

C57BL/6J Mice에서 스테비아(*Stevia rebaudiana bertonii*) 잎 추출물의 항비만 효과

박정은 · 기희진¹ · 차연수*

전북대학교 식품영양학과 · 인간생활과학연구소, ¹한국스테비아 주식회사

Effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaf Extract on Antiobesity in C57BL/6J Mice

Jeong-Eun Park, Heejin Kee¹, and Youn-Soo Cha*

Department of Food Science & Human Nutrition and Research Institute of Human Ecology, Chonbuk National University
¹Koreastevia Co., Ltd.

Abstract This study investigated the effects of *Stevia rebaudiana bertonii* leaf extract on lipid profiles in C57BL/6J mice, as compared to stevioside. Forty mice were divided into four groups: NC (normal diet and DW), HC (high fat diet and DW), HLSV (high fat diet and stevia leaf extract, 1 mL/kg/day), and HSS (high fat diet and stevioside, 1 mL/kg/day). Serum triglyceride concentrations were significantly lower in the HLSV and HSS groups than in the HC group. Epididymal fat pad weights were significantly lower in the HLSV and HSS groups than in the HC group. We also evaluated the serum and liver carnitine levels (NEC, AIAC, ASAC, TCNE) of all the groups. These results were supported by the mRNA expression of enzymes related to lipid metabolism (ACC, PPAR α , ACS, CPT-I) assessed by RT-PCR. Overall, the results show the antiobesity effects of stevia leaf extract as compared to stevioside in high fat diet induced obese mice.

Key words: *Stevia rebaudiana bertonii*, stevioside, C57BL/6J mice, carnitine, antiobesity

서 론

설탕은 현재까지 가장 많이 사용되어 온 깨끗한 단맛을 지니는 감미료로서 과량 섭취시 치아 우식증과 같은 부작용이 널리 인식되어 그 사용이 점차 감소하는 추세이며, 이를 대처할 다양한 종류의 대체 감미료가 개발되고 있다(1). 탄수화물인 설탕과 포도당을 과량 섭취하게 되면 상대적으로 영양소가 풍부한 다른 식품의 섭취가 적어져 영양불균형 상태를 초래할 수도 있으며 설탕으로부터 손쉽게 얻는 열량이 체지방으로 쉽게 축적되어 비만 문제뿐만 아니라 영양학적 불균형 문제도 야기할 수도 있다. 따라서 고감미를 지니면서 칼로리 섭취에 문제가 없는 새로운 감미료 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다(2).

비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형, 부적절한 식습관, 운동 부족, 정신적 문제, 유전적인 원인 및 내분비계 장애 등 다양한 원인으로 인해 지방조직이 과잉 축적되어 있는 상태를 의미한다(3). 최근 산업의 발전과 더불어 생활환경의 변화, 서구화된 식생활로 인해 비만, 환경오염, 스트레스, 각종 성인병 등이 복합적으로 우리들의 건강을 위협하고 있다. 특히, 비만으로 인한 고지혈증

(hyperlipidemia), 고인슐린혈증(hyperinsulinemia), 고혈압(hypertension), 인슐린저항성(insulin resistance), 제 2형 당뇨병, 심혈관계질환 등으로의 이환률이 급격하게 되고있다(4). 최근 10년간 한국인 비만 추이와 특성을 살펴보면 한국인의 비만 유병율이 급증하고 있어 비만 예방과 치료를 위해 보다 다각적인 모색이 필요하다(5).

스테비아(*Stevia rebaudiana bertonii*)는 단맛을 내는 약초로서 브라질과 파라과이에서 야생으로 자라는 국화(*Chrysanthemum*)속이다. 일본, 한국, 중국, 남미에서 주로 이용하며 음료를 포함하여 과자류, 채소절임, 해산물요리 등의 다양한 음식에 약 10여 년간 감미료로 이용되어 왔다. 현재 스테비아 추출물은 미국에서 식이 보충제로서 광범위하게 이용되고 있다. 스테비아의 단맛은 주로 steviol을 배당체로 하는 stevioside와 rebaudioside A로 구성되어있다. 마른 스테비아 잎에는 무게의 약 5-10%의 stevioside가 들어있으며, 감미성분은 설탕의 200-300배 단맛이 더 강하다. 스테비아의 독성에 대해 단기 및 장기독성 시험이 광범위하게 연구되어 왔는데 발암성과 유전독성은 포유류에서 없는 것으로 알려졌으며, 동물실험에서 스테비오사이드는 맹장에서 steviol(the aglicone)로 가수 분해된 후 흡수 되었다(6). 지금까지 스테비아에 관한 연구는 스테비아의 항당뇨(7), 항고혈압(8), 항산화능(9), 항돌연변이성(10) 및 항암성, 항균활성성분(11)등에 관한 연구가 국내외에서 이루어져 왔으며, 동물을 이용한 실험으로는 흰쥐를 이용한 체내 대사 및 배출에 관한 연구(6)와 무지개 송어를 이용한 항산화능(9) 검증에 관한 연구가 있다. 스테비아의 배당체인 stevioside는 현재 일본, 한국을 중심으로 의약품, 과자, 스낵, 소주, 장류, 절임식품, 수산가공품에 널리 사용되고 있으며 설탕과 감미질이 가

*Corresponding author: Youn-Soo Cha, Department of Food Science & Human Nutrition and Research Institute of Human Ecology, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
Tel: 82-63-270-3822
Fax: 82-63-270-3854
E-mail: cha8@chonbuk.ac.kr
Received March 24, 2010; revised June 18, 2010;
accepted July 2, 2010

