

제주산 한라봉 과피 추출물의 지방세포에서의 항비만 효과

임희진¹ · 서지은¹ · 장윤희¹ · 한복경² · 정중기² · 박수범² · 최혁준² · 황진아¹

¹명지대학교 식품영양학과

²(주)BKbio Co. Ltd.

Anti-Obesity Effects of Jeju Hallabong Tangor (*Citrus kiyomi* × *ponkan*) Peel Extracts in 3T3-L1 Adipocytes

Heejin Lim¹, Jieun Seo¹, Yun-Hee Chang¹, Bok-Kyung Han², Jung-Ky Jeong²,
Su-Beom Park², Hyuk-Joon Choi², and Jinah Hwang¹

¹Department of Food and Nutrition, College of Natural Sciences, Myongji University

²BKbio Co. Ltd. Seongnam, Gyeonggi

ABSTRACT Jeju Hallabong Tangor (*Citrus kiyomi* × *ponkan*) is a *Citrus* species with a variety of physiological properties such as anti-oxidant, anti-inflammation, anti-cancer, and anti-obesity. We investigated the anti-obesity effects of Hallabong Tangor peel extracts before (HLB) and after (HLB-C) bioconversion with cytolase based on modulation of adipocyte differentiation and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. Treatment with cytolase decreased flavanone rutinoside forms (narirutin and hesperidin) and increased flavanone aglycone forms (naringenin and hesperetin). During adipocyte differentiation, 3T3-L1 cells were treated with 0.5 mg/mL of Sinetrol (a positive control), HLB or HLB-C. Adipocyte differentiation was inhibited in both citrus groups, but not in control and Sinetrol groups. HLB and HLB-C tended to reduce insulin-induced mRNA levels of CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c). Compared to the control and Sinetrol groups, HLB and HLB-C markedly suppressed insulin-induced protein expression of C/EBP α and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). The HLB and Sinetrol groups, but not HLB-C group, significantly increased adipolytic activity with higher release of free glycerol compared to the control group in differentiated 3T3-L1 adipocytes. These results suggest that bioconversion of Hallabong Tangor peel extracts with cytolase increases aglycone flavonoids. Irrespective of bioconversion, both Hallabong Tangor peel extracts exert anti-obesity effects that may contribute to prevention of obesity through inhibition of adipocyte differentiation or induction of adipolytic activity.

Key words: Hallabong Tangor, *Citrus kiyomi* × *ponkan*, bioconversion, anti-obesity, 3T3-L1 adipocytes

서 론

비만은 전 세계적으로 심각한 건강 문제이며 대사증후군의 한 지표로서 제2형 당뇨병, 고혈압, 심혈관계 질환, 암 등과 밀접한 관련이 있다(1,2). 국민건강영양조사에 따르면 우리나라의 비만 유병률은 2001년 전체 평균 29.2%였던 것에 비해 2012년 32.8%로 점점 증가하는 추세를 나타내고 있으므로 이의 조절 기전에 대한 연구가 필요하다. 지방세포는 우리 몸에서 에너지를 저장하며 지방조직과 근육에서 신호 전달 과정을 조절하는 다양한 사이토카인들을 분비한다(3). 지방세포의 분화는 세포의 형태, 호르몬 민감성, 유전자 발현의 변화와 관련이 있다(4,5). 지방분화 초기에는 유도제의

일종인 cAMP와 dexamethasone에 의해서 CCAAT/enhancer-binding proteins β (C/EBP β)와 C/EBP δ 의 발현량이 일시적으로 증가하게 된다. 이들 전사인자의 발현은 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 전사인자의 발현을 증가시키며, 이것은 C/EBP α 의 발현도 증가시켜 분화과정 후반기에 지방세포 분화 관련 유전자들의 발현을 촉진시킨다(6). PPAR γ 의 표적유전자는 지방조직 특이유전자로 밝혀진 adipocyte protein 2(ap2), leptin 등이 있다(6). Sterol regulatory element binding protein 1c(SREBP1c)는 지방산 대사와 지질 생합성에 주로 관여하며 지방세포의 분화 초기 단계부터 발현이 유도되어 분화를 촉진시키며 지방산 대사 관련 유전자를 증가시킨다(6).

감귤류의 과피는 아시아에서 기관지와 천식 환자에게 사용되어 왔으며, 감귤류 플라보노이드는 내당능을 향상시키고 혈당의 지질 수치와 비만을 감소시킨다고 보고되었다(7,8). 감귤류에 존재하는 플라보노이드는 분자적인 구조에

Received 8 July 2014; Accepted 22 September 2014

Corresponding author: Jinah Hwang, Department of Food and Nutrition, College of Natural Sciences, Myongji University, Yongin, Gyeonggi 449-728, Korea
E-mail: jhwang@mju.ac.kr, Phone: +82-31-330-6205

