

고지방식이로 유도한 비만 Mice에서 잣송이 초임계 추출물의 항비만 효과

이다솜¹ · 이민희¹ · 김혜숙² · 정특래³ · 양현필³ · 허석현⁴ · 이정민^{1,5}

¹경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과, ²경희대학교 동서의학대학원 동서의학과
³(주)키토라이프, ⁴한국건강기능식품협회, ⁵경희대학교 임상영양연구소

Anti-Obesity Effect of Pine Cone (*Pinus koraiensis*) Supercritical Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice

Dasom Lee¹, Minhee Lee¹, Hyesook Kim², Tuk-Rai Jeong³, Hyun-Pil Yang³,
Heo Seok Hyun⁴, and Jeongmin Lee^{1,5}

¹Department of Medical Nutrition and ²Department of East-West Medicine, and
⁵Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University

³Kitto Life Co., Ltd.

⁴Korea Health Supplements Association

ABSTRACT The present study investigated the anti-obesity effect of pine cone (PC, *Pinus koraiensis*) supercritical extract in high-fat diet (HFD)-induced obese mice. Male C57BL/6J mice were treated with HFD, HFD+catechin, and HFD+PC [two different doses, 20 mg/kg body weight (b.w.) and 100 mg/kg b.w.] in each AIN93G supplement for 8 weeks. Treatment of HFD mice with both low and high doses of PC significantly reduced body weight gain compared to HFD mice. Liver weight of mice was reduced in both the low and high dose PC-supplemented groups (24.19% and 19.83%, respectively). Total adipose tissue weight of mice was reduced in both the low and high dose PC-supplemented groups (45.54% and 62.66%, respectively). Serum total cholesterol, triglyceride, LDL cholesterol, and HDL cholesterol were reduced in the low and high dose PC-supplemented groups, and ratios of HDL cholesterol to LDL cholesterol increased by 94.55% in the high dose PC-supplemented group. Serum leptin was significantly reduced in the low and high dose PC-supplemented groups (28.14% and 62.72%, respectively). These results were supported by genetic expression of protein and enzymes related to lipid metabolism assessed by real-time PCR. There was significant reduction of lipid regulatory transcription factors such as PPAR- γ , C/EBP, and SREBP and lipid enzymes such as fatty acid synthesis and lipoprotein lipase in the low and high dose PC-supplemented groups. However, there was no statistical difference between low and high dose PC treatments. These results suggest that pine cone supercritical extract supplementation is able to regulate serum lipid profiles by reducing total cholesterol, triglyceride, and LDL cholesterol levels, followed by regulation of expression of lipid metabolic factors, resulting in reduction of weight gain in HFD-induced obese mice.

Key words: pine cone, *Pinus koraiensis*, supercritical extract, anti-obesity

서론

최근 우리나라의 식생활이 서구화됨에 따라 고지방식이 섭취는 증가하였으나, 중등도 신체활동 실천율 및 걷기 실천율은 감소하였고, 비만 유병률이 1998년 29.1%에서 2014년 32.9%로 급증하고 있는 것으로 2014년 국민건강통계에 보고되었다(1). 비만은 에너지의 섭취와 소비의 불균형으로 소비되고 남은 에너지가 체내 지방에 과도하게 축적되는 상태를 말하며, adipogenesis 과정에 의하여 지방세포의 세포

내 중성지방 축적으로 발생한다(2). Adipogenesis 과정은 peroxisome proliferation activated receptor gamma (PPAR- γ), sterol regulatory element binding proteins (SREBP), CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) 등과 같은 adipogenic transcription factor의 활성화와 호르몬의 자극이 필수적이다(3-5). 또한, 비만은 정신적 문제, 부적절한 식습관, 운동부족, 내분비계장애 및 유전적 요인 등 다양한 원인들이 관여하는 복합적 증후군으로 심혈관계 질환, 고지혈증, 고인슐린혈증과 같은 성인병을 일으키는 주된 원인이 되고 있어, 비만의 예방 및 치료를 위한 방법으로 지방 및 단백질 대사 또는 지방과 단백질의 저장에 대한 조절, 음식섭취의 감소, 지방 분해, thermogenesis 증가, 영양소 흡수의 억제 등이 있다(6-11).

