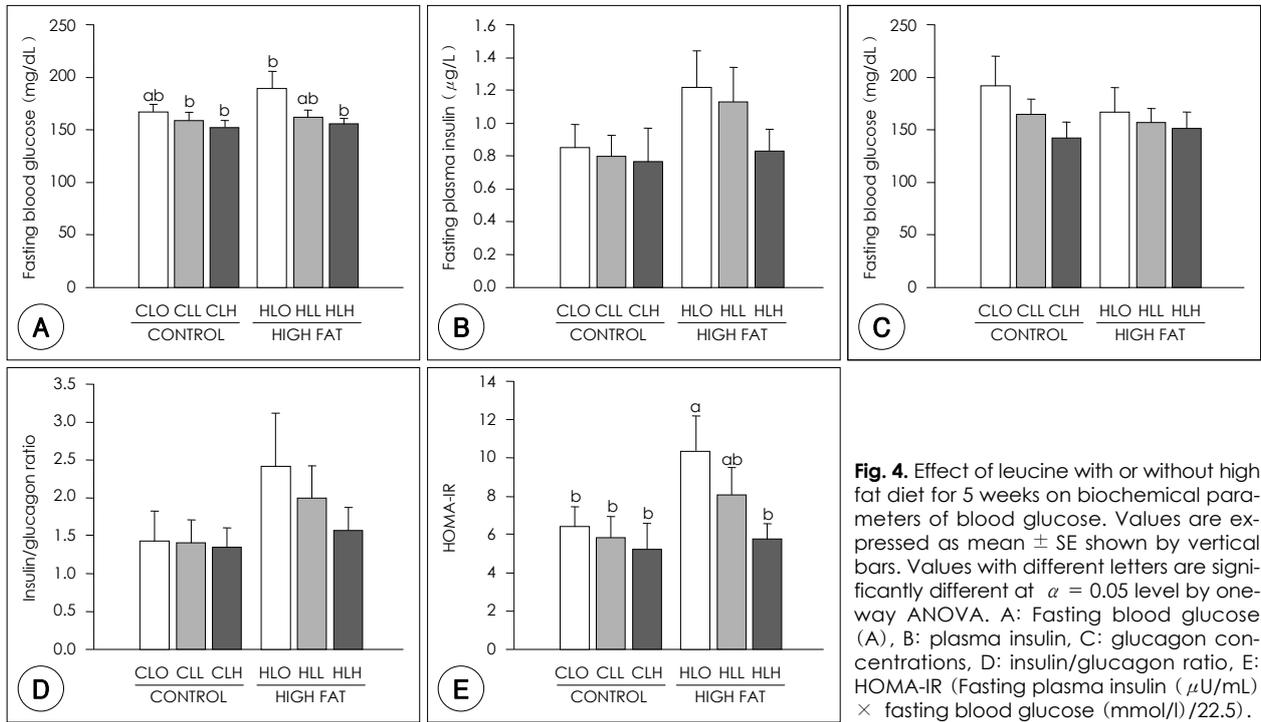


Fig. 4. Effect of leucine with or without high fat diet for 5 weeks on biochemical parameters of blood glucose. Values are expressed as mean \pm SE shown by vertical bars. Values with different letters are significantly different at $\alpha = 0.05$ level by one-way ANOVA. A: Fasting blood glucose (A), B: plasma insulin, C: glucagon concentrations, D: insulin/glucagon ratio, E: HOMA-IR (Fasting plasma insulin (μ U/mL) \times fasting blood glucose (mmol/l)/22.5).

인할 수 있었다. Leucine의 섭취로 인한 체중 감소 효과가 지방조직 무게의 감소 때문인지를 알아보기 위하여 체중 감소량 중 지방 조직 무게의 감소량이 차지하는 비율을 환산해보면 신장 주변 지방의 경우 7.67~9.25%, 부고환 지방의 경우 6.07~11.54%로 두 가지 지방조직의 감소량을 합하였을 때도 체중 감소량 대비 20%를 상회하지 않아 체중감소의 대부분이 체지방 조직의 감소로 인한 결과가 아니었음을 확인할 수 있었다. 이러한 leucine의 체중 감소 효과에 대한 기전을 살펴보고자 leucine이 지질 대사 관련 효소의 활성에 미치는 영향과 당 대사에 미치는 영향을 알아보았다.