따라 플라본(flavones), 플라바논(flavanones), 플라보놀(flavonols), 이소플라본(isoflavones), 안토시아니딘(anthocyanidins), 플라바놀(flavanols) 등 6개 그룹으로 분류할 수 있다(9). Naringin, narirutin, hesperidin 등과 같은 플라바논 배당체(flavanones glycone)와 naringenin, hesperetin과 같은 플라바논 비배당체(flavanones aglycone)가 감귤류 플라보노이드의 주된 형태이며, 이들은 과육보다 과피와 씨에 더 풍부하게 함유되어 있다(10). Naringenin, hesperetin과 같은 비배당체는 배당체 형태보다 좀 더 효과적으로 우리 몸에서 흡수되기 때문에 플라바논의 rutinoside 형태의 물질이 가수분해과정을 거쳐 비배당체의 형태로 전환되면 흡수가 촉진되어 혈장, 담즙, 소변 등에 더 높은 농도로 존재한다(10,11). Naringin과 narirutin은 α -D-rhamnosidase와 β -D-glucosidase에 의해서 naringenin으로 전환되고, hesperidin은 β -D-glucosidase나 α -D-rhamnosidase에 의해서 hesperetin으로 전환된다. Cytolase PLC5는 *Aspergillus niger*의 배양물에서 얻어진 효소 제제로서 pectinases 외에 cellulase, hemicellulase, β -glucosidase 등의 다양한 활성을 가지고 있다. 상업적으로는 산도가 높은 과실류 가공 시 침전 제거, 수율 및 여과력 향상에 주로 사용된다. 또한 당분해효소로서 배당체 형태의 플라보노이드를 비배당체 형태로 전환시켜 추출 효율을 높일 수 있다(12). 인삼추출물을 β -glucosidase와 cytolase로 효소 반응시키면 ginsenosides의 형태로 전환되었고 대식세포에서 염증을 억제시키고 결장선암 세포에서 항암효과를 나타내었다(13,14).

감귤류의 한 종류인 한라봉은 그에 대한 선행연구가 저장 연구를 중심으로 이루어져 있으며 생리활성에 관한 연구는 2010년 농촌진흥청의 항암, 항산화 및 항고혈압 작용에 관한 효능 이외에는 거의 미흡하다. 또한 감귤류 플라보노이드에 대한 항비만 효능은 많은 연구가 이루어져 있으나 과피 추출물의 비배당체로의 효소 반응 처리에 관한 연구는 이루어지지 않았다. 이에 따라 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에서 한라봉 과피 추출물과 cytolase를 이용하여 효소 처리한 한라봉 과피 추출물의 지방세포 분화 억제와 중성지방의 분해 촉진을 통한 항비만 효과를 비교하여 연구하였다.

재료 및 방법

한라봉 과피 추출물의 조제 및 분석

한라봉 과피 추출물(Hallabong Tangor, *Citrus kiyomi*×*ponkan*; HLB)과 cytolase로 효소 처리하여 가수분해한 한라봉 과피 추출물(HLB-C)은 (주)BKbio(Seongnam, Korea)로부터 제공받았다. 한라봉 과피는 제주연구소에서 공급받아 과피 분말 100 g을 0.5%의 cytolase PCL5(DSM Food Specialties, Heerlen, The Netherlands)를 첨가하여 물을 용매로 pH 4.0, 60°C에서 14시간 동안 효소 처리 후 여과시켜 잔사를 제거하였다. 여기에 4배 부피(v/v)의

80% ethanol을 가하여 60°C에서 8시간 동안 교반추출 후 여과시켜 분리된 상층액만 취해 농축한 다음 동결건조 하여 분말화하였다. HLB와 HLB-C의 플라보노이드 구성성분의 분석을 위해 고속 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC; YL9100HPLC, Younglin, Anyang, Korea)로 Eclipse Plux C18 column(4.6 mm I.D. ×250 mm; Agilent Co., Santa Clara, CA, USA)을 이용하였고, 시료 주입량은 10 μ L, column oven 온도는 35°C, 유속은 1 mL/min, 검출 파장은 280 nm에서 60분 동안 분석하였다. 이동상은 0.5%(v/v) acetic acid/acetonitrile과 0.5%(v/v) acetic acid/d-H₂O를 gradient 조건에 따라 사용하였다. 시료의 플라보노이드 함량을 정량 분석하기 위해서 internal controls로 naringin, narirutin, hesperidin, naringenin, hesperetin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 비교 분석하였으며, 이를 위해서 YLClarity chromatography station system을 이용하였다.

지방전구세포의 배양과 분화

3T3-L1 지방전구세포(ATCC, Manassas, VA, USA)는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)에 10% calf serum(Gibco)과 1% penicillin-streptomycin(PS, Lonza, Allendale, NJ, USA)을 혼합하여 배양시켰다. 지방세포 분화의 시작은 10 μ L/mL insulin(Gibco), 1 μ M dexamethasone(Sigma Chemical Co.), 0.5 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine(Sigma Chemical Co.)을 배지에 혼합하여 이틀간 배양시킨다(day 0~day 2). 그 후부터 이틀 간격으로 DMEM과 10% fetal bovine serum(Gibco) 배지를 교환하여 열흘간 분화를 시킨다(day 3~day 10). HLB와 HLB-C는 분화 시작부터 열흘간 배지와 함께 처리하였으며 이틀 주기로 교환하여 처리하였다. Sinetrol(Fytexia, Vendres, France)은 양성대조군으로 사용하였으며 시료와 동일하게 처리하였다(15).

