

Inhibition of Adipocyte Differentiation and Adipogenesis by Supercritical Fluid Extracts and Marc from *Cinnamomum verum*

Sung-Jin Park¹, In-Seon Lee¹, Sam-Pin Lee^{1,2} and Mi-Hee Yu^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received January 14, 2013 / Revised April 2, 2013 / Accepted April 3, 2013

This study was performed to evaluate the antiobesity effect of supercritical fluid extracts (SFC) and marc methanol extracts (SFM) from *Cinnamomum verum* in 3T3-L1 preadipocytes. In inducing the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in the presence of an adipogenic cocktail, iso-butylmethylanthine (IBMX), dexamethasone, and insulin, treatment with fraction residue SFC and SFM. SFC significantly reduced the mRNA expression of the transcription factor peroxisome proliferator-activated-receptor- γ (PPAR γ), the sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c), and the CCAAT enhancer-binding-protein α (C/EBP α) in a concentration-dependent manner. Moreover, SFC markedly down-regulated acyl-CoA synthetase-1 (ASC1), fatty acid synthesis (FAS), fatty acid transport-1 (FATP1), fatty acid binding protein 4 (FABP4), and perilipin. These findings suggest that SFC may be a potential therapeutic adjunct for obesity by targeting the differentiation of preadipocytes, as well as their functions.

Key words : Adipocyte, anti-obesity, CCAAT enhancer-binding-protein α (C/EBP α), *Cinnamomum verum*, peroxisome-proliferators-activated-receptor- γ (PPAR γ)

서 론

현대사회는 생활환경의 편의, 교통의 발달, 과학과 의학의 발달로 인하여 과거에 비하여 매우 풍족한 생활을 누리고 있지만, 신체활동의 감소 및 과도한 칼로리 섭취로 인해 비만 인구가 급속도로 증가하고 있다. 비만은 유전적, 환경적, 사회적 요인 등 다양한 원인들이 관여하는 복합적 증후군으로, 과도한 에너지 섭취 후 체내 대사활동으로 소비되고 남은 것이 지방으로 축적되어 발생된다[1, 9]. 비만은 세계적인 문제로 2015년에는 비만 인구가 7억 명에 이를 것으로 추산되며, 비만의 효과적인 치료 및 예방방법에 대하여 많은 연구가 수행되고 있다[32, 37, 38]

비만으로 인한 체내 지방조직의 과도한 에너지 축적과 지방세포의 과다 증식은 불균형적인 에너지 대사를 유발하게 되고, 에너지 대사의 불균형은 고지혈증, 고혈압, 동맥경화 등과 같은 심혈관 질환을 발생시키고, 혈중 중성지질과 LDL-콜레스테롤의 양이 증가되어 고지혈증을 발생시켜 말초조직과 복부에 중성지질을 축적시켜, 인슐린 저항성, 당뇨, 지방간을 발

생시켜 다양하고 심각한 합병증을 유발한다[21, 27, 34, 35] 비만은 지방전구세포의 분화 및 adipogenesis 과정에 의하여 지방세포의 세포 내 triglyceride 축적으로 발생되고, 따라서 이러한 지방전구세포 분화 및 adipogenesis를 저해하여 항비만 효과를 얻을 수 있다.

지방세포의 형성 과정은 전사인자인 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)와 peroxidase proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP 1c)의 발현에 의하여 이루어지고, 지방수송, 합성, 축적과 관계되는 전사인자들 acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), acyl-CoA synthase (ACS), fatty acid binding protein 4 (FABP4), Fatty acid transport protein 1 (FATP1), perilipin을 발현시키게 된다[6, 8, 22, 30, 31, 35, 41].

이러한 지방세포의 분화를 저해하기 위하여 운동이나 식이요법을 이용한 방법들이 사용되고 있지만, 바쁜 현대인들의 경우 비만치료제나 보조식품 섭취가 주로 이용되고 있다. 현재 sibutramine (Reductil), phentermine과 orlistat (Xenical)이 사용되고 있으나, 혈압의 상승이나, 복통, 불안, 변비, 불면, 두통 등의 부작용으로 인해 사용에 주의를 필요로 한다[2, 10, 29]. 따라서 안전한 비만예방을 목적으로 한 천연물 연구가 시도되고 있다[4, 14, 16, 19, 20, 39].

천연물 중 계피(cinnamon)는 세계적으로 사용되는 인류의 오래된 향신료로서 녹나무과에 속하는 계피나무의 껍질을 말한다. 주요성분으로는 cinnamaldehyde, cinnamic acid, euge-

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5538, Fax : +82-53-580-5538

E-mail : yumh55@kmu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

nol 등의 향기성분을 함유하고 있으며, 진정작용 말초혈관확장, 해열, 건위, 항산화 작용, 생육억제 등의 약리 효능이 있고, 장내 가스 제거제, 방부제로 한방에서도 이용하였다[12, 13, 19, 26, 40].