Received 19 August 2016; Accepted 20 September 2016

Corresponding author: Jeongmin Lee, Department of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 17104, Korea
E-mail: jlee2007@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3779

비만을 치료하기 위해 현재까지 개발된 비만치료제로는 제니칼(orlistat), mazindol, phentermine 등으로 지방 흡수를 억제하거나 식욕을 억제한다. 그러나 이러한 비만치료제는 지방변 및 위장질환, 입마름과 수면장애 등과 같은 부작용이 나타나 보다 효과적이고 안전한 항비만 물질을 개발하기 위해 천연 소재의 기능성 물질 개발의 필요성이 요구되고 있다(12-16). 잣나무(*Pinus koraiensis*)는 우리나라 중부 이북과 경남지역 등에서 널리 성장하고 있는 소나무과에 속하는 상록목으로, 잣나무에는 항균 및 살충 효과, 항암, 항알레르기 효과가 있으며, 잣나무의 terpinolene과 bomeol 성분은 콜레스테롤 수치를 낮추는 것으로 보고되었고, 잣송이 정유 성분이 항비만 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(17-20).

잣나무 및 잣송이를 이용한 기존의 추출법은 물 또는 유기용매를 상온이나 고온에서 추출하는 기법으로 인체 내 독성과 분리공정에 의한 생성물질의 변성 및 수율 저하 등과 같은 문제점이 나타나 이를 최소화하기 위해 초임계법이 제안되고 있다(21). 초임계법은 낮은 임계온도와 압력으로 고체가 비이상적으로 용해되는 현상을 이용한 물질 분리법이지만 잣송이의 초임계 추출물의 생리활성 연구는 아직 미흡한 실정이다(22). 따라서 본 연구에서는 초임계법으로 추출한 잣송이의 생리활성물질이 고지방식이로 유도한 비만 mice에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

잣송이 초임계 추출물의 제조

1 L의 초임계 추출장비에 분쇄된 잣송이 310 g을 투입한 후, energized seal로 밀봉하고 추출기의 head 부분과 본체는 clamp 체결 방식을 사용하였다. 초임계 유체로 사용된 CO₂는 cylinder에서 가스 상태로 나와서 원하는 압력에 도달할 때까지 Haskel gas booster(No. 30/75, Holiday Inn., Burbank, CA, USA)를 이용하여 압력을 높이고 300 bar에 도달한 후, 추출기 내부가 일정한 압력을 유지하도록 needle valve를 조작하면서 추출물을 500 mL 가지 달린 플라스크에 포집하였다. 추출기의 온도는 자동 온도 조절이 가능한 전기히터를 사용하여 70°C로 일정하게 유지하였다. 추출 종료 시점은 추출물의 무게가 증가할 때까지 최대한 진행하였다. 초임계 추출을 통해 얻어진 잣송이의 수득률은 약 6.03%로 나타났다.

실험동물

동물실험은 경희대학교 동물실험윤리의원회의 심의(승인번호 KHUASP(SE)-14-005)를 거친 후 진행하였다. 실험동물은 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea) 사육장으로부터 생후 5주령의 수컷 C57BL/6J male mice(n=35)를 구입하여 일주일 동안 설치류 사육실에서 일반식이(AIN93G)를 공급하며 적응시킨 후 적응기간 중 일반상태를 관찰하여 건강

한 개체를 무작위법으로 군 분리를 시행하였다. 실험군의 분류는 정상대조군(normal control; NC), 고지방식이 비만대조군(high-fat diet; HFD), 양성대조군(HFD+ catechin), 잣송이 초임계 추출물 20 mg/kg b.w.(HFD+ PC low), 잣송이 초임계 추출물 100 mg/kg b.w.(HFD+ PC high) 총 5군으로 7마리씩 5군으로 분류하여 8주간 사육이 진행되었다. 사육환경은 온도 23±3°C, 습도 50±5%에서 light cycle이 12시간 유지되었다.