선행연구인 Kim 등의 결과에서는¹²⁾ BCAAs 함량, 특히 leucine 함량이 높은 옥수수글루텐 가수분해물 식이를 섭취함으로써 유의적인 체중 감소가 있었던 군에서 지방 합성 관련 효소인 G6PDH 및 ME의 활성이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았으며, CPT의 활성은 대조군에 비하여 유의적인 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서 leucine 섭취군들은 각각의 대조군들에 비하여 G6PDH 활성이 유의적으로 낮아졌으며, ME 및 CPT의 활성은 유의적인 차이를 보이지 않았다. G6PDH는 pentose phosphate pathway (PPP)에서 NADPH를 생성하여 세포들에 환원 에너지를 공급하는 역할을 한다. 이렇게 생성된 NADPH는 세포 내 glutathione 수준을 유지시킴으로써 항산화 역할을 할뿐만 아니라, 양적으로는 더욱 중요하게 간과 같은 조직에서 지방산의 생합성에 사용된다. ME는 ma-

late에서 pyruvate로의 oxidative decarboxylation을 촉매하는 효소로, adipocyte에서는 대개 ME에 의해서 NADPH가 생성되어 지방산 합성에 사용된다. 즉, 지방산 합성에 필요한 NADPH는 간에서는 주로 PPP에서 G6PDH의 작용에 의하여 공급되며, adipocyte에서는 ME에 의해서 공급된다.²⁰⁾ 본 실험에서는 leucine 섭취가 G6PDH에 유의적인 영향을 주었으며 이러한 결과로 미루어 보아 leucine은 간에서 G6PDH의 활성을 감소시켜 NADPH 생성을 감소시킴으로써 지질 합성을 감소시키는 것으로 생각된다.

BCAAs는 단백질 합성의 기질로 사용되며, 근육에서 분해되어 alanine과 glutamine을 생성함으로써 당신생합성 과정에 관여하여 포도당 항상성을 유지하는 역할을 한다. BCAAs중 특히 leucine의 경우 insulin signaling pathway에 관여하여 단백질 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ 하지만 장기간 동안 높은 수준의 leucine을 섭취하는 것은 인슐린 저항성을 가져올 수 있고 이것은 leucine의 근육단백질 합성 촉진 효과를 무디게 만들 수도 있다는 관련 연구²²⁾에 근거하여 leucine의 섭취가 인슐린 당대사에 미치는 영향과 체중감소 효과와의 관계를 알아 보았다. 몇몇 연구에서는 아미노산의 섭취가 공복 혈당을 증가시키거나, 고인슐린혈증을 일으켜 말초 조직의 인슐린 활성을 억제시켜 포도당 이동을 억제시킨다는 결과를 보고하였다.²³⁻²⁵⁾ 이와는 대조적으로 Piatti 등²⁶⁻²⁸⁾의 연구에서는 아미노산의 섭취가 식후 혈당이나 인슐린 농도를 감소시키고 제2형 당뇨병나 비

만한 대상자들의 혈당을 적절하게 조절하여 인슐린 저항성을 개선시켰다는 결과들을 보고하였다. 반면 Baum 등^{9,29)}의 연구에서는 leucine이 insulin signaling pathway와 상호작용하여 insulin signaling을 조절할 뿐만 아니라, 혈당을 일정한 수준으로 적절하게 유지시키는 작용을 한다고 보고하였으며, Zhang 등^{9,30)}의 연구에서도 leucine의 공급이 당대사를 향상시켰으며 식이로 인해 유도된 인슐린 저항성을 감소시켰다는 결과를 보고하였다.

본 연구에서는 경구 당부하 검사 결과 포도당 반응 면적이 정상지방 식이로 전환한 군들에서 고지방 식이를 지속적으로 유지한 군들에 비하여 유의적으로 낮았고 leucine을 섭취한 군들이 각각의 대조군들에 비하여 유의적으로 낮았다. 공복 혈당은 식이 내 지방 함량에 따라서는 영향을 받지 않았으나, leucine 섭취에 따라서는 차이가 있어 leucine 섭취량이 많을수록 유의적으로 낮았다. HOMA-IR 값을 계산한 결과, 정상지방 식이로 전환한 군들이 고지방 식이를 유지한 군들에 비하여 유의적으로 낮았고 leucine 섭취량이 높을수록 유의적으로 낮았다. 그러므로 본 연구에서는 leucine 섭취량이 증가할수록 오히려 당 대사를 개선시켜 인슐린 저항성을 억제시킨다는 사실을 알 수 있었다. 앞의 간지질 대사 관련 효소 활성 결과와 종합하여 볼 때 leucine 섭취는 포도당 산화과정의 하나인 PPP에서 작용하는 G6PDH의 활성을 억제시킴으로써 지질 합성을 억제시키며, 또한 인슐린 저항성을 억제시켜 당대사를 개선시키는 것으로 생각된다. Kim 등¹²⁾의 연구에서 leucine의 장기간 섭취로 인한 인슐린 저항성 발생이 근육단백질 합성 촉진효과를 무디게 하여 체중 감소를 일으켰을 것이라는 가설은 본 연구에서 확인할 수 없었으나 이번 연구에서의 5주라는 기간이 장기간이라고 말하기에는 무리가 있기 때문에 leucine의 장기간 투여로 인한 인슐린 저항성에 관한 연구는 추후 지속적으로 수행되어야 할 것으로 생각된다.