세포생존율 측정

24-well plate에 3T3-L1 지방전구세포를 분주하고 0~2.0 mg/mL 농도의 Sinetrol, HLB 또는 HLB-C를 24시간 동안 처리한다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 5 mg/mL 농도로 4시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 시약을 제거하고 isopropanol을 첨가하여 분광광도계(Gen5.2, Biotek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지방세포 염색

지방전구세포를 6-well plate에서 0.5 mg/mL의 농도의 Sinetrol, HLB 또는 HLB-C를 분화배지에 첨가하여 함께 분화시켰다. 분화가 끝난 후 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻어주고 10% formalin(Merck, Darm-

stadt, Germany)으로 1시간 동안 고정시킨다. 그리고 60% Oil red O(Sigma Chemical Co.)로 30분간 염색시킨 후 현미경을 이용하여 촬영하였으며, 염색된 시약을 isopropanol로 녹여 분광광도계(Biotek)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용한 mRNA 측정

지방세포의 mRNA는 Trizol reagent(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 추출하였고 reverse transcription master premix(ELPIS, Daejeon, Korea)로 역전사를 진행시켜 cDNA를 합성시켰다. 유전자 증폭을 위한 primer는 C/EBP α forward 5'-TTACAACAGGCCAGG-TTTCC-3', backward 5'-AACTCCAGTCCCTCTGGG-AT-3', SREBP1c forward 5'-TGTTGGCATCCTGCTA-TCTG-3', backward 5'-CTCACCTCTGGAAGACC-AC-3', GAPDH forward 5'-ACCACAGTCCATGCCAT-CAC-3', backward 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'로 제작하여 실험하였다.

Western blotting를 이용한 단백질 검출

3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 완전히 분화시킨 후 세포를 분리하여 whole cell lysates를 얻었다. 이것을 10% SDS-PAGE에 전기영동을 통해 단백질을 분리하고 polyvinylidene difluoride membrane(Roche, Seoul, Korea)으로 transfer 과정을 거친 후에 C/EBP α , PPAR γ , β -tubulin(Santa Cruz, Texas, USA)의 항체를 붙이고, 그 후 화학발광반응법을 이용하여 가시화시켰다.

Free glycerol 측정

분화된 지방세포에 0.5 mg/mL 농도의 Sinetrol, HLB 또는 HLB-C를 24시간 동안 처리한 후 함께 배양했던 배지를 실험에 이용하였다. 96-well plate에 glycerol 표준물질과 배지를 넣고 free glycerol assay reagent(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)를 섞어 15분간 반응시킨 후에 분광광도계(Biotek)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

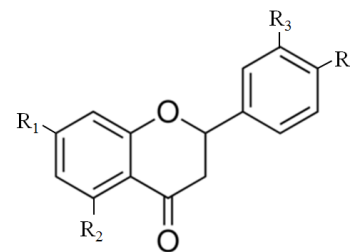
각 실험은 3회 이상 반복실험을 실시하였고 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 또한 모든 실험결과는 IBM SPSS (Ver. 20.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 Student's t-test와 one-way ANOVA로 분석하였다. 통계적 유의성은 Scheffe's와 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였고 5% 이내에서 통계적 유의성을 제시하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

한라봉 과피 추출물의 효소 처리에 의한 플라보노이드 형태 전환

한라봉 과피 추출물에 있는 플라보노이드의 형태가 cytolase를 통해 효과적으로 전환되었는지를 확인하기 위해 배당체(glycone) 형태의 naringin, naringin, hesperidin과 비배당체(aglycone) 형태의 naringenin과 hesperetin을 HPLC로 분석하였다(Table 1). HLB와 HLB-C의 총 플라보노이드 양은 각각 24.66%, 23.08%로 비슷한 수치를 나타내 차이가 거의 없는 반면 glycone과 aglycone 종류의 수치가 다르게 나타남을 확인하였다. Glycone 중 naringin과 naringenin의 수치가 HLB에서 HLB-C로 전환시켰을 때 감소하였고 aglycone 형태인 naringenin은 0.01%에서 8.82%로 증가하였다. 또 glycone 형태의 hesperidin은 효소 처리 전에는 21.42%였으나 처리 후에 1.72%로 감소하였고 대신 aglycone인 hesperetin이 효소 처리 전에는 감지되지 않다가 처리 후에 12.38%로 증가하였다(Table 2). 이것은 cytolase를 이용한 효소 처리로 naringin과 naringenin이 naringenin으로, 또는 hesperidin이 hesperetin으로 변환된 것으로 사료된다(Table 1, 2). Aglycone 형태는 glycone 형

Table 1. Chemical structures of citrus flavanone



Flavanone	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Glycone				
Naringin	Neohesperidose	OH	H	OH
Naringenin	Rutinose	OH	H	OH
Hesperidin	Rutinose	OH	OH	OCH ₃
Aglycone				
Naringenin	OH	OH	H	OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃

Table 2. HPLC chromatograms of Hallabong Tangor peel extracts (unit: %)

		HLB ¹⁾	HLB-C
Glycone	Naringin	0.01	0.00
	Naringenin	3.20	0.16
	Hesperidin	21.42	1.72
Aglycone	Naringenin	0.01	8.82
	Hesperetin	0.00	12.38
Total		24.66	23.08

¹⁾HLB: Hallabong Tangor peel extract, HLB-C: Hallabong Tangor peel extract after bioconversion with cytolase.