식이 및 급여

잣송이 초임계 추출물의 항비만 효과를 관찰하기 위해 잣송이 추출물이 첨가된 식이를 제공하고 관찰하였다. 잣송이 초임계 추출물은 AIN93G diet에 첨가하여 시료를 제조하여 사용하였고, 식이 농도는 20 mg/kg b.w.와 100 mg/kg b.w.로 설정하였다. 실험기간 동안 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 식이효율(food efficiency ratio; FER)은 실험식이 공급일로부터 희생일까지 총 실험기간 동안의 식이섭취량을 나누어 산출하였다.

조직 분석

체중 후 즉시 개복하여 간 및 지방조직(백색지방; 피하지방, 내장지방, 갈색지방)을 적출한 다음 생리식염수로 세척하여 여과지로 수분을 제거한 후 중량을 측정하였다.

혈액 분석

실험 종료 시 실험동물은 12시간 절식시킨 후 ethyl ether로 마취하고 안와동맥을 통해 채혈하였다. 혈액은 원심분리(16,000 rpm, 20 min, 4°C) 하여 혈청을 분리한 후, 분석 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다.

분리된 혈청을 이용하여 총콜레스테롤, 중성지방, HDL 콜레스테롤, LDL/VLDL 콜레스테롤은 enzyme assay kit (BioVision Inc., Mountain View, CA, USA)을 사용하여 분석하였다.

RNA 추출 및 real-time polymerase chain reaction(real-time PCR)

잣송이 초임계 추출물의 섭취에 따른 지방 대사 관련 유전자의 발현을 확인하기 위해 real-time PCR을 실시하였다. 지방조직을 적출하여 RNeasy[®] Lipid Tissue Mini kit(Qiagen Sciences Inc., Gaithersburg, MD, USA)으로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시하였다. iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 real-time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 각각의 유전자에 대

Table 1. Primer sequences used in real-time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
PPAR- γ	F 5'-GCCCACTTCGGAATC-3' R 5'-TGCGAGTGGTCTTCCATCAC-3'
C/EBP	F 5'-GAGCTGAGTGAGGCTCTCATTCT-3' R 5'-TGGGAGGCAGACGAAAAAAC-3'
SREBP	F 5'-CCAGAGGGTGAGCCTGACAA-3' R 5'-AGCCTCTGCAATTCCAGATCT-3'
FAS	F 5'-GAAGTGTCTGGACTGTGTCATTTTAC-3' R 5'-TTAATTGTGGGATCAGGAGAGCAT-3'
LPL	F 5'-CAAGATTCACCTTTTCTGGGACTGA-3' R 5'-GCCACTGTGCCGTACAGAGA-3'
GAPDH	F 5'-CATGGCCTTCCGTGTTTCTCA-3' R 5'-GCGGCACGRCAGATCCA-3'

한 PCR primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였다. Real-time PCR 반응은 총 20 μ L 내에 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μ L를 1 μ L씩 첨가하였고, 나머지는 H₂O로 채워주었다. PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 52°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Applied Biosystems에서 제공하는 One step system software v2.1로 분석하였다.