본 연구에서는 계피의 초임계 추출물 및 메탄올 추출물을 이용하여 3T3-L1 지방세포의 분화 초기전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 의 저해능을 비교하고 저해능이 가장 우수한 시료의 지방수송, 축적, 합성에 관여하는 전사인자에 미치는 영향을 확인하여 천연물의 효과적 이용방법과 천연오일의 비만 억제 식품으로서의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 계피는 중국산 계피를 대구시 약령시장에서 건조 상태의 것을 구입하여 20~30 mesh의 분말로 분쇄하여 밀봉하여 저온, 암실에서 보관하며 추출 및 실험에 사용하였다.

계피 초임계 추출물(SFC)의 제조

초임계 추출 장치는 Waters AD-RC 08 (Waters CO., Milford, MA, USA)를 사용하였다. 분말화된 건계피를 추출 용기에 300 g을 넣어 CO₂ flow rate: co-solvent의 flow rate를 47.5 g/min: 2.5 g/min으로 하여 total flow rate (CO₂ flow rate + co-solvent flow rate)를 50 g/min의 속도로 흘려주었고 co-solvent로는 HPLC급 ethyl alcohol (JT Baker Co., Phillipsburg, NJ, USA)를 사용하였다. 추출 온도는 35°C, 압력 300 bar 조건에서 30분씩 4회 반복하여 총 120분 추출하였다.

초임계 박 메탄올 추출물(SFM), 계피 메탄올 추출물(ME) 제조 및 추출수율

초임계 추출을 하고 남은 부산물인 계피 박과 건계피를 무게의 10배(w/v)의 메탄올(80%)을 가하여 24 시간 동안 정치 배양하여 총 3회 추출하였다. 추출액은 여과지(whatman No. 3)를 사용하여 여과하고 상등액은 rotary vacuum evaporator (UNI TRAP UT-1000, Eyela, Tokyo, Japan)로 55°C에서 농축하여 사용하여 동결하여 사용하였다.

추출 수율은 추출 조건에 따라 추출 전 시료 건조물의 중량에 대비 각 추출 방법에 의해 생성된 추출 용액을 회전진공농축기로 감압 농축하여 나온 추출물 무게에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{추출수율}(\%, w/w) = \frac{\text{추출물건조무게}}{\text{시료건조무게}} \times 100$$

GC/MS를 이용한 성분 분석

실험에 사용한 GC/MS system은 HP 190915-433 model (Paloalto, California, USA)이며 column은 HP-5MS (30 m ×

0.25 mm, 0.25 μ M)를 사용하였고 Detector로는 MS를 이용하였다. ESI mode에서 70 eV의 에너지로 이온화하였으며 TIC의 SCAN mode에서 검출이온 질량범위 35~350으로 설정하여 각 질량스펙트럼 중에서 가장 강도가 강한 main fragment ion을 중심으로 라이브러리를 검색하여 물질 확인 분석을 하였다. Injector temperature는 260°C, detector temperature는 280°C이며 carrier gas는 helium을 사용하여 flow rate를 1 ml/min으로 사용하였다. Oven temperature는 최초 50°C에서 5분 동안 유지한 후 4°C/min 속도로 200°C까지 상승시킨 후, 200°C에서 20°C/min 속도로 280°C까지 온도를 상승시킨 후 20분간 유지하였다. 계피 초임계 추출물, 박 추출물, 메탄올 추출물은 에탄올에 희석한 후 0.45 μ M membrane filter로 여과하여 분석 시료로 사용하였다. 라이브러리를 통해 검색된 main peak인 계피의 주요 성분인 cinamaldehyde는 50, 500, 1,000 ppm의 농도로 제조한 후 정량 분석에 이용하였다.

MTT assay

3T3-L1 지방전구세포의 시료 독성은 MTT assay로 분석하였다[5]. MTT 3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay는 미토콘드리아의 탈수소효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법이다. 세포를 5×10^4 cells/well으로 96 well plate에 분주하고 24시간 배양 후 배지를 교체하고 샘플 처리하여 24시간 후 MTT (Sigma Aldrich) 시약을 5 mg/ml 농도로 10 μ l를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 well에 100 μ l의 DMSO (Sigma Aldrich)를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader (Spectra MAX M2, Molecular Device)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

3T3-L1 지방전구세포의 배양 및 분화 유도 및 샘플처리

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 배양 및 분화 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM, Gibco RBL, Grand Island, NY, USA)에 10% calf serum (Gibco RBL), antibiotics를 첨가하여 5% CO₂, 37°C 인큐베이터에서 배양하여 세포가 confluent 상태가 되면 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 원심분리 하여 세포를 모아서 3×10^6 cells/well의 밀도로 6 well에 분주한 후 100% confluency 상태에서 48시간 방치 후 DMEM에 10% FBS (Gibco RBL)와 23 mg/ml 3-isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX, Sigma Aldrich Co, St Louis, Mo, USA), 5 mg/ml insulin (Sigma Aldrich), 1 mM dexamethazone (Sigma Aldrich)이 첨가된 배지(MDI)와 시료를 처리하여 48시간 동안 유도하고 배지를 제거하고 시료와 10%

FBS DMEM 배지에 5 mg/ml의 insulin이 첨가된 배지를 교체 해주었다. 10% FBS DMEM, insulin 배지는 2일 마다 지속적으로 시료와 같이 처리하였다.