장 유사한 감미료로서 당뇨병과 비만을 예방할 수 있는 천연 감미료로 주목받고 있다(1). 이러한 결과를 미루어 볼 때, 스테비아 추출물이 비만 예방 효과를 기대할 수 있는 소재로써 활용이 가능하다고 사료된다. 하지만 스테비아 잎 자체에 많은 phytochemical이 함유 되어 있음에도 불구하고 아직까지 스테비아 잎 추출물에 대한 비만관련연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 고지방식이로 비만 유도된 C57BL/6J mice에서 스테비아 잎 추출물과 스테비오사이드 보강이 지질대사에 미치는 영향을 비교하여 효능을 평가하고, 기능성식품 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

재료

스테비아는 유해성분의 첨가나 별도의 유전자 조작 없이 가공하지 않은 잎을 분리 건조하여 추출하였다. 추출된 원료에 300배의 물을 가하여 110°C로 3시간 30분 동안 가열하였다. 이때 얻어진 추출액을 농축조에 옮겨 담고, 60°C로 6-7시간동안 감압 농축하여 최종 당도가 23 brix가 되도록 농축시켰다. 이 농축액을 숙성실로 옮겨 개봉한 상태로 5일간 호기성 발효를 진행시킨 후, 다시 혐기성 상태에서 1095일 간 발효시킨 시료를 (주)한국스테비아(Gochang, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 또한 stevioside(순도 98%)는 (주)대평(Seongnam, Koera)에서 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 식이

본 연구에 사용된 실험동물은 생후 4주된 수컷 C57BL/6J mice를 Charles River Laboratories(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 1주일 동안 고형식이(Research diets, New Brunswick, NJ, USA)를 급여하여 환경에 적응 시킨 후 randomized block design에 의해 4군으로 나누었다(Normal diet control, NC; High fat diet control, HC; High fat diet & stevia extract, HLSV; High fat diet & stevioside, HSS).

실험동물들은 1군당 10마리씩 나누어 각각 무게를 비교하여 평균값을 계산하였고 물과 실험 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험 식이는 Research Diets(New Brunswick, NJ, USA)의 AIN-93 diet를 변형한 정장식이(11% fat kcal)와 고지방식이(60% fat kcal)를 구입하여 섭취하도록 하였다. 식이 조성은 Table 1과 같다.

14주 동안 정상 대조군(NC)와 고지방 대조군(HC)은 증류수를 하루에 1회 경구투여 하였으며, 스테비아 추출물 투여군(HLSV)은 스테비아 추출물(1 mL/kg/day), 스테비오사이드 투여군(H-SS)은 스테비오사이드를 스테비아 추출물과 같은 당도(23 brix)로 10배 희석하여 투여하였다. 식이 섭취량은 2일 간격으로 측정하였으며 체중은 1주일에 한 번씩 기록하였다. 실험기간동안 실내 온도는 23±1°C, 습도는 53±2%를 유지하고, 명암은 12시간(8:00-20:00) 주기로 조명하였다.

혈청과 조직처리

실험동물은 14주의 종료시기에 12시간 동안 절식시킨 후 희생시켰다. 혈액 샘플은 mouse의 안구혈액수집 방법에 의해 혈액을 채취하였다. 혈청은 1,500×g에서 15분간 원심분리하여 분석 전까지 -80°C에서 냉동 보관하였다. 지방조직과 간 등의 장기를 적출하여 생리식염수에 씻은 뒤 무게를 측정하고 액화질소에 담아 급속 냉동시켜 분석 전까지 -80°C에서 냉동 보관하였다.

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient	Normal diet	High fat diet		
	NC ¹⁾	HC	HLSV	HSS
casein	200 ²⁾	200	200	200
L-cystine	3	3	3	3
corn Starch	315	-	-	-
maltodextrin	35	125	125	125
sucrose	350	68.8	68.8	68.8
cellulose	50	50	50	50
soybean Oil	25	25	25	25
lard	20	245	245	245
mineral Mix	10	10	10	10
dicalcium Phosphate	13	13	13	13
calcium Carbonate	5.5	5.5	5.5	5.5
potassium Citrate	16.5	16.5	16.5	16.5
vitamin Mix	10	10	10	10
choline Bitartrate	2	2	2	2
FD&C Yellow Dye #5	0.05	-	-	-
FD&C Blue Dye #1	-	0.05	0.05	0.05
total	1055.05	773.85	773.85	773.85
kcal	4057	4057	4057	4057
protein (Kcal%)	20	20	20	20
carbohydrate (Kcal%)	70	20	20	20
fat (Kcal%)	10	60	60	60
kcal/g	3.8	5.2	5.2	5.2
administration	DW ³⁾	DW	stevia leaf extract	stevioside

¹⁾NC: Normal diet control; HC: High fat diet control; HLSV: High fat diet & stevia extract (1 mL/kg/day, 23brix); HSS: High fat diet & Stevioside (1 mL/kg/day, 23brix)

²⁾All components are in units of g/100 g diet.

³⁾DW: distilled water (1 mL/kg/day)

지질 분석

혈중 및 간 조직 중의 중성지방과 총콜레스테롤(total cholesterol) 농도는 시판되는 kit(Asan Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)를 사용하여 효소법으로 측정하였으며, HDL-콜레스테롤은 dextran sulfate-Mg⁺⁺ 침전법으로 측정하였다. 간조직 중 지질은 Folch 등 (12)의 방법에 따라 추출하여 사용하였다.