태보다 더 효과적으로 흡수되어 혈청과 소변, 담즙에서 더 높은 농도의 aglycone 류가 존재한다(10,11). Naringin은 HLB에서 거의 검출되지 않았는데 이것은 naringin이 한라봉의 주요 플라보노이드가 아님을 확인할 수 있었다. Rutinose가 붙어 있는 narirutin과 hesperidin은 쓴맛이 거의 없으나 neohesperidose가 붙어 있는 naringin은 쓴맛이 난다(10). 양성대조군으로 사용한 Sinetrol은 감귤류의 폴리페놀 중 플라보노이드의 naringin, narirutin, hesperidin, neohesperidin으로 주로 구성되어 있다(15). 그중 naringin의 양이 가장 많으며 이것은 Sinetrol이 강한 쓴맛을 내는 것과 연관이 있어 알약의 형태를 제외하고는 산업적으로 이용하는 데 많은 제약이 있다. 반면 HBL과 HBL-C는 naringin이 거의 없었으며 관능검사에서도 유의적이지는 않지만 쓴맛이 감소하였다(data not shown).

한라봉 과피 추출물이 세포생존율에 미치는 영향

추출한 시료의 독성을 평가하고 적정 농도를 결정하기 위해 HLB와 HLB-C를 0~2.0 mg/mL의 농도로 처리하였으며 양성 대조군으로 프랑스에서 생산, 판매되고 있는 다이어트 보조식품인 Sinetrol을 사용하였다(15). 24시간 동안 시료를 처리한 결과 세 군 모두 0.5 mg/mL 농도까지는 세포생존율에 유의적인 변화가 없었으나 HLB군과 HLB-C군의 경우 1.0 mg/mL 이상의 농도에서 세포생존율이 감소하였다(Fig. 1).

한라봉 과피 추출물이 지방세포 분화에 미치는 영향

감귤류 플라보노이드의 항비만 효과는 여러 연구를 통해 보고되어 있다. 감귤류 플라보노이드 중 hesperidin과 naringenin, nobiletin은 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제하였다(16). 또 비만 쥐에게 제주자생진귤(*Citrus unki*) 과피 추출물을 70일 동안 먹였을 때 β -oxidation의

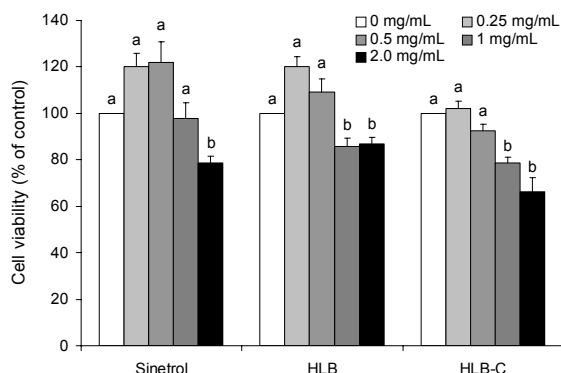


Fig. 1. Effects of HLB and HLB-C on cell viability. 3T3-L1 cells were treated with different concentrations (0~2.0 mg/mL) of Sinetrol, HLB or HLB-C for 24 hr. Sinetrol: a positive control. Cell viability was measured by MTT assay. The viability of untreated control cells was defined as 100%. Each bar represents the mean±SEM (n=3). Different letters (a,b) above the bars mean significant difference according to ANOVA, Scheffe's test ($P < 0.05$).