Oil red O 염색법

시료의 지방세포 분화억제 활성을 검토하기 위하여 Oil red O 염색을 시행하였다. Oil red O 염색은 중성지방을 염색하는 방법으로 지방 세포 내 중성지방 축적 정도를 시각화할 수 있다. 3T3-L1 전구지방세포를 9일 동안 분화시킨 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 10% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시켰다. 다시 PBS로 세척 후, Oil red O 용액을 첨가하여 30분간 실온에서 염색하고, Oil red O 용액을 제거한 후 증류수로 세척하여 건조시킨 다음 위상차 현미경을 이용하여 관찰하고 흡광도 측정을 위하여 100% isopropyl alcohol로 염색된 지방구를 용출시켜 spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Real-time PCR을 이용한 mRNA 분석

지방세포 분화가 완료된 cell을 pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS, Gibco RBL)로 세척하여 배양된 세포에서 배지를 제거하고 PBS 10 ml로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 처리하고, 1.5 ml tube에 1 ml씩 담고 1-bromo-3-chloropropane (Sigma Aldrich)을 200 µl 첨가하고 vortex 하여 원심분리 (3,000 rpm, 15분, 4°C)하고, 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol (Sigma Aldrich)을 첨가하여 -20°C에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4°C)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% ethanol을 첨가하여 제거한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma

Aldrich) 처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다.

추출된 RNA를 cDNA로 합성 후 SYBER Green과 지방세포 분화 발현 인자인 PPAR-gamma, C/EBP-alpha, SREBP-1c를 확인하고, 지방 축적, 합성, 저장에 관련된 ACS, FAS, FATP1, FABP4, Perilipin의 primer를 이용하여 real-time PCR을 실시하였다. Primer 염기서열은 Table 1과 같다.

Real-time PCR은 초기변성 95°C 30초, 변성은 95°C 5초, annealing은 60°C 15초, 신장반응은 72°C 10초로 하여 40 cycle을 진행했다. 용해 곡선은 55°C로 시작하여 95°C를 종말점으로 0.5°C씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광 값을 검출하였다.

통계처리

모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검사는 SPSS™ version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고, 대조구인 분화 Control에 대한 시료 처리구의 통계적 유의성은 Turkey's HSD test [36]로 검증하였다. p<0.05 이상일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

계피 초임계 추출물의 지방세포 생존을 및 lipid droplet에 미치는 영향

각 well 당 5×10⁴ cells/well 의 밀도로 분주한 96 well을 24시간 배양 후 배지를 교체하고 SFC, SFM, ME를 최종농도 10, 50, 100 µg/ml로 24 시간 처리하였다. 그 결과 SFC 100

Table 1. The primer sequence used for real-time PCR

Target	Primer sequences	Accession No.
GAPDH	GTATGATCCACTCACGGCA	NM_002046.3
	GGTCTCGCTCCTGGAAGAGG	
PPARγ	GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG	NM_011146.3
	TGCAGCAGGTTGTCTTGGATG	
C/EBPα	TTGAAGCACAATCGATCCATCC	NM_007678.3
	GCACACTGCCATTGCACAAG	
SREBP1c	AGCCTGGCCATCTGTGAGAA	NM_011480.3
	CAGACTGGTACGGGCCACAA	
ACS1	GTCTTTGCCACATCCGACCTATC	NM_007981.3
	TTAGTGCAAACCCAGTTGTGCTTC	
FAS	AGCACTGCCTTCGGTTCAGTC	NM_007988.3
	AAGAGCTGTGGAGGCCACTTG	
FATP1	CAGACGGACGTGGCTGTGTA	NM_011977.3
	GCCGAGCATAGGATGCAAGAA	
FABP4	TGGGAACCTGGAAGCTTGCTC	NM_024406.2
	GAATTCACGCCCAGTTTGA	
Perilipin	GATGAGAGCCATGACCACCAGA	NM_175640.2
	TGTGTACCACACCACCCAGGA	

µg/ml 농도에서 대조구와 비교하였을 때 60%의 생존율로 독성을 나타냈으며, 나머지 농도에서는 모두 80% 이상의 생존율을 나타내었다(Fig 1). 따라서 시료 처리 농도를 50 µg/ml을 최고 농도로 설정하여 실험하였다.

지방세포의 Lipid droplet은 지방전구세포의 분화 및 adipogenesis 과정에 의하여 지방세포의 세포 내 triglyceride 축적으로 발생되는데, SFC, SFM, ME를 각각 50 µg/ml 농도로 처리하고 분화 완료 후 Oil Red O 염색을 하여 현미경으로 관찰한 결과 SFC가 다른 추출물에 비하여 높은 지방 축적 저해능을 보였다(Fig. 2).