혈중 및 간중 carnitine 분석

혈중 및 간 조직의 carnitine 농도 분석은 동위원소를 이용한 Cederblad와 Lindstedt의 carnitine 분석방법(13)을 변형시킨 Sachan 등(14)의 방법을 이용하였다. 간조직은 0.3M perchloric acid(PCA)로 균질화 시킨 후 원심분리하여 상등액을 이용하여 측정하였다. 100-200 µL 정도의 시료를 200 µL의 0.3M-PCA에 소화시켜 1,500×g로 10분간 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리한 후, 상등액은 nonesterified carnitine(NEC)과 acid soluble acylcarnitine(ASAC)을 측정하는데 사용하였으며 침전물은 acid insoluble acylcarnitine(AIAC)을 측정하는데 사용하였다. NEC분석은 상등액 중 150 µL를 취해, 1M-KHCO₃로 중화시킨 다음 원심분리하여, 상등액 100 µL에 [1-¹⁴C]acetyl-CoA(Amersham, Arlington Heights, IL, USA) 함유된 반응액을 가하고 1 unit의 carnitine acyltransferase를 가한 뒤 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액 200 µL를 anionex-

change resin(Dowex 1×8-400)이 충전된 column을 통과시켜 [14 C] acetyl carnitine을 회수한 후 liquid scintillation counter(Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA)로 cpm을 측정하여 NEC 양을 계산하였다. ASAC분석은 상등액 100 μ L를 0.5N-KOH로 가수분해하고, PCA/MOPS-II로 중화한 다음 원심분리 하여 상등액을 분리한 후 동일한 방법으로 측정하였다. AIAC 분석은 침전을 0.6M-PCA로 3회 세척하여 잔존하여 NEC 및 ASAC를 완전히 제거한 후 0.5 N-KOH 200 μ L로 60°C에서 60분간 열탕분해하고, PCA/MOPS-I로 중화한 다음 원심분리하여 상등액을 분리한 후 동일한 방법으로 측정하였다. Total carnitine(TCNE)은 NEC, ASAC 및 AIAC 분획들의 합으로 산출하였다.

RNA preparation and RT-PCR

Total mRNA의 추출은 Trizol reagent에 의해 간 조직으로부터 추출하여 정제하였다. Total mRNA는 분광광도계를 이용하여 260과 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. acetyl-CoA carboxylase(ACC), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α), carnitine palmitoyl transferase-1(CPT-I) 및 acyl-CoA synthetase(ACS)의 cDNA 합성을 위하여 one-step RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) kit(ABgene, NY, USA)를 이용하여 RT-PCR(MWG-BIOTECH, PRIMUS)기기에서 RT-PCR 반응을 실시하였다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에서 전기 영동하여 ACC, PPAR- α , CPT-I 및 ACS 생성물을 확인하였다. 본 실험에서 다음과 같은 PCR primer가 사용되었으며 (주)바이오닉스(Seoul, Korea)에서 구입하였다. Acetyl CoA carboxylase(ACC) Forward(F): 5'-CCAACATGAGGACTATAACTTCCT-3', Reverse(R): 5'-TACATACGTGCCGTGTCAGGCTTCAC-3'; peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) F: 5'-GGATGTCACACAATGCAATTCGCT-3', R: 5'-TCACAGAACGGCTTCCTCAGGTT-3'; carnitine palmitoyltransferase-I(CPT-I) F: 5'-AAAGATCAATVGACCCTAGACA-3', R: 5'-CAGCGAGTAGCGCATAGICA-3'; acyl-CoA synthetase (ACS) F: 5'-TGAAGCCATCACGATCATAGTCAAC-3', R: 5'-TCGACTGTACTTTGTGGAAGATCA-3'; β -actin F: 5'-ATGGAT GACGATATCGCT-3', R: 5'-ATGAGG-TAGTCTGTCAGGT-3'.

통계 분석

모든 실험의 결과는 평균(mean) \pm 표준편차(SD; standard deviation)로 나타내었다. 그룹 간의 유의성 검증은 SPSS 12.0 프로그램을 이용하여 ANOVA분석을 하였고 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, $p < 0.05$ 수준에서 그룹 간의 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

실험동물의 체중, 식이 섭취량, 식이 효율

실험 시작 시 체중변화는 정상 대조군(NC)과 고지방식이군(HC) 간에는 차이가 없었으나, 실험 종료 시 정상 대조군(NC)보다 고지방 대조군(HC)에서 유의적으로 증가되어 고지방식이로 비만이 유도되었음을 확인하였다(Table 2). 따라서 장기간의 고열량식이 섭취는 생쥐의 체중을 현저하게 증가시켰으며, 이와 같은 결과는 선행연구에서 고열량식에 의한 실험동물의 체지방량 증가 및 비만이 유도된 결과와 일치하였다(15). 본 연구에서 군 간의 식이섭취량에 차이가 없었음에도 스테비아 추출물 투여군(HLSV)은 유의적으로 체중 증가량이 감소되었고, 스테비오사이드 투여군(HSS)에서는 고지방 대조군(HC) 비교 시 감소하는 경향을 보였으나 유의적 차이는 없었다(Table 2). 이는 스테비아 추출물과 스테비오사이드를 닭(브로일러)에 투여하였을 때 스테비아 추출물 투여군(HLSV)이 스테비오사이드 투여군(HSS)에 비해 체중증가량이 낮아졌음을 제시한 연구와 일치하는 결과로(16) 스테비아 투여가 고지방식이로 인한 체중증가를 억제시키는데 영향을 미친 것으로 보여진다.