증가와 지방분화 억제를 통해 항비만 효과를 나타내었다(17). 감귤류 종인 한라봉 과피 추출물이 지방세포 분화에 미치는 영향을 분석하기 위해 0.5 mg/mL 농도의 Sinetrol, HLB 또는 HLB-C를 열흘간 처리하였고 세포에 축적된 지질을 Oil red O 염색을 통해 확인하였다. 미처리 대조군은 insulin에 의해 지방세포가 분화되어 지방전구세포에 비해 3배로 중성지방이 증가하였다. 양성 대조군인 Sinetrol은 0.5 mg/mL에서 거의 지방분화를 억제하지 못한 반면 HLB와 HLB-C 처리군은 각각 24%, 21%로 미처리 대조군에 비해 5배 정도 지방세포 분화가 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). HLB와 HLB-C는 같은 농도에서 Sinetrol보다는 훨씬 효과적으로 동일하게 분화를 억제시켜 효소 처리 전후의 차이는 없었다. *Citrus aurantium* flavonoids 경우도 지방전구세포에서 지질 축적을 억제한다고 보고되었고(5), 이는 한라봉 과피 추출물의 주요 플라보노이드인 naringenin과 hesperidin, hesperetin의 작용으로 인한 것으로 사료된다(17). 양성대조군으로 사용한 Sinetrol은 프랑스의 Fytexia에서 개발되어 시판되고 있는 지방분해 효과의 식이 보충제로 감귤류와 과라나로부터 만들어지며, phosphodiesterase(PDE) 억제를 통해 cAMP를 증가시키고 hormone sensitive lipase(HSL)를 자극하기 때문에 지질 대사에서 특히 지방분해 효과가 있다고 보고되었다(15).

한라봉 과피 추출물이 지방세포 분화 전사인자의 발현에 미치는 영향

앞서 HLB와 HLB-C가 지방세포의 분화를 억제한다는 결과를 토대로 이러한 과정에 영향을 미치는 여러 인자들의 분자생화학적 기전을 규명하기 위해 C/EBP α , SREBP1c의

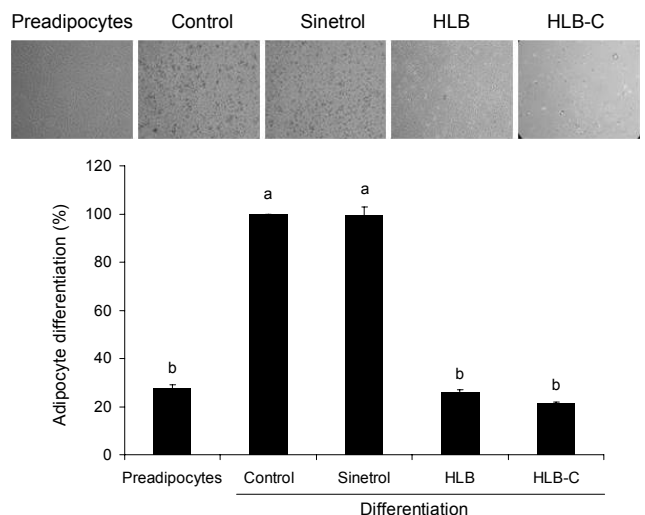


Fig. 2. Effects of HLB and HLB-C on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with 0.5 mg/mL of Sinetrol, HLB or HLB-C in differentiation medium during adipogenesis from 0 to 10 days. Sinetrol, a positive control. Each bar represents the mean±SEM (n=3). Different letters (a,b) above the bars mean significant difference according to ANOVA, Scheffe's test ($P < 0.05$).

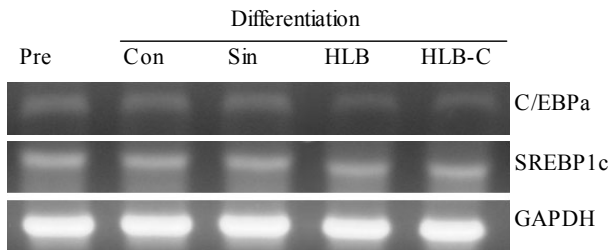


Fig. 3. Effects of HLB and HLB-C on adipogenic genes expression in 3T3-L1 cells. Pre: preadipocytes; Sin: Sinetrol. 3T3-L1 preadipocytes were treated with 0.5 mg/mL of Sinetrol, HLB or HLB-C for 10 days in differentiation medium. RT-PCR was performed using gene specific primers.

mRNA와 C/EBPα와 PPARγ의 단백질 발현량을 조사하였다. C/EBPα는 지방세포에서 특이적으로 발현되는 유전자이며 지방조직의 지질 축적을 증가시킨다(6,18). 또한 SREBP1c는 주로 지방과 간에서 지방산 대사와 지질 생합성에 주로 관여하며 지방세포의 분화과정에서 분화 시작 단계부터 완료 단계까지 발현된다(19,20). SREBP1c의 표적 유전자로는 fatty acid synthase(FAS), lipoprotein lipase (LPL), acetyl-CoA carboxylase(ACC) 등이 있으며 이들은 대부분 지방산 대사 조절을 담당하는 효소이다(21). 따라서 지방분화의 중간단계에서 C/EBPα와 PPARγ, SREBP1c는 중요한 전사인자이다(22). 지질과 탄수화물 대사의 중요한 전자 조절인자인 PPARγ는 hesperetin과 naringenin에 의해서 활성화되며 C/EBPα와 PPARγ의 과발현은 지질 생합성 과정을 촉진시킨다(23,24). 지방전구세포에 분화배지와 함께 한라봉 과피 추출물을 열흘간 처리한 후 RT-PCR을 통해 지방세포 분화 전사인자인 C/EBPα와 SREBP1c의 mRNA를 확인하였다. 그 결과 0.5 mg/mL 농도의 HLB와

HLB-C 처리군에서 C/EBPα가 대조군과 Sinetrol군에 비해서 발현량이 감소하였고 SREBP1c는 감소하는 경향이 있었지만 유의적인 변화를 보이지 않았다(Fig. 3).