계피 초임계 추출물의 adipogenic transcription factor의 mRNA 발현에 미치는 영향

전지방세포(preadipocyte)의 성장과정은 먼저 세포의 밀도가 증가하면 contact inhibition에 의해 성장이 멈추고 confluent state가 되어 growth arrest 상태에서 FBS, IBMX, dexamethazone, insulin을 처리하면 분화가 유도되고, 이후 FBS, insulin을 2일 간격으로 처리하면 성숙한 지방세포로 분화하게 된다. 분화가 유도되면 CREB 전사인자가 인산화되어 C/EBPα, PPAR γ가 연쇄적으로 발현되면서 분화가 진행된다 [6, 7, 41]. 따라서 C/EBPα, PPAR γ의 발현억제는 초기 지방세포분화를 차단하여 비만을 예방할 수 있다.

SFC, SFM, ME를 각각 50 µg/ml의 농도로 처리하고 C/EBPα, PPAR γ의 유전자 발현을 분석한 결과 SFC에서 가

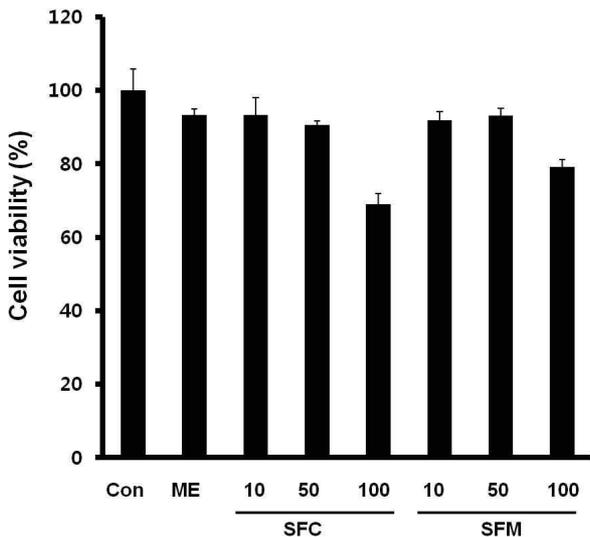


Fig. 1. Effect of ME, SFC, SFM on cell viability of in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were maintained with adipocyte-induction media for 9 days and treated with ME, SFC, SFM from *Cinnamomum verum* (10, 50, 100 µg/ml) every 2 days. Cell viability was calculated as a percentage of MTT metabolism in controls(Con, methanol). Results represent the mean±S.D. of three independent experiments.

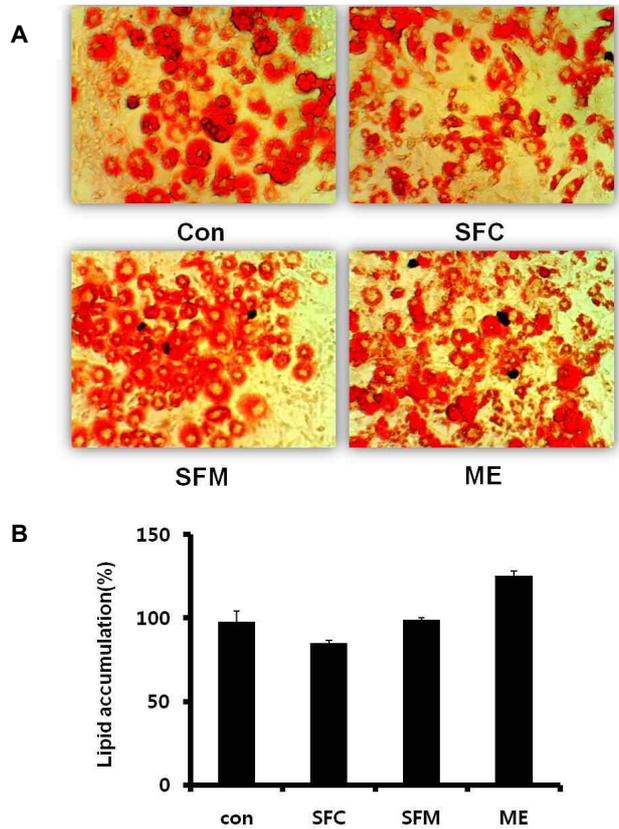


Fig. 2. Inhibitory effect of SFC, SFM, ME on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with SFC, SFM, ME. (50 µg/ml) for 9 days in adipocyte-induction media. Intracellular lipids were stained with Oil Red O (A). To determine the accumulation of lipid content, Oil Red O dye was dissolved in isopropanol and optical density detected at 510 nm (B). Results were presented as means±S.D. in triplicate.

장 높은 발현 저해를 보여 계피의 초임계 추출 오일이 지방세포의 초기 분화를 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 3). 박[26] 등의 연구에서 초임계 계피 오일과 박의 생리 활성 검색 결과, 초임계 오일은 항균활성이, 박 추출물은 항산화 활성이 우수한 것으로 나타나 오일과 박의 활성성분은 각각 다른 것으로 나타났다. 또한 김 등의 연구에서는 디텍을 순차분획 하였을 때 추출하여 이들 추출물의 폴리페놀 함량을 비교했을 때 폴리페놀 성분은 극성용매에 다량 함유되어 있음을 보고하였다[15]. 계피의 정유 성분 중 주된 성분은 cinnamaldehyde이며, 2형 당뇨병나 비만 억제 전사인자 저해에 효과가 있는 것으로 보고되었다[11, 12, 28].