부고환지방과 등지방 무게

부고환지방(epididymal fat)과 등지방(back fat)의 무게는 Fig 1. 과 같다. 부고환지방은 정상 대조군(NC)이 다른 세 군에 비해 유의적으로 낮았고, 고지방 식이섭취군에서 고지방 대조군(HC)이 스테비아 추출물 투여군(HLSV)과 스테비오사이드 투여군(HSS)군과 비교 시 유의적으로 높았다. 등지방 또한 정상 대조군(NC)은 고지방섭취군에 비해 유의적으로 낮았으며, 스테비아투여군(HLSV)은 고지방 대조군(HC)에 비해 유의적으로 낮아졌다(Fig 1). 선행연구에 따르면, 고지방식을 한 C57BL/6J mice는 특히 부고환 지방이 증가한다고 보고되었으며(17,18), 본 연구에서도 고지방식을 섭취한 군에서 이와 일치한 결과를 나타냈다. 그러나 본 연구에서 스테비아 추출물과 스테비오사이드를 섭취한 군은 부고환 지방과 등지방이 감소하는 결과를 보였는데 이는 스테비아 추출물과 스테비오사이드의 체중감소 효과에 의한 것으로 보인다.

혈중 및 간 조직의 지질농도

본 연구에서 혈중 중성지방은 고지방 대조군(HC)이 정상 대조군(NC)군보다 유의적으로 높아졌으며, 스테비아 추출물 투여군(HLSV)과 스테비오사이드 투여군(HSS)은 고지방 대조군(HC)과 비교 시 유의적으로 낮아졌다(Table 3). 간 조직의 중성지방은 고지방 대조군(HC)과 스테비오사이드 투여군(HSS)군보다 스테비아

Table 2. Initial weight, weight gain, food intake and feed efficiency ratio

Groups ¹⁾	ND		HD	
	NC	HC	HLSV	HSS
Initial weight (g)	20.47 \pm 1.18 ²⁾	22.24 \pm 1.87	21.32 \pm 1.24	22.76 \pm 1.29
Weight gain (g)	3.69 \pm 1.80 ³⁾	17.16 \pm 4.53 ^a	15.04 \pm 3.96 ^b	16.09 \pm 3.54 ^{ab}
Food intake (g/day)	2.36 \pm 0.04	2.09 \pm 0.03	1.95 \pm 0.10	2.10 \pm 0.08
Feed efficiency ratio	0.015 \pm 0.07 ^b	0.078 \pm 0.02 ^a	0.073 \pm 0.007 ^a	0.073 \pm 0.015 ^a

¹⁾NC: Normal diet control; HC: High fat diet control; HLSV: High fat diet & stevia extract; HSS: High fat diet & stevioside.

²⁾Mean \pm SD of 10 mice per group.

³⁾a-c: Values with different superscripts in a row are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple test at $p < 0.05$.

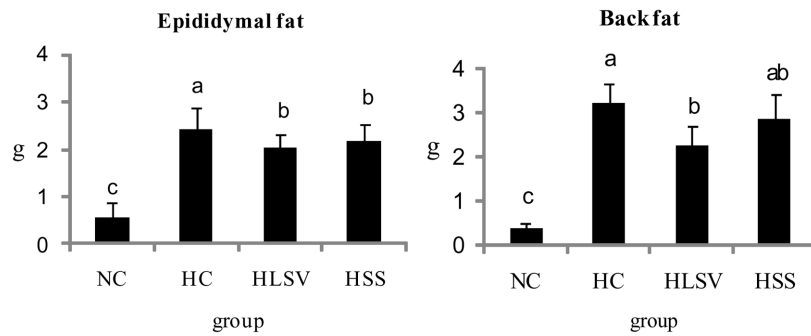


Fig. 1. Epididymal fat and back fat weight. Mean±SD of 10 mice per group. a-c: Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan’s multiple test at $p<0.05$. NC: Normal diet control; HC: High fat diet control; HLSV: High fat diet & stevia extract; HSS: High fat diet & stevioside.

Table 3. Lipid concentrations in mice

Groups ¹⁾	ND		HD	
	NC	HC	HLSV	HSS
Serum (mg/dL)				
TG	112.86±7.23 ^{c2)3)}	146.68±29.29 ^a	122.10±11.38 ^b	127.30±11.10 ^b
TC	116.36±10.30 ^c	203.12±16.97 ^b	234.28±11.38 ^{ab}	249.03±30.16 ^a
HDL-c	28.88±9.41 ^b	61.87±2.73 ^a	62.94±6.26 ^a	64.88±8.32 ^a
HDL-c/TC	0.51±0.12	0.61±0.19	0.56±0.17	0.51±0.11
Liver (mg/g)				
TG	19.09±2.40 ^b	24.00±1.75 ^a	21.28±6.90 ^{ab}	23.23±7.40 ^a
TC	1.33±1.89	0.82±1.74	0.87±1.43	0.80±1.53

¹⁾NC: Normal diet control; HC: High fat diet control; HLSV: High fat diet & stevia extract; HSS: High fat diet & stevioside.

²⁾Mean±SD of 10 mice per group.

³⁾a-c: Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan’s multiple test at $p<0.05$.

추출물 투여군(HLSV)에서 낮아지는 경향을 보였다. 혈중 총콜레스테롤 농도는 스테비아 추출물(HLSV)은 고지방 대조군(HC)과 스테비오사이드 투여군(HSS)과 비교 시 유의적인 차이가 없었다. 반면, 스테비오사이드 투여군(HSS)군은 고지방 대조군(HC)에 비교시 유의적으로 높아졌으며 혈중 총콜레스테롤과 스테비오사이드의 상관관계는 향후 연구되어야 할 것으로 사료된다. 간 조직의 총콜레스테롤 농도는 군간 유의적인 차이가 없었다. 반면, 스테비아 추출물 투여군(HLSV)은 스테비오사이드군(SS)과 비교 시 혈중 총콜레스테롤과 간중 중성지방이 낮아지는 경향을 보였다. 이는 스테비아가 비만개선 감미료로써 충분하다는 것을 의미한다. 스테비아 추출물은 고당도·저칼로리이므로 비만개선에 효과적인 것으로 알려져 있는데(19) 본 실험에서 고지방 섭취로 인한 조직 중의 지질 축적을 효과적으로 억제하는 것으로 평가된 바, 이는 스테비아 추출물이 혈중 지질을 개선함으로써 죽상경화증의 발병에 영향을 주는 고지혈증 예방에 효과적일 것으로 평가된다.