Western blot을 이용하여 단백질 발현을 측정된 결과 C/EBPα와 PPARγ는 지방전구세포가 지방세포로 분화되면서 상당하게 증가하였다. 양성대조군으로 처리한 Sinetrol은 1.5 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 C/EBPα와 PPARγ의 단백질 발현량이 감소하는 것을 확인하였으나(data not shown), 그보다 더 낮은 농도인 0.5 mg/mL의 농도로 처리한 Sinetrol은 변화를 나타내지 못했다. 반면에 같은 농도인 0.5 mg/mL로 HLB와 HLB-C를 지방전구세포에 처리한 결과 C/EBPα와 PPARγ가 두 그룹에서 모두 거의 발현되지 않은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 지방세포 분화 전사인자들의 발현 분석 결과 0.5 mg/mL의 HLB와 HLB-C 처리군에서 1 mg/mL 이상의 농도로 처리한 정제된 감귤류 플라보노이드들(naringin, naringenin, hesperidin, hesperetin)보다 지방세포의 분화와 지질 축적을 억제시켰다(data not shown). 따라서 한라봉 과피 추출물은 C/EBPα와 PPARγ의 단백질 발현을 억제함으로써 지방전구세포가 지방세포로의 분화를 저지하는 것으로 사료된다. 지방세포 분화와 마찬가지로 HLB와 HLB-C는 같은 농도에서 Sinetrol보다는 훨씬 효과적으로 동일하게 지방세포 분화인자를 억제시켰지만 효소 처리 전후의 차이는 없었다.

한라봉 과피 추출물이 지방분해에 미치는 영향

지방세포는 여분의 에너지를 lipid droplet 안에 중성지방의 형태로 저장하다가 에너지가 필요하게 되면 adipose tri-glyceride lipase와 HSL, monoglyceride lipase와 같은 효소들에 의해서 지방산과 glycerol로 분해되어 에너지를 생

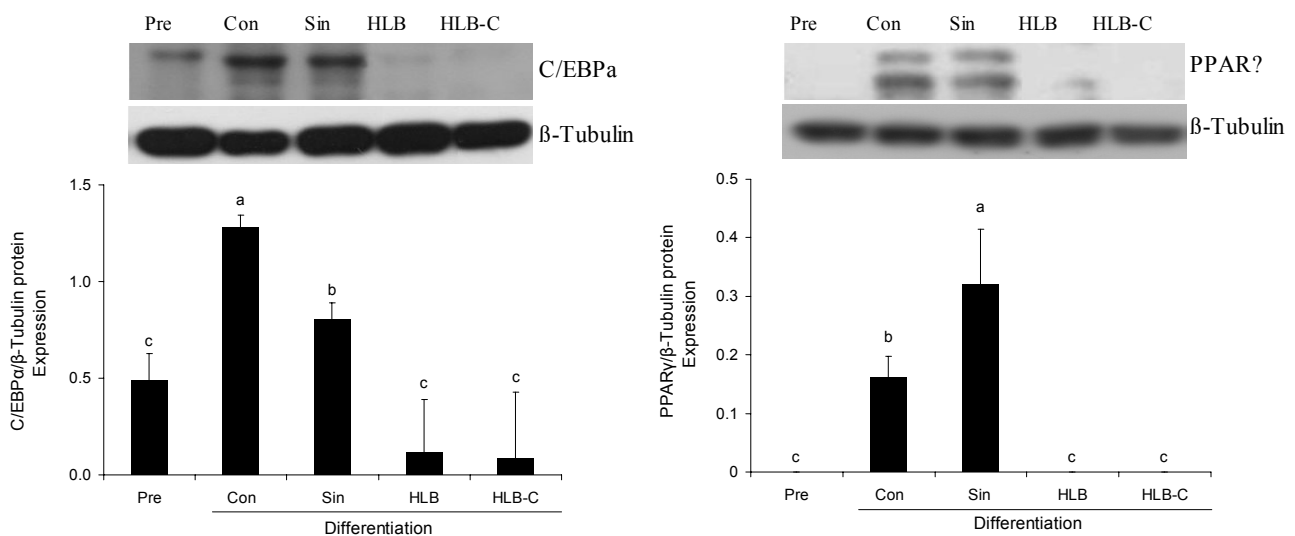


Fig. 4. Effects of HLB and HLB-C on adipogenesis-related protein expression of C/EBPα and PPARγ. 3T3-L1 preadipocytes were treated with 0.5 mg/mL of Sinetrol, HLB or HLB-C for 10 days in differentiation medium. Immunoblotting was performed with specific antibodies. Pre: preadipocytes; Sin: Sinetrol. Each bar represents the mean±SEM (n=3). Different letters (a-c) above the bars mean significant difference according to ANOVA, Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