통계처리

본 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science) version 20 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 측정항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고

실험군 간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검증하였으며 $P < 0.05$ 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

잣송이 초임계 추출물에 따른 실험동물의 체중 변화, 식이효율, 간 및 지방조직 무게 변화

잣송이 초임계 추출물이 실험동물의 체중 변화, 식이효율, 간 및 지방 조직무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 측정된 결과(Table 2), 실험동물의 체중 변화는 정상대조군(normal control; NC)에 비해 고지방식이 비만대조군(high-fat diet; HFD)에서 306.36% 유의적으로 증가하여 비만이 유도되었음을 확인하였다. HFD군에 비해 양성대조군(HFD + catechin), 잣송이 초임계 추출물 20 mg/kg b.w.(HFD+ PC low), 잣송이 초임계 추출물 100 mg/kg b.w.(HFD+ PC high)에서 각각 54.39%, 47.29%, 63.60% 유의적으로 감소하였다($P < 0.05$). 잣송이 초임계 추출물군 간의 유의적인 차이도 함께 나타났다($P < 0.05$). 식이효율(FER)을 계산한 결과 NC군에 비해 HFD군에서 70.49% 유의적으로 증가하였고, HFD군에 비해 HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군에서 각각 59.46%, 43.33%, 42.14% 유의적으로 감소하였으며($P < 0.05$), 식이섭취군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이러한 경향은 잣송이 초임계 추출물이 고지방 식이에 의한 체중의 증가를 감소시키는 것으로 생각한다.

비만에 있어서 더 위험한 요소는 체중의 증가보다 체지방 및 조직 무게의 증가이다. 간(liver)의 경우 NC군에 비해 HFD군에서 96.79% 유의적으로 높게 나타났고($P < 0.05$), HFD군에 비해 HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군에서 각각 36.13%, 24.19%, 19.83% 유의적으로 감소하였으며($P < 0.05$), 식이 섭취군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 고지방 식이 섭취 시 지방 대사가 비정상적

Table 2. Effect of pine cone (*Pinus koraiensis*) supercritical extracts on body weight gain, FER, and tissue weight in high-fat diet-induced obese mice

	NC ¹⁾	HFD	HFD+catechin	HFD+PC low	HFD+PC high
Initial body weight (g)	21.58±1.22 ^{NS}	21.15±1.45	21.65±1.41	23.38±1.43	21.87±0.83
Final body weight (g)	28.40±2.82 ^d	48.85±1.44 ^a	34.28±2.25 ^{bc}	36.98±3.07 ^b	31.95±1.83 ^c
Weight gain (g)	6.82±3.00 ^d	27.70±0.61 ^a	12.63±1.49 ^{bc}	14.60±2.22 ^b	10.08±2.28 ^c
FER ²⁾	4.77±2.10 ^b	8.13±0.18 ^a	3.30±0.39 ^b	4.61±0.70 ^b	4.71±1.06 ^b
Tissue weight (g)					
Liver	1.05±0.28 ^c	2.06±0.50 ^a	1.32±0.14 ^{bc}	1.56±0.17 ^b	1.65±0.32 ^b
Subcutaneous adipose tissue	0.58±0.25 ^c	3.41±0.35 ^a	1.16±0.33 ^b	1.32±0.41 ^b	0.61±0.33 ^c
Visceral adipose tissue	1.40±0.71 ^d	5.76±0.78 ^a	3.41±0.40 ^{bc}	3.55±0.80 ^b	2.70±0.59 ^c
Brown adipose tissue	0.11±0.04 ^b	0.13±0.06 ^{ab}	0.17±0.06 ^{ab}	0.19±0.07 ^a	0.16±0.06 ^{ab}
Total adipose tissue	2.08±0.98 ^d	9.30±1.18 ^a	4.74±0.76 ^b	5.07±1.15 ^b	3.47±0.78 ^c

¹⁾NC: normal control, HFD: high-fat diet-induced obese, HFD+catechin: high-fat diet+catechin, HFD+PC low: high-fat diet+pine cone supercritical extract 20 mg/kg b.w., HFD+PC high: high-fat diet+pine cone supercritical extract 100 mg/kg b.w..

²⁾FER (food efficiency rate)=weight gain (g)/ total food consumption (g)×100.

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA and using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. NS: not significant.