혈중 및 간중 carnitine 농도

Carnitine은 장쇄 지방산을 미토콘드리아 내의 매트릭스(matrix)로 이동시키는 중요한 역할을 한다. 장쇄 아실-CoA(long-chain acyl-CoA)는 미토콘드리아의 내막을 통과할 수 없으므로, 미토콘드리아 내막에 존재하는 효소인 carnitine palmitoyl transferase I (CPT-I)에 의해 acyl-carnitine으로 전환되고, 생성된 acyl-carnitine은 carnitine 전이효소(carnitine-acylcarnitine transferase; CT)라는 효소에 의해 미토콘드리아의 매트릭스(matrix)로 이동된다. 이렇게 이동된 장쇄지방산(long-chain fatty acids)은 β-oxidation를 통해

Krebs cycle로 들어가 에너지를 공급하게 된다(20). 카르니틴은 간이나 신장에서 리신(lysine)과 메티오닌(methionine)이 결합되어 합성되며 지방축적을 예방한다. 특히 혈중 AIAC와 ASAC는 지방산 활성화에 매우 유용한 표지물이며, NEC는 운반효소(carnitine translocase; CT) 활성화에 의해 다시 세포질로 보내게 되는 가역적인 반응을 반복하게 된다(21).

혈중 및 간 조직 중의 carnitine 농도는 Table 4와 같다. 혈중 ASAC, TCNE 및 Acyl/free carnitine 비율은 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았고 혈중 NEC는 HLSV군과 HSS군이 HC군보다 유의적으로 높은 수치를 나타냈으며, AIAC는 고지방 대조군(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)과 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 증가하는 경향을 보였으며 특히, 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 유의적으로 증가하였다. NEC의 증가는 에너지기질로서 지방산의 활용을 가능하게 하며 지방산 산화의 효율을 향상시키며, 혈중 아실carnitine은 탈진적 운동 후 또는 기아상태에서 증가된다. 이때 지방산은 미토콘드리아 내에서 일시적으로 연료로서의 역할을 대신하게 된다(22,23). 이는 이전 연구에서 마른 zucker rat보다 비만 zucker rat에서 아실carnitine인 혈중 ASAC 낮았다는 결과와 유사하다(24). 또한 간 조직 중의 AIAC는 각 군 간 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, NEC와 TCNE는 정상 대조군(NC)에 비해 고지방을 섭취한 군에서 낮아졌지만 군간 유의적 차이는 없었다. Acyl/free carnitine은 고지방 대조군(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)과 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 증가하는 경향을 보였으며 특히, 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 유의적으로 증가하였다. 비만 일 경우 간의 carnitine 농도가 감소되어 있다는 보고가 있으나 그 기

Table 4. Carnitine concentrations

Groups ¹⁾	ND		HD	
	NC	HC	HLSV	HSS
Serum (μmol/dL)				
NEC	0.53±0.15 ^{b2)3)}	0.61±0.10 ^b	0.81±0.06 ^a	0.74±0.12 ^a
ASAC	1.06±0.34	1.24±0.33	1.14±1.19	1.18±0.32
AIAC	0.56±0.13 ^a	0.28±0.11 ^b	0.35±0.06 ^{ab}	0.43±0.92 ^a
TCNE	2.16±0.54	2.24±0.48	2.20±0.25	2.35±0.46
Acyl/free	2.89±0.81	2.40±0.33	2.26±0.53	2.17±0.48
Liver (μmol/g)				
NEC	209.66±59.44 ^a	115.79±25.12 ^b	113.88±7.40 ^b	115.27±22.01 ^b
ASAC	246.23±66.98 ^a	176.09±23.40 ^{ab}	141.63±21.58 ^b	174.02±17.62 ^{ab}
AIAC	0.048±0.027	0.027±0.009	0.014±0.006	0.024±0.014
TCNE	455.94±22.39 ^a	291.88±35.56 ^b	276.57±27.17 ^b	328.51±56.56 ^b
Acyl/free	1.25±0.10 ^b	1.27±0.13 ^b	1.31±0.25 ^{ab}	1.42±0.28 ^a

¹⁾NC: Normal diet control; HC: High fat diet control; HLSV: High fat diet & stevia extract; HSS: High fat diet & stevioside. NEC: non-esterified carnitine; ASAC: acid soluble acyl carnitine; AIAC: acid insoluble acylcarnitine; TCNE: total carnitine; Acyl/free: ASAC+AIAC/TCNE.

²⁾Mean±SD of 10 mice per group.

³⁾a-c: Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple test at $p < 0.05$.

전을 알려져 있지 않다. Clouet 등(25)에 의하면 비만 쥐에서 마른 쥐에 비해 간 비대가 더 심하였고 중성지방도 증가하였던 것으로 미루어 지방이 산화보다 저장 및 에스테르화로 진행이 뚜렷하였고, 그 원인은 이들 쥐에서 carnitine 양이 현저한 감소와 carnitine acyl transferase I(CPT-I)의 활성저하로 지방산이 미토콘드리아 내로 적게 이동하였을 것으로 추측하였다. 본 연구에서 스테비아 추출물과 스테비오사이드의 보강은 carnitine 수준의 증가와 더불어 β-산화를 증가시켜 체내 지방축적을 감소시킨 것으로 사료된다.