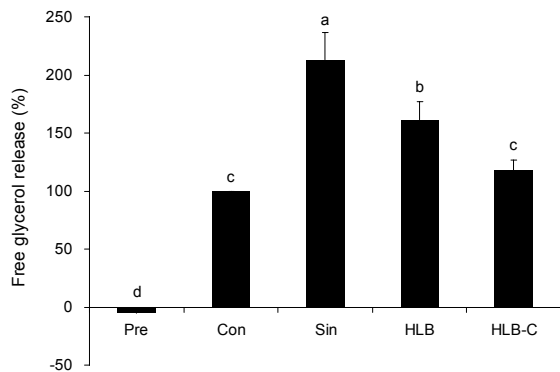


Fig. 5. Effect of HLB and HLB-C on lipolytic activity in 3T3-L1 adipocytes. The differentiated 3T3-L1 adipocytes were cultured in the presence or absence of 0.5 mg/mL of Sinetrol, HLB or HLB-C for 24 hr. Cell culture supernatants were assayed for glycerol release. Each bar represents the mean±SEM (n=3). Different letters (a-d) above the bars mean significant difference according to ANOVA, Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

산하거나 세포 신호전달 또는 지방 합성에 이용한다(22, 25). Free glycerol release의 측정은 지방세포에 축적된 중성지방의 분해 효과를 평가하기 위한 것이다. 지방전구세포를 지방세포로 완전히 분화시키고 분화가 끝난 후 0.5 mg/mL의 농도로 Sinetrol, HLB 또는 HLB-C를 24시간 동안 처리하여 glycerol의 양을 측정하였다. Sinetrol 처리군은 대조군과 비교했을 때 2배로 glycerol의 양이 증가하였고, HLB 처리군은 Sinetrol 처리군보다 약하지만 대조군에 비해 glycerol의 양이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 반면 효소 처리 과정을 거친 HLB-C 처리군은 대조군과 비교하여 glycerol release가 증가되었지만 유의적이지는 않았다(Fig. 5). 가장 높은 지방분해 활성을 나타낸 Sinetrol은 지방세포에서 PDE 활성 억제를 통해 cAMP와 그 표적효소인 HSL을 자극함으로써 유리지방산과 glycerol를 증가시켜 지방을 효과적으로 연소하는 약물이다(15). 이러한 기능성을 나타내는 Sinetrol은 감귤류의 폴리페놀 중 특히 플라보노이드의 naringin, narirutin, hesperedin, neohesperedin으로 주로 구성되어 있다(15). 이것은 주로 당이 붙어 있는 glycone의 형태이며 한라봉 추출물들의 구성성분과 비교하면 HLB는 glycone, HLB-C는 aglycone으로 주로 구성되어 있다(Table 1, 2). 본 실험 결과 HLB 처리군은 지방분해를 증가시켰으나 HLB-C 처리군에서는 유의적인 효과가 나타나지 않았다. 이것을 통해 지방세포에서의 지방분해는 aglycon보다 glycone 형태에서 더 효과가 있는 것으로 사료된다. 최근에는 *Citrus sunki* 과피 추출물(17)과 *Citrus aurantium* L. 추출물(26,27)이 각각 마우스모델과 비만인도모델의 지방세포에서 β -산화와 지질분해(lipolysis)를 촉진함으로써 body fat mass를 감소시키는 항비만 효과가 있음이 보고되었다.

요 약

본 연구는 한라봉 과피 추출물과 효소 처리시킨 한라봉 과피 추출물의 3T3-L1 지방전구세포에서의 항비만 효과를 비교하여 연구하였다. Cytolase를 이용한 플라보노이드 형태 전환으로 한라봉 과피 추출물에 다량 존재하던 narirutin이 naringenin으로 또는 hesperidin이 hesperetin으로 변환되었다. 지방전구세포에 분화배지와 함께 10일간 HLB와 HLB-C, 양성대조군으로 Sinetrol을 다양한 농도로 처리한 결과 모든 세포군에서 0.5 mg/mL 농도에서는 세포생존율에 유의적인 영향을 미치지 않았기 때문에 적정 처리 농도를 0.5 mg/mL로 확정하였다. Oil red O 염색을 통해 지방세포의 분화 정도를 측정한 결과 양성대조군인 Sinetrol 처리군보다 같은 농도의 HLB와 HLB-C 처리군이 분화를 억제시켰다. 지방세포 분화 억제의 분자생화학적 기전을 규명하기 위해 분화 관련 유전자와 단백질 발현을 RT-PCR과 western blotting을 통해서 실험한 결과, 0.5 mg/mL 농도의 HLB와 HLB-C 처리군에서 대조군과 Sinetrol군에 비해 C/EBP α , SREBP1c의 유전자가 감소하는 경향성을 나타내었고 C/EBP α 와 PPAR γ 의 단백질 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이미 형성된 지방세포의 분해 작용에 HLB와 HLB-C가 영향을 주는지 평가하기 위해 완전히 분화된 지방세포에 24시간 동안 0.5 mg/mL의 농도로 처리한 결과 Sinetrol과 HLB는 지방분해 효과를 나타내었으나 HLB-C는 지방세포의 분해 작용에 유의적인 영향을 주지 않았다. 따라서 이러한 실험 결과들은 한라봉 과피 추출물이 지방세포 분화 억제와 지질분해 활성이 있고 이는 cytolase로 효소 처리를 할 경우에도 비슷한 결과를 보였으며 오히려 지질분해 활성은 감소하였다. 한라봉 과피 추출물의 *in vitro* 상에서 검증된 항비만 효능이 향후에 *in vivo* 상에서 지방분해 억제와 지방분해에 미치는 영향에 대한 추가 검증이 필요하다고 사료된다. 또한 향후 한라봉뿐 아니라 다른 감귤류를 이용하여 다양한 probiotics 미생물에 존재하는 효소와 다른 상업화 효소 등을 통한 물질전환 효과를 비교·연구하는 것이 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011~2013년에 농림수산식품기술기획평가원 공동연구사업과 2014년 명지대학교 교직원중점연구소 지원 사업에 의해서 수행한 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.
- Ailhaud G, Guesnet P, Cunnane SC. 2008. An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose

- tissue development? *Br J Nutr* 100: 461-470.
3. Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556.
 4. Park HS, Kim SH, Kim YS, Ryu SY, Hwang JT, Yang HJ, Kim GH, Kwon DY, Kim MS. 2009. Luteolin inhibits adipogenic differentiation by regulating PPAR γ activation. *Biofactors* 35: 373-379.
 5. Kim GS, Park HJ, Woo JH, Kim MK, Koh PO, Min W, Ko YG, Kim CH, Won CK, Cho JH. 2012. *Citrus aurantium* flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement Altern Med* 12: 31-40.
 6. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5: 1538-1552.
 7. Ejaz S, Ejaz A, Matsuda K, Lim CW. 2006. Limonoids as cancer chemopreventive agents. *J Sci Food Agric* 86: 339-345.
 8. Nichols LA, Jackson DE, Manthey JA, Shukla SD, Holland LJ. 2011. Citrus flavonoids repress the mRNA for stearyl-CoA desaturase, a key enzyme in lipid synthesis and obesity control, in rat primary hepatocytes. *Lipids Health Dis* 10: 36-40.
 9. Peterson J, Dwyer J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res* 18: 1995-2018.
 10. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 104: 466-479.
 11. Fuhr U, Kummert AL. 1995. The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther* 58: 365-373.
 12. Santamaria RI, Reyes-Duarte MD, Bárzana E, Fernando D, Gama FM, Mota M, López-Munguía A. 2000. Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent. *J Agric Food Chem* 48: 3063-3067.
 13. Seo JY, Lee JH, Kim NW, Her E, Chang SH, Ko NY, Yoo YH, Kim JW, Seo DW, Han JW, Kim YM, Choi WS. 2005. Effect of a fermented ginseng extract, BST204, on the expression of cyclooxygenase-2 in murine macrophages. *Int Immunopharmacol* 5: 929-936.
 14. Yang G, Park D, Lee J, Song BS, Jeon TH, Kang SJ, Jeon JH, Shin S, Jeong H, Lee H, Kim Y. 2011. Suppressive effects of red ginseng preparations on SW480 colon cancer xenografts in mice. *Food Sci Biotechnol* 20: 1649-1653.
 15. Dallas C, Gerbi A, Tenca G, Juchaux F, Bernard F. 2008. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine* 15: 783-792.
 16. Kanda K, Nichi K, Kadota A, Nishimoto S, Liu MC, Sugahara T. 2012. Nobiletin suppresses adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by an insulin and IBMX mixture induction. *Biochim Biophys Acta* 1820: 461-468.
 17. Kang SI, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Yoon SA, Kang SW, Kim JH, Kim MH, Ko HC, Kim SJ. 2012. Immature *Citrus sunki* peel extract exhibits anti-obesity effects by β -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. *Biol Pharm Bull* 35: 223-230.
 18. Lin FT, Lane MD. 1994. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8757-8761.
 19. Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE Jr. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10: 3-10.
 20. Park J, Kim JB. 2002. Molecular insights into fat cell differentiation and functional roles of adipocytokines. *Endocrinol Metab* 17: 1-9.
 21. Kim JB, Spiegelman BM. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10: 1096-1107.
 22. Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 19: 717-726.
 23. Liu L, Shan S, Zhang K, Ning ZQ, Lu XP, Cheng YY. 2008. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother Res* 22: 1400-1403.
 24. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H. 2004. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113: 846-855.
 25. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. 2009. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 50: 3-21.
 26. Hazz S, Fontaine KR, Cutter G, Limdi N, Perumean-Chaney S, Allison DB. 2006. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obes Rev* 7: 79-88.
 27. Mercader J, Wanecq E, Chen J, Carpené C. 2011. Isopropyl-norsynephrine is a stronger lipolytic agent in human adipocytes than synephrine and other amines present in *Citrus aurantium*. *J Physiol Biochem* 67: 443-452.