SFC의 adipogenic transcription factor 및 관련 유전자들의 발현에 미치는 영향

Lipid droplet 및 초기지방세포 분화억제가 우수하였던 SFC를 10, 20, 50 µg/ml 농도로 처리하여adipogenic transcription

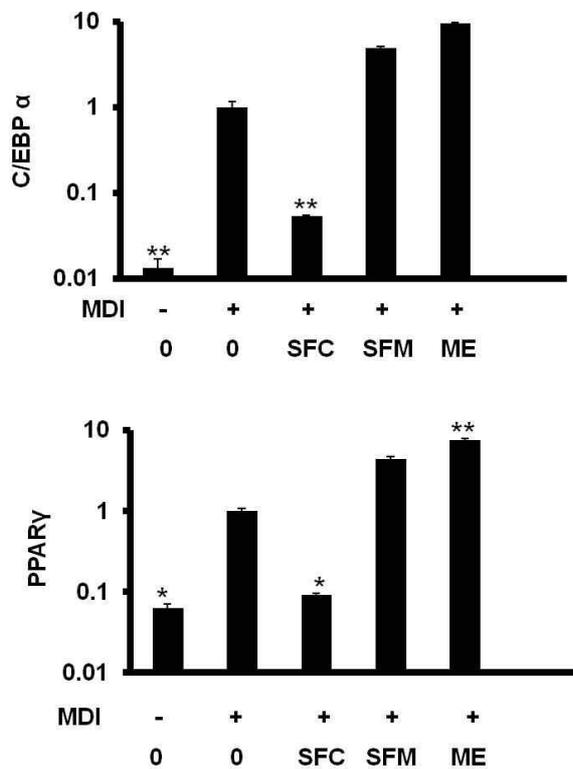


Fig. 3. Effect of SFC, SFM, ME on C/EBPα, PPARγ mRNA expression during the differentiation of 3T3-L1 adipocyte. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with SFC, SFM, ME 50 μg/ml for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9 adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions of PPARγ, C/EBPα were determined by real-time PCR analysis. Results were presented as means±S.D. in triplicate. **p*<0.05, ***p*<0.01 vs control.

factor 및 관련 유전자들에 미치는 영향을 확인하기 위해 real-time PCR을 이용하여 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 분화를 유도한 대조군에서 C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c의 발현이 증가되었으나, SFC를 농도별로 처리한 결과 10, 20, 50 μg/ml의 농도 모두에서 그 발현이 유의적으로 감소됨을 확인하였다. 또한 이들 전사인자들의 하위 인자로 지방합성, 이동, 저장에 관여하는 fatty acid synthase (FAS), acyl-CoA synthase (ACS1), fatty acid binding protein 4 (FABP4), fatty acid transport protein 1 (FATP1), 및 Perilipin의 mRNA 발현에서도 분화유도에 따라 각 유전자의 발현이 현저하게 증가하였으나, SFC처리에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 5). SFC는 지방세포 분화에 관여하는 C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c 발현을 억제하여 지방세포의 분화를 억제하였으며, 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)을 감소시키고[23], 지방세포의 감소에 의하여 지방합성에 관여하는 FAS와 ACS1을 효과적으로 억제하였으며, 지방수송에 관여하는 FABP4, FATP1, 지질축적에 관여하는 perilipin의 발현을 감소시켜

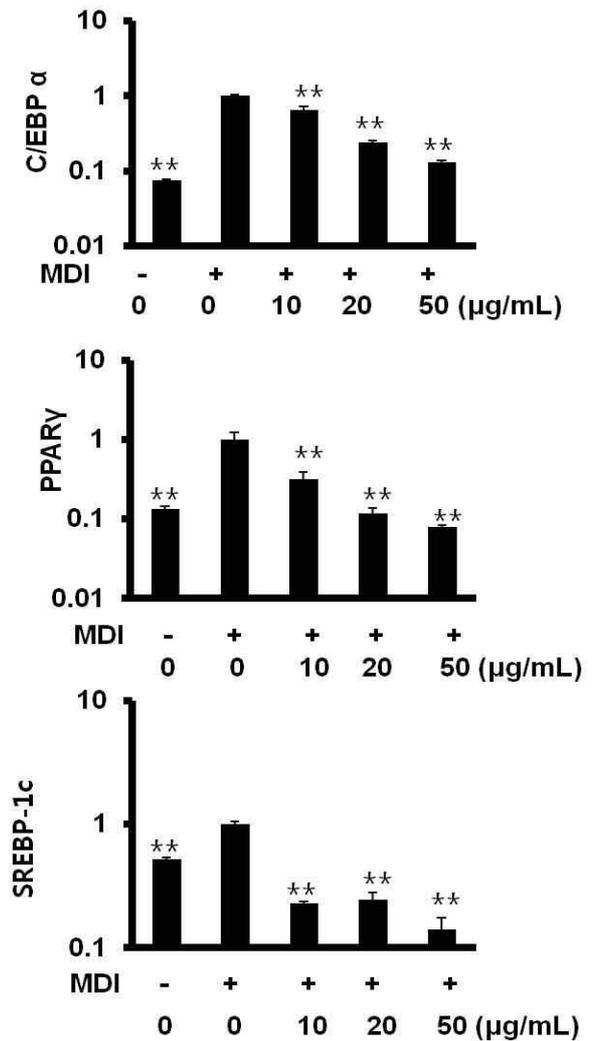


Fig. 4. Effect of SFC on adipogenic transcription factor. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with SFC 10, 20, 50 μg/ml for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9 adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions of C/EBPα, PPARγ and SREBP-1c were determined by real-time PCR analysis. Results were presented as means±S.D. in triplicate. **p*<0.05, ***p*<0.01 vs control.

lipid droplet 및 triglyceride의 생성을 감소시킨 것으로 생각된다.