으로 일어나게 되면 간 내 지질 성분이 축적되어 간의 무게가 증가하는 것으로 알려져 있다(23). 피하지방(subcutaneous adipose tissue)의 경우 NC군에 비해 HFD군에서 492.15% 유의적으로 높게 나타났고($P<0.05$), HFD군에 비해 HFD+ catechin군은 65.82% 유의적으로 감소하였고, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군에서 각각 61.17%, 82.00% 농도 의존적으로 감소하였다($P<0.05$). 내장지방(visceral adipose tissue)의 경우 NC군에 비해 HFD군에서 311.18% 유의적으로 증가하였고, HFD군에 비해 HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군에서 각각 40.87%, 38.35%, 53.15% 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 갈색지방(brown adipose tissue)의 경우 HFD+ PC low군이 가장 높게 나타났지만 HFD 섭취군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 총 지방 무게는 HFD군이 9.30 ± 1.18 g으로 가장 높게 나타났고, HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군은 HFD군에 비해 49.03%, 45.54%, 62.66% 유의적으로 감소하였다($P<0.05$).

체지방 감소에 효과적인 것으로 알려진 catechin을 positive control로 하여 잣송이 초임계 추출물의 섭취 효과를 비교한 결과 체중 증가량, 식이효율, 조직의 무게 등에서 모두 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인하였다. 따라서 잣송이 초임계 추출물의 섭취 또한 체중의 증가 및 체지방의 축적을 억제하는 효과가 있는 것으로 보인다.

잣송이 초임계 추출물 섭취에 따른 혈청 지질 함량 측정

비만에서는 남은 에너지가 지방으로 전환되어 체내에 축적이 되고, 축적된 지방은 비정상적인 지질 대사로 인한 다양한 이상지질혈증이 나타나며, 이전 연구들에 따르면 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에서 콜레스테롤과 중성지방의 증가를 보고한 바 있다(24,25).

잣송이 초임계 추출물 섭취에 따른 혈청 지질 함량을 측정한 결과, 총콜레스테롤 함량은 NC군에서 180.52 ± 24.73 mg/dL를 나타냈지만, HFD군은 219.83 ± 7.97 mg/dL로 21.77% 유의적으로 증가하여 비만이 유도되었음을 확인하였다($P<0.05$). HFD군에 비해 HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군은 각각 19.05%, 25.05%, 26.30% 유의적으로 감소하였고($P<0.05$), 군 간의 유의적

인 차이는 나타나지 않았다. 중성지방 함량은 NC군(17.21 ± 2.54 mM)에 비해 HFD군(21.95 ± 2.24 mM)에서 27.53% 유의적으로 증가하였고, HFD군에 비해 HFD+ catechin군(19.28 ± 1.10 mM), HFD+ PC low군(18.26 ± 1.91 mM), HFD+ PC high군(10.96 ± 0.33 mM)은 각각 12.15%, 16.81%, 50.08% 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). LDL/VLDL 콜레스테롤의 함량은 NC에 비해 HFD군에서 103.75% 유의적으로 증가한 반면, HFD군에 비해 HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군은 각각 33.47%, 26.43%, 52.87% 유의적으로 감소한 것을 확인하였다($P<0.05$). HDL 콜레스테롤의 함량은 NC에 비해 HFD군에서 16.92% 증가하였고, HFD군에 비해 HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군에서 각각 12.64%, 29.46%, 21.66% 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 이는 총콜레스테롤의 감소가 HDL 콜레스테롤 함량에도 영향을 주는 것으로 생각하며, HDL 콜레스테롤의 함량보다 HDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 비율이 중요할 것으로 생각한다. 따라서 HDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 비율을 계산한 결과 NC군에 비해 HFD군에서 47.47% 유의적으로 낮았고, HFD군에 비해 HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군에서 각각 31.03%, 9.63%, 94.55% 증가하였으며, HFD+ PC high군은 유의적인 차이가 나타났음을 확인하였다($P<0.05$).