지질대사 관련 mRNA 발현 수준

간 조직으로부터 PPARα, ACC, CPT-I, 그리고 ACS mRNA 발현 수준을 측정된 결과는 Fig 2와 같다. ACS mRNA 발현 수준은 고지방대조군(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)와 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 증가하는 경향을 보였으며 특히, 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 유의적으로 증가하였다(Fig 2). ACS의 조절기능은 지방산 산화 기전에서 매우 중요한 의미를 갖는데 그것은 ACS가 지방산 대사 반응을 최초로 촉매하는 효소이기 때문이다. Triglyceride가 합성되기 위해서는 ATP에 의하여 glycerol은 glycerol kinase의 작용으로 인해 glycerol-3-phosphate로 활성화되고, 지방산은 ACS의 작용으로 acyl-CoA로 활성화 된다(26). 미토콘드리아에서의 지방산 산화를 조절하는 인자들로는 PPARα, PPARδ, PPARγ coactivator-1(PGC-1) 및 AMP-activated protein kinase(AMPK) 등이 있다. 이 중 가장 잘 알려져 있는 PPARα는 핵수용체의 하나로서 활성 시 지방산 수송단백질 및 long-chain acyl-CoA synthase 발현을 유도하여 미토콘드리아 내로의 지방산 흡수를 증가시키고, acyl-CoA oxidase 및 CPT-I의 발현을 증가시켜 지방산 산화를 증가시킨다(27). 본 연구 결과, PPARα mRNA 발현 수준은 고지방대조군(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)와 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 유의적으로 증가하였으며, CPT-I mRNA 발현 수준은 고지방대조군(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)이 유의적으로 증가했으며, 스테비오사이드 투여군(HSS)은 유의적 차이가 없었다(Fig 2). 이전 연구에서 다양한 식물성 페놀이 PPARα를 활성화 시킴으로써 지방산 산화에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조

절했다는 결과와 같은 맥락이다(28-30). 따라서 본 연구에서 스테비아 추출물 투여로 PPARα mRNA 발현 수준이 증가됨으로써 CPT-I mRNA를 활성화 시킨 것으로 사료된다.

또한, ACC mRNA 발현 수준은 정상대조군(NC)과 비교 시 고지방대조군(HC)에서 유의적으로 증가하였고, HLSV군은 HC과 비교 시 유의적으로 감소하였으나 스테비오사이드 투여군(HSS)은 차이가 없었다(Fig 2). ACC는 지방대사가 증가할 경우에 생성되는 효소 물질 가운데 하나로, ACC는 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 전환시켜 지방산 합성에 관여할 뿐 아니라 미토콘드리아에서 지방산의 산화를 조절한다. Malonyl CoA는 미토콘드리아내로의 장쇄 아실-CoA(long-chain acyl-CoA)의 이송을 조절하는 CPT-I을 억제하는 역할을 하는데 ACC의 작용억제는 malonyl CoA의 농도를 감소시킴으로써 결과적으로 CPT-I에 대한 억제효과가 감소하게 되어 지방산 산화가 증가된다(31). 따라서, 스테비아 추출물이 PPARα mRNA를 증가시키고, ACC mRNA를 억제시킴으로써 CPT-I mRNA의 활성을 증가시켜 지방산의 β-산화를 증가시킨 것으로 사료된다. 결론적으로, C57BL/6J mice에서 스테비아 추출물은 지질대사를 개선시켜 체내 지방축적을 억제한 것으로 보여진다.

요 약

미국의 영양사협회(32)에서는 설탕에서 얻은 열량을 전체 섭취량의 10-15%까지로 유지할 것을 권장하고 있고, WHO(33)에서는 전체 섭취 열량의 10% 이하로 권장하고 있다. 서구사회에서 뿐만 아니라 우리나라에서도 설탕 섭취량은 꾸준히 증가하고 있는데, 성인 1인 1일 당류 공급량은 1962년 4.8g에서 1987년 41.9g, 2003년 57.4g으로 나타났으며(34), 2007년 한국인의 1일 평균 설탕 섭취량은 100g, 총 섭취량의 20%로 권장량의 두 배 이상으로 점차 증가되고 있다(35). 그러나 본 실험에서 사용된 스테비아의 당도는 설탕의 200배 이상이나 칼로리는 설탕의 90분의 1에 불과하여 설탕의 대체제로서 가능성이 충분할 것으로 보여진다. 이에 본 연구는 스테비아 잎 추출물 보강이 고지방식으로 비만이 유도된 C57BL/6J mice에서 항비만 효과를 알아보고자 하였다. 실험동물은 정상 대조군(NC), 고지방 대조군(HC), 고지방식이+스테비아 잎 추출물 투여군(HLSV, 1 mL/kg/day), 고지방식이