계피의 추출방법에 따른 수율과 cinnamaldehyde 함량

지방세포 분화에 관여하는 전사인자들의 발현억제와 cinnamaldehyde 함량의 상관관계를 알아보고자 각 조건별 계피 추출물을 GC/MS를 이용하여 정유성분의 화학구조를 규명한 결과 (E)-cinnamaldehyde의 peak을 발견하였다. 각 추출물의 수율과 cinnamaldehyde의 함량을 구한결과는 Table 2에 나타내었다. 그 결과 SFC, 80% ME, SFM 순으로 cinnamaldehyde 함량이 높음을 알 수 있었으며, 계피의 정유성분을 초임계법

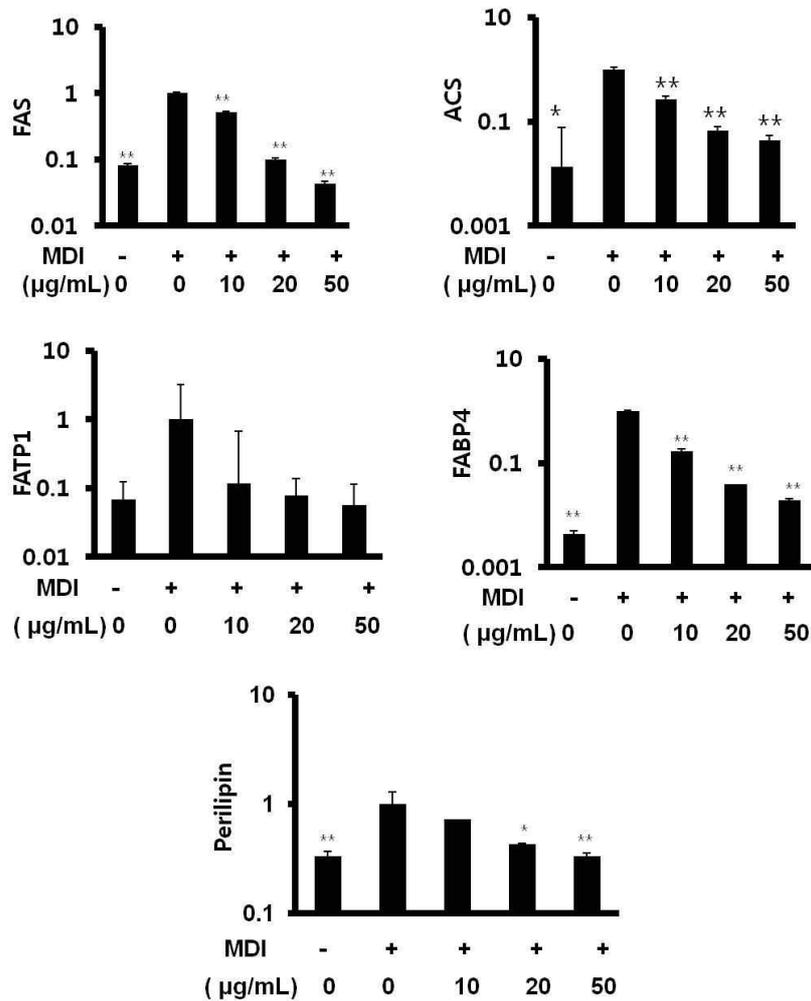


Fig. 5. SFC suppression of proteins regulating synthesis and transport of fatty acids, Lipid accumulated mRNA levels. Differentiating 3T3-L1 cells were treated with every 2 days with SFC 10, 20, 50 µg/ml for 9 days in adipocyte-induction media. At day 9 adipocytes RNA was isolated and mRNA expressions of ACS, FAS, FATP1, FABP4 and Perilipin were determined by real-time PCR analysis. Results were presented as means±S.D. in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control.

으로 추출했을 경우 기존의 용매추출에 비해 cinnamaldehyde의 함량이 20배 이상 많이 함유되어 있어 정유 성분의 추출에 초임계 추출법이 매우 효율적임을 알 수 있었다. 계피와 같은 휘발성이 강한 천연물에는 정유성분에 유용성분이 많이 함유되어 있기 때문에 고온, 장시간이 소요되는 용매 추출법 보다는 초임계 추출법이 더 효율적이다[3, 24, 25, 33]. 김 등의 연구에서도 고추냉이에서 allyl isothiocyanate (AITC)는 유기용매 추출보다 초임계 추출에서 더 많은 함량을 보였다[18]. 김 등의 연구에서 오레가노, 육계, 편백 및 황금의 초임계 추출물과 용매 추출물의 항균활성을 비교한 결과, 초임계 추출물의 항균활성이 더욱 우수하였다[17].