지질은 세포막, 담즙, 호르몬의 중요 성분이지만, 혈중 지질 함량이 높으면 다양한 질병의 위험도를 높이는 것으로 알려져 있고 특히 LDL 콜레스테롤은 간에서 다른 조직으로 콜레스테롤을 운반하고 체내에 축적하는 것으로 알려져 있는 반면, HDL 콜레스테롤은 조직의 콜레스테롤을 간으로 운반, 체외로 배설하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(26, 27). 본 연구에서 catechin의 섭취가 혈청 지질 함량을 개선시켜주는 효과를 나타내었는데, 최근 녹차의 주요 성분인 catechin이 혈중 콜레스테롤을 저하시킨다는 보고와 일치한다. 그리고 이러한 혈중 콜레스테롤의 저하는 소장에서의 콜레스테롤 흡수를 억제하기 때문인 것으로 보고된 바 있다(28). 본 연구에서 사용된 잣송이 초임계 추출물이 비록 HDL 콜레스테롤 함량을 감소시켰으나, HDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤 비율은 오히려 HFD군에 비해 증가하였다. 이는

Table 3. Effect of pine cone (*Pinus koraiensis*) supercritical extracts on lipid profiles in high-fat diet-induced obese mice

	NC ¹⁾	HFD	HFD+catechin	HFD+PC low	HFD+PC high
Total cholesterol (mg/dL)	180.52±24.73 ^b	219.83±7.97 ^a	177.95±10.43 ^b	164.77±11.53 ^b	162.01±6.03 ^b
Triglyceride (mM)	17.21±2.54 ^b	21.95±2.24 ^a	19.28±1.10 ^b	18.26±1.91 ^b	10.96±0.33 ^c
LDL/VLDL cholesterol (mg/dL)	19.69±5.05 ^c	40.12±3.84 ^a	26.69±6.57 ^b	29.52±5.37 ^b	18.97±2.54 ^c
HDL cholesterol (mg/dL)	82.31±7.53 ^b	96.23±4.21 ^a	84.06±8.70 ^b	67.88±5.46 ^c	75.39±1.22 ^{bc}
HDL/LDL cholesterol (ratio)	4.38±0.64 ^a	2.30±0.12 ^b	3.02±0.58 ^b	2.52±0.34 ^b	4.48±0.50 ^a
Leptin (ng/mL)	12.84±0.69 ^d	37.81±4.33 ^a	21.12±2.60 ^{bc}	27.07±7.98 ^b	14.09±2.70 ^{cd}

¹⁾NC: normal control, HFD: high-fat diet-induced obese, HFD+catechin: high-fat diet+catechin, HFD+PC low: high-fat diet+pine cone supercritical extract 20 mg/kg b.w., HFD+PC high: high-fat diet+pine cone supercritical extract 100 mg/kg b.w.. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

갯송이 초임계 추출물이 콜레스테롤의 함량을 감소시키고, HDL 콜레스테롤의 감소보다는 LDL 콜레스테롤 감소에 더 영향을 많이 주는 것으로 보인다. 따라서 갯송이 초임계 추출물은 비만이 유도된 마우스의 혈청 지질 함량을 개선시켜 주는 효과가 있는 것으로 생각한다.

갯송이 초임계 추출물 섭취에 따른 혈청 leptin 함량 측정

지방세포에서 분비되는 adipokine인 leptin은 neuropeptide Y(NPY), melanocortin, agouti-related peptide (AgRP) 등 anorexigenic peptide 유전자 발현을 조절하고, 간에서 lipogenesis 및 lipolysis, 식품 섭취 및 체중을 조절하는 신호전달 단백질이다(2,29). 혈청 leptin의 농도는 정상인에 비해 과체중이거나 비만에서 높게 나타나는 것으로 보고되고 있다(2).

갯송이 초임계 추출물 섭취에 따른 혈청 leptin 함량을 측정한 결과(Table 3), NC군(12.84±0.69 ng/mL)에 비해 HFD군(37.81±4.33 ng/mL)에서 194.35% 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). HFD+ catechin군(