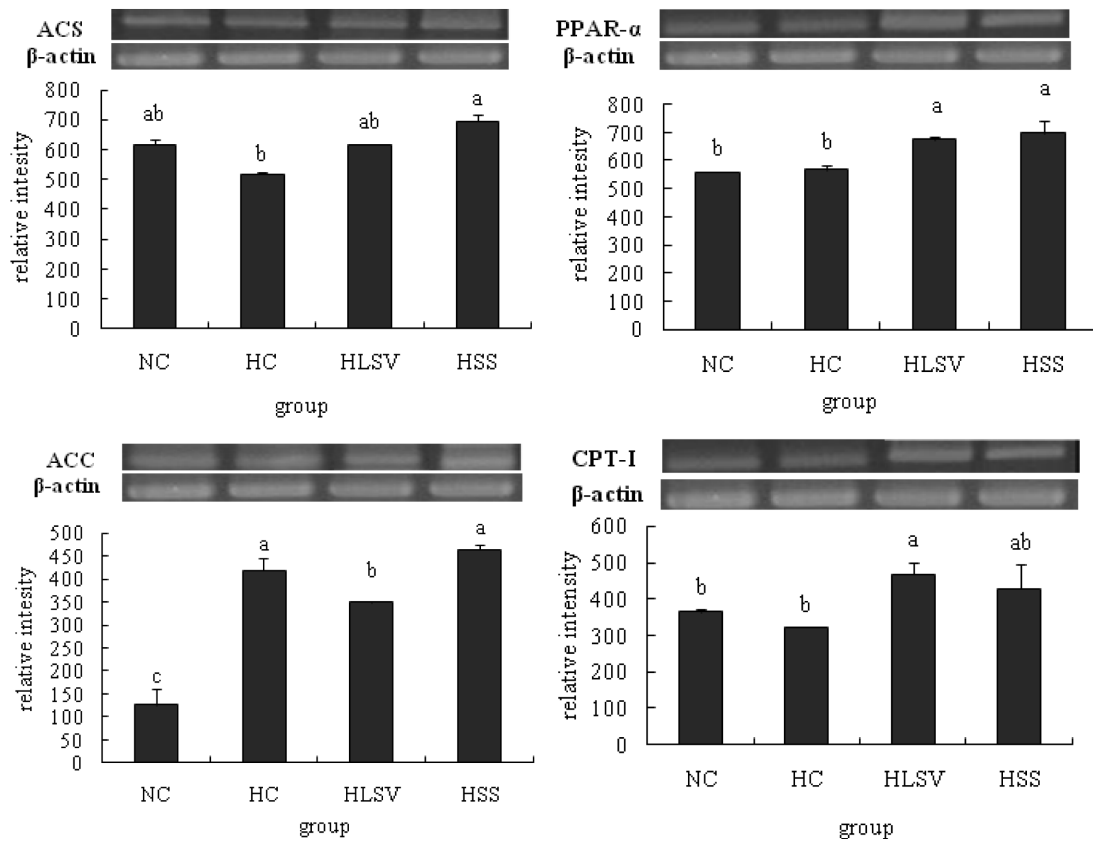


Fig. 2. mRNA levels of lipid metabolism-related genes in the liver of C57BL/6J mice. Mean±SD of 10 mice per group. a-c: Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with Duncan's multiple test at $p < 0.05$. NC: Normal diet control; HC: High fat diet control; HLSV: High fat diet & stevia extract; HSS: High fat diet & stevioside; PPAR α : Peroxisome Proliferator-activated Receptor α ; ACS: acyl-CoA synthetase; CPT-I: carnitine palmitoyltransferase-I; ACC: acetyl CoA carboxylase.

+스테비오사이드 투여군(HSS, 1 mL/kg/day) 4군으로 나누어 사육하였으며, 연구결과는 다음과 같다. 체중증가량은 스테비아 잎 추출물 투여군(HLSV)에서 고지방 대조군(HC)과 비교 시 유의적으로 감소하였으나, 스테비오사이드 투여군(HSS)은 고지방 대조군(HC)비교 시 감소하는 경향을 보였고 유의적 차이는 없었다. 부고환지방은 스테비아 잎 추출물 투여군(HLSV)과 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 고지방 대조군(HC) 보다 유의적으로 감소하였고, 등지방은 스테비아 잎 추출물 투여군(HLSV)에서 유의적으로 감소하였다. 혈중 및 간중 중성지방은 스테비아 잎 추출물 투여군(HLSV)이 고지방 대조군(HC)보다 유의적으로 감소하였으며, 스테비오사이드 투여군(HSS)은 고지방 대조군(HC)에 비해 혈중 중성지방이 유의적으로 감소하였다. 혈중 카르니틴 중 NEC의 농도는 고지방 대조군(HC) 보다 스테비아 잎 추출물 투여군(HLSV)과 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 유의적으로 증가하였으며 혈중 ASAC와 간중 acyl/free carnitine은 고지방 대조군(HC)과 비교 시 스테비아 잎 추출물 투여군(HLSV)과 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 증가하는 경향을 보였다. 지질대사와 관련한 체내 mRNA 발현정도를 측정 한 결과 ACS mRNA 발현 수준은 고지방대조군(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)와 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 증가하는 경향을 보였으며 특히, 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 유의적으로 증가하였다. PPAR α mRNA 발현 수준은 고지방대조군(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)와 스테비오사이드 투여군(HSS)에서 유의적으로 증가하였으며, CPT-I mRNA 발현 수준은 고지방대조군

(HC)과 비교 시 스테비아 추출물 투여군(HLSV)이 유의적으로 증가하였다. ACC mRNA 발현 수준은 정상대조군(NC)과 비교 시 고지방대조군(HC)에서 유의적으로 증가하였고, 스테비아 추출물 투여군(HLSV)은 고지방 대조군(HC)과 비교 시 유의적으로 감소하였으나 스테비오사이드 투여군(HSS)은 차이가 없었다. 결과적으로 스테비아 잎 추출물은 스테비오사이드에 비하여 체내 지질 대사개선에 더 효과적인 것으로 보였으며 이는 스테비아의 다양한 phytochemical에 의한 것으로 보여진다. 따라서 이러한 결과는 스테비아가 비만을 치료하거나 예방하는데 효과적으로 활용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

문헌

1. Park DC, Lee YH. Production, transglycosylation and application of stevioside. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2: 31-41 (1997)
2. Choi SY, Jang EG, Hwang IK. The sensory characteristics and estimation of shelf-life by Q10 values with mixtures of high-intensity sweeteners for beverage during storage. Korean J. Food Cookery SCI. 21: 235-242 (2005)
3. Chua SC, Leibel RL. Obesity genes: Molecular and metabolic mechanisms. Diabetes 5: 2-7 (1996)
4. Kim DJ, Kwon CK, Choi DJ, Ka KH, Kim TM, Kim BT, Lee BK, Hwang JH, Ann ES, Kim DY. Effects of nutritional education and exercise intervention on improvement of diet intakes and metabolic risk factors in obese middle aged women. Korean Soc. Exerc. Nutr. 13: 179-184 (2009)
5. Kang JH, Kim NS. Secular trend of obesity prevalence in Korea.