따라서 지방세포의 분화억제에 활성을 보이는 계피의 정유 성분은 주요성분인 cinnamaldehyde일 것으로 예상된다. 이전의 연구에서 cinnamaldehyde는 2형 당뇨 개선이나, 비만억제

Table 2. Cinnamaldehyde (CA) contents and extraction yield in 80% MeOH (ME) extracts and SFC, SFM from *Cinnamomum verum* according to different extraction conditions

Condition	Yield (%)	CA content (mg/100 g)
ME ^a	19.93	595.52
SFC ^b	4.73	35220.56
SFM ^c	8.63	266.95

^aME: 80 % Methanol Extract of *Cinnamomum verum*

^bSFC: Supercritical Fluid Extracts in 300 bar, 35°C, 120 min

^cSFM: Methanol extracts of SFC oil marc

에 효과적이라 보고된 바 있어 본 연구와도 일치하는 결과이다[11, 12, 14, 28]. 천연물의 추출은 성분에 따라 그 추출방법을 달리 하는 것이 성분을 효율적으로 이용할 수 있을 것이라

생각되고, cinnamaldehyde와 계피 초임계 오일의 adipogenic transcription factor 및 관련 유전자들의 비교 실험을 통해 cinnamaldehyde가 지방세포 분화억제에 어떠한 영향을 미치는지와 cinnamaldehyde 외에 지방세포 분화억제에 관련된 계피의 기타 정유 성분에 대한 분리 및 메커니즘에 대한 규명이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 교육과학기술부 및 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업과 교육과학기술부 및 대구경북과학기술원의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다(12-BD-0401).

References

- Albu, J., Allison, D., Boozer, C. N., Heymsfield, S., Kissileff, H., Kretser, A., Krumhar, K., Leibel, R., Nonas, C., Pi-Sunyer, X., Vanlallie, T. and Wedral, E. 1997. Obesity solutions: report of a meeting. *Nutr Rev* **55**, 150-156.
- Apfelbaum, M., Vague, P., Ziegler, O., Ilanotin, O., Thomas, F. and Leu-tenegger, E. 1999. Long-term maintenance of weight loss after a very low calorie diet: Efficacy and tolerability of sibutramine. *Am J Med* **106**, 179-184.
- Barth, M. M., Zhou, C., Kute, M. K. and Rosenthal, G. A. 1995. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids (*Daucus carota* L.) from carrot tissue. *J Agric Food Chem* **43**, 2876-2878.
- Carmen, S. 2000. Processing technologies: An alternative for cactus pear (*Opuntia spp*) fruits and cladodes. *J Arid Environ* **46**, 209-225.
- Cole, S. P. 1986. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol* **17**, 259-263.
- Farmer, S. R. 2006. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* **4**, 263-273.
- Green, H. and Kehinde, O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* **1**, 113-116.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78**, 783-809.
- Grundy, S. M. 1998. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr* **67**, 563-572.
- Hansen, D. L., Toubro, S., Stock, M. J., Macdonald, I. A. and Astrup, A. 1998. Thermogenic effects of sibutramine in humans. *Am J Clin Nutr* **68**, 1180-1186.
- Huang, B., Yuan, H. D., Kim, D. Y., Quan, H. Y. and Chung, S. H. 2011. Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways. *J Agric Food Chem* **59**, 3666-3673.
- Kannappan, S., Jayaraman, T., Rajasekar, P., Ravichandran, M. K. and Anuradha, C. V. 2006. Cinnamon bark extract improves glucose metabolism and lipid profile in the fructose-fed rat. *Singapore Med J* **47**, 858-863.
- Kaul, P. N., Bhattacharya, A. K., Rao, B. R., Syamasundar, K. V. and Ramesh, S. 1987. Volatile constituents of essential oils isolated from different parts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *J Sci Food Agric* **83**, 53-55.
- Khan, A., Bryden, N. A., Polansky, M. M. and Anderson, R. A. 1990. Insulin potentiating factor and chromium content of selected foods and spices. *Biol Trace Elem Res* **24**, 183-188.
- Kim, N. M., Sung, H. S. and Woo, W. J. 1993. Effect of solvents and some extraction condition on antioxidant activity in Cinnamon extracts. *Korean J Food Sci Technol* **25**, 204-209.
- Kim, K. I., Han, C. K., Seong, K. S., Lee, O. H., Park, J. M. and Lee, B. Y. 2003. Effect of whole powder and extracts of *Gastrodiae Rhizoma* serum lipids and body fat in rats fed high-fat diet. *Korean J Food Sci Technol* **35**, 720-725.
- Kim, W. J., Cho, J. Y., Choi, C. S., Yoon, G. S., Lee, W. K. and Ryu, Y. W. 2008. Antimicrobial Activity of Extracted by Supercritical Fluid from *Origanum vulgare*, *Cinnamomum cassia*, *Chamaecyparis obtusa* and *Scutellariae baicalensis*. *Korean J Biotechnol Bioeng* **22**, 147-152.
- Kim, S. J., Lee, M. K., Back, S. S. and Chun, B. S. 2007. Extraction and identification of volatile isothiocyanates from Wasabi using supercritical carbon dioxide. *Korean J Biotechnol Bioeng* **22**, 174-178.
- Lee, K. S., Kim, M. G. and Lee, N. Y. 2004. Antimicrobial effect of the extracts of *Cactus Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Nutr* **33**, 1268-1272.
- Lee, Y. A. and Kim, M. H. 2008. The effect of sea tangle extract on serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci* **18**, 249-254.
- Lew, E. A. 1985. Mortality and weight: Insured lives and the american cancer society studies. *Ann Intern Med* **103**, 1024-1029.
- MacDougald, O. A. and Lane, M. D. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* **64**, 345-373.
- Otto, T. C. and Lane, M. D. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 229-242.
- Park, M. K., Lee, Y. L. and Kang, E. S. 2005. Hepatoprotective effect of chounnyuncho extract in rats treated carbon tetrachloride. *Korean J Food Sci Technol* **37**, 822-826.
- Park, S. M., Ahn, I. S., Hong, S. M., Kim, D. S., Kwon, D. Y. and Yang, H. J. 2010. The effects of the supplementation of *Opuntia humifusa* water extracts and methyl sulfonyl methane on the laying productivity, egg quality and sensory characteristics. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **39**, 294-300.
- Park, S. J., Yu, M. H., Kim, J. E., Lee, S. P. and Lee, I. S. 2012. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of supercritical fluid extracts and marc extracts from *Cinnamomum verum*. *J Life Sci* **22**, 373-379.
- Peter, G. K. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635-643.