요약 및 결론

본 연구는 leucine의 섭취가 고지방 식이를 먹인 흰 쥐의 체중 감소 효과를 알아보고자 수행되었다. 관련된 두 가지 기전으로는 지질 대사에 있어서 간지질 대사 관련 효소 활성에 미치는 영향과 당 대사에 있어 인슐린 저항성에 미치는 영향을 살펴보았으며 그 결과는 다음과 같았다.

1) 체중은 leucine을 섭취한 모든 군들에서 유의적으로 감소하였으며, 신장 주변 지방의 무게는 leucine 섭취군들에서 유의적으로 감소하였다.

2) 체중 감소율과 신장 주변 지방 무게 감소율은 leucine

섭취군들이 고지방 식이를 유지한 군과 정상식이로 전환한 군들 각각의 대조군들에 비하여 높았다.

3) Leucine 섭취에 따른 지방 조직 무게 감소량은 체중 감소량 대비 20% 이하였다.

4) 지질 대사에 있어서, 지방산 분해 관련 효소인 CPT는 모든 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 지방산 합성 관련 효소인 ME와 G6PDH의 활성을 측정된 결과, ME는 모든 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았고, G6PDH 활성은 leucine 섭취량에 따라서 유의적으로 낮아짐을 확인할 수 있었다.

5) 당대사 지표들을 측정된 결과, 경구 당부하검사 결과 인 포도당 반응 면적 값은 고지방 식이를 유지한 군들이 정상지방 식이로 전환한 군들에 비하여 높은 값을 나타내었으며, leucine 섭취군들이 각각의 대조군들에 비하여 유의적으로 낮았다. 공복 혈당은 지방의 섭취량에 따라서 볼 때는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, leucine 섭취에 따라서 볼 때는 차이가 있어 leucine 섭취량이 많을수록 유의적으로 낮아졌다. HOMA-IR을 계산한 결과, 정상지방 식이로 전환한 군들이 고지방 식이를 유지한 군들에 비하여 유의적으로 낮은 값을 나타내었으며, leucine 섭취량이 많을수록 유의적으로 낮아졌다. 그러므로 5주간의 leucine의 섭취가 인슐린 저항성을 억제시켜 당 대사를 개선시켰다는 사실을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면, leucine의 섭취로 인한 체중 감소율은 시험식이의 지방 함량에 관계없이 각각의 대조군들 (3.57%)에 비하여 유의적으로 높았으며 신장 주변 지방 무게의 변화율도 leucine 섭취군들 (15.00%, 16.75%)이 각각의 대조군에 비하여 높았다. 또한 leucine은 지방 분해 관련 효소보다는 지방 합성 관련 효소에 영향을 미치고 이중 특히 G6PDH는 ME에 비하여 leucine 섭취에 더 예민하게 반응하는 것으로 생각된다. 그러나, 두 가지 지방조직의 감소가 체중 감소에 기여하는 바가 매우 적었기 때문에 체단백질의 분해가 일어났을 가능성도 있으므로 후속 연구에서는 이에 대한 확인이 필요할 것으로 생각된다. 당 대사에 있어서 leucine은 포도당 반응 면적을 낮추고, 공복 혈당과 HOMA-IR 값을 낮춤으로써 인슐린 저항성을 개선시키는 것으로 확인되었다, 다만 leucine의 섭취량에 따른 용량의 존적 차이는 없었다. 이상의 연구로 미루어 leucine의 섭취가 과체중인 사람들에게 체중과 체지방 저하를 유도하는 기능성 식품 소재로써 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 본 연구의 실험 기간은 5주로써 장기 효과를 측정할 것은 아니기 때문에, 향후 장기간 연구, 용량 의존성 연구와 단백질 대사에 미치는 영향에 관한 보다 자세한 연구가 필요하다

다고 생각된다.