- Korean Soc. Study of Obes. 11: 329-336 (2002)
6. Koyama E, Kitazawa K, Ohori Y, Izawa O, kakegawa K, Fujino A, UI M. *In vitro* metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture, and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food Chem. Toxicol.* 41: 359-374 (2003)
 7. Dyrskog SE, Jeppensen PB, Colombo M, Abudula R, Hermansen K. Preventive effects of soy based diet supplemented with stevioside on development of type 2 diabetes. *Metabolism* 54: 1181-1188 (2005)
 8. Chan P, Xu DY, Liu JC, Chen YJ, Tomlinson B, Huang WP, Cheng JT. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertension rats. *Life Sci.* 19: 1679-1684 (1998)
 9. Srijani G, Anindita B, Avijit P, Sharmila C. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (bertoni) bertoni, a natural sweetener. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10962 - 10967 (2007)
 10. Yasukawa K, Kitanaka S, Shujiro S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1488-1490 (2002)
 11. Tomita T, Sato N, Arai T, Shiraishi H, Sato M, Takeuchi M, Kamio Y. Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* 157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiol. Immunol.* 41: 1005-1009 (1997)
 12. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GHS. Simple method for the isolation of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 22: 497-509 (1983)
 13. Cederbad G, Lindstedt S. A method for the determination of carnitine in the picomole range. *Clin. Chem. Acta* 37: 235-243 (1972)
 14. Sachan DS, Rhew TH, Ruark RA. Ameliorating effects of carnitine and its precursors on alcohol-induced fatty liver. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 738-744 (1984)
 15. Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Ferguson K, Thompson PA, Holloszy JO. High-fat diet-induced muscle insulin resistance: Relationship to visceral fat mass. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* 279: R2057-R2065 (2000)
 16. Atteh JO, Onagbesan OM, Tona K, Decuypere E, Geuns JMC, Buyse J. Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: Effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters, and growth performance. *J. Anim. Physiol. An. N.* 92: 640-649 (2008)
 17. Hagit EF, Sandra AS, Michi MS, Renee CL, Edwin GK. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* 48: 1-5 (1999)
 18. Kang SA, Jang KH, Hong KH, Choi WA, Jung KH, Lee IY. Effects of dietary β -glucan on adiposity and serum lipids levels in obese rats induced by high fat diet. *J. Food Sci. Nutr.* 31: 1052-1057 (2002)
 19. Giese JH. Alternative sweeteners and bulking agents. *Food Technol.* 47: 114-126 (1993)
 20. Lee YS, Ha MS, Lee SH, Lee SK. Effects of albumin and carnitine ingestion on energy metabolism variables and fat oxidation during exercise of maximal fat oxidation exercise intensity. *J. Korean Soc. Exerc. Physiol.* 13: 493-503 (2004)
 21. Friolet R, Hoppeler H, Krhenbhl S. Relationship between the coenzyme A and the carnitine pools in human skeletal muscle at rest and after exhaustive exercise under normoxic and acutely hypoxic conditions. *J. Clin. Invest.* 94: 1490-1495 (1994)
 22. Aggett PJ, Haschke F, Heine W, Hernell O, Koletzko B, Launiala K, Rey J, Rubino A, Schoch G, Senterre J, Tormo R. Comment on the content and composition of lipids in infant formulas ESPGAN Committee on Nutrition. *Acta Paediatr. Scand.* 80: 887-896 (1991)
 23. Yamaguti K, Kuratsune H, Watanabe Y, Takahashi M, Nakamoto I, Machii T, Jacobson GB, Onoe H, Matsumura K, Valind S, Lngstrm B, Kitani T. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 225: 740-746 (1996)
 24. Brady LJ, Brady PS, Albers L, Davis AT, Hoppel CL. Carnitine metabolism in lean and obese Zucker rats during starvation. *J. Nutr.* 116: 668-674 (1986)
 25. Clouet P, Henninger C, Bard J. Study of some factors controlling fatty acid oxidation in liver mitochondria of obese zucker rats. *Biochem. J.* 239: 103-108 (1986)
 26. Kondo J, Abe T, Nishikawa K, Kimura S, Hashimoto T, Yamamoto T. Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 265: 8681-8685 (1990)
 27. Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53: S43-50 (2004)
 28. Lee K. Transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by green tea extracts. *J. Vet. Sci.* 5: 325-330 (2004)
 29. Kim S. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR alpha. *Mol. Cell. Endocrinol.* 220: 51-58 (2004)
 30. Kim S. Hepatic gene expression profiles are altered by genistein supplementation in mice with diet-induced obesity. *J. Nutr.* 135: 33-41 (2005)
 31. Saha A, Ruderman NB. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: An expanding partnership. *Mol. Cell. Biochem.* 253: 65-70 (2003)
 32. Franz MJ, Maryniuk MD. Position of the ADA: Appropriate use of nutritive and non-nutritive sweeteners. *J. Am. Diet. Assoc.* 87:1689-1693 (1987)
 33. Anonymous. Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. A report of the WHO study group on diet, nutrition, and prevention of noncommunicable diseases. *Nutr. Rev.* 49: 291-301 (1991)
 34. KREI. Food Balance Sheet. Korea Rural Economic Institute, Seoul, Korea. p. 34 (2003)
 35. Kim SH, Chung HK. Sugar supply and intake of Koreans. *Korean Nutr. Soc.* 40: 22-28 (2007)