28. Plaisier, C., Cok, A., Scott, J., Opejin, A., Bushhouse, K. T., Salie, M. J. and Louters, L. L. 2011. Effects of cinnamaldehyde on the glucose transport activity of GLUT1. *Biochimie* **93**, 339-344.
29. Rolls, B. J., Shide, D. J., Thorwart, M. L., and Ulbrecht, J. S. 1998. Sibutraminereduces food intake in nondieting women with obesity. *Obes Res* **6**, 1-11.
30. Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 145-171.
31. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**, 1293-1307.
32. Scott, M. G. 2004. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2595-2600.
33. Shim, J. H., Kim, M. R. and Kim, M. R. 2001. A Comparative Study on the Solvent Extraction and Supercritical Fluid Extration Method of β -Ecdysone in *Achyranthis radix*. *J Korean Soc Appl Chem Biolotechnol* **44**, 197-201.
34. Spiegelman, B. M. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543.
35. Spiegelman, B. M. and Flier, J. S. 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* **87**, 377-389.
36. Sreel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1990. *Principles and procedures of satistics*. McGraw Hill, New York, USA.
37. Wellman, N. S. 2002. Causes and consequences of adult obesity: health, social and economic impacts in the united States. *Asia Pac J Clin Nutr* **11**, S705-S709.
38. Wyatt, S. B., Winters, K. P. and Dubbert, P. M. 2006. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am J Med Sci* **331**, 166-174.
39. Yoon, J. A. and Son, Y. S. 2009. Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes B (OCB) on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Nutr* **22**, 48-56.
40. Wijesekera, R. O. B., Jayewardene, A. L. and Rajapakse, L. S. 1974. Volatile constituents of leaf, stem and root oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *J Sci Food Agric* **25**, 1211-1220.
41. Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C. and Lane, M. D. 2000. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* **279**, 4471-4478.

초록 : 초임계 추출 계피오일의 3T3-L1 지방전구세포의 분화 전사인자 억제에 의한 지방대사 조절

박성진¹ · 이삼빈^{1,2} · 이인선¹ · 유미희^{1*}

(¹계명대학교 식품가공학 전공, ²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR)센터)

본 연구에서는 초임계를 이용한 계피 오일 추출물(SFC)과 오일 추출 후 남은 부산물인 박(SFM), 그리고 80% methanol (ME) 계피추출물을 이용하여 항비만 효과를 비교하고 어떤 계피의 어떤 성질의 성분이 비만에 더 효과적인지 알아보았다. 3T3-L1 preadipocyte의 성숙한 지방세포로 분화시키기 위해 iso-butylmethylaniline (IBMX), dexamethasone, insulin을 SFC, SFM, ME를 처리하고 Real time PCR을 이용하여 전사인자 발현을 확인하였다. 그 결과 SFC에서 mRNA 수준에서 peroxisome-proliferators-activated-receptor- γ (PPAR γ), CCAAT enhancer-binding-protein α (C/EBP α)의 저해능이 세 가지 조건 중에서 가장 높았으며, 또한 SFC는 peroxisome-proliferators-activated-receptor- γ (PPAR γ), CCAAT enhancer-binding-protein α (C/EBP α) sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c)와 acyl-CoA synthetase-1 (ASC1), fatty acid synthesis (FAS), fatty acid transport-1 (FATP1), fatty acid binding protein-4 (FABP4) 그리고 perilipin의 전사인자도 농도유의적으로 감소시켰다.