Literature cited

- 1) Park JW, Park HM, Ha NS. A study on the obesity and weight control methods of college students. *J Korean Acad Psych Mental Health Nurs* 2004; 13 (1) : 5-13
- 2) WHO. Fact sheet No 311. *Obesity and overweight* ; 2006
- 3) Eun Mi Kim, Jong Ho Lee. Dietary protein and obesity. *Korean J Obes* 2008; 17 (3) : 101-109
- 4) Hu FB. Protein, body weight, and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 (1 Suppl) :242S-247S
- 5) Buchholz AC, Schoeller DA. Is a calorie a calorie? *Am J Clin Nutr* 2004; 79 (5) : 899S-906S
- 6) Lau DC, Douketis JD, Morrison KM, Hramiak IM, Sharma AM, Ur E, Obesity Canada Clinical Practice Guidelines Expert Panel. 2006 canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children [summary]. *CMAJ* 2007; 176 (8) : S1-S13
- 7) Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu YH. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multi-mechanisms. *Diabetes* 2007; 56 (6) : 1647-1654
- 8) Kimball SR, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; 4 (1) : 39-43
- 9) Baum JI, O'Connor JC, Seyler JE, Anthony TG, Freund GG, Layman DK. Leucine reduces the duration of insulin-induced PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288 (1) : E86-E91
- 10) Ruderman NB. Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. *Annu Rev Med* 1975; 26: 245-258
- 11) Donato J Jr, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires IS, Tirapegui J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutrition* 2006; 22 (5) : 520-527
- 12) Kim J, Park J, Hong S, Kim MK. Effect of corn gluten and its hydrolysa te consumptions on weight reduction in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res Prac* 2009; 3 (3) : 200-207
- 13) Bieber LL, Markwell MA. Peroxisomal and microsomal carnitine acetyltransferases. *Methods Enzymol* 1981; 71 Pt C: 351-358
- 14) Markwell MA, McGroarty EJ, Bieber LL, Tolbert NE. The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. A new peroxisomal enzyme. *J Biol Chem* 1973; 248 (10) : 3426-3432
- 15) Geer BW, Krochko D, Williamson JH. Ontogeny, cell distribution, and the physiological role of NADP-malic enzyme in drosophila melanogaster. *Biochem Genet* 1979; 17 (9-10) : 867-879
- 16) Noltmann EA, Gubler CJ, Kuby SA. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (zwischenferment) . I. isolation of the crystalline enzyme from yeast. *J Biol Chem* 1961; 236: 1225-1230
- 17) Layman DK, Boileau RA, Erickson DJ, Painter JE, Shiue H, Sather C, Christou DD. A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women. *J Nutr* 2003; 133 (2) : 411-417
- 18) Layman DK, Evans E, Baum JI, Seyler J, Erickson DJ, Boileau RA. Dietary protein and exercise have additive effects on body composition during weight loss in adult women. *J Nutr* 2005; 135 (8) : 1903-1910
- 19) Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 2006; 312 (5775) : 927-930
- 20) Gropper SS, Smith JL, Groff JL. Chapter 4. Carbohydrates. In: Advanced nutrition and human metabolism 4th Ed. CA: Thomson Learning; 2005. p.94-96
- 21) Layman DK, Walker DA. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr* 2006; 136: 326S-323S
- 22) Garlick PJ. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J Nutr* 2005; 135 (6 Suppl) : 1553S-1556S
- 23) Rossetti L, Rothman DL, DeFronzo RA, Shulman GI. Effect of dietary protein on in vivo insulin action and liver glycogen repletion. *Am J Physiol* 1989; 257 (2 Pt 1) : E212-E219
- 24) Ferrannini E, Bevilacqua S, Lanzone L, Bonadonna R, Brandi L, Oleggini M, Boni C, Buzzigoli G, Ciociaro D. Metabolic interactions of amino acids and glucose in healthy humans. *Diab Nutr Metab* 1988; 3: 175-186
- 25) Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhausl W, Roden M. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* 2002; 51 (3) : 599-605
- 26) Piatti PM, Monti F, Fermo I, Baruffaldi L, Nasser R, Santambrogio G, Librenti MC, Galli-Kienle M, Pontiroli AE, Pozza G. Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: Comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. *Metabolism* 1994; 43 (12) : 1481-1487
- 27) Parker B, Noakes M, Luscombe N, Clifton P. Effect of a high-protein, high-monounsaturated fat weight loss diet on glycemic control and lipid levels in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25 (3) : 425-430
- 28) Jungas RL, Halperin ML, Brosnan JT. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev* 1992; 72 (2) : 419-448
- 29) Patti ME, Brambilla E, Luzi L, Landaker EJ, Kahn CR. Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J Clin Invest* 1998; 101 (7) : 1519-1529
- 30) Nishitani S, Takehana K, Fujitani S, Sonaka I. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288 (6) : G1292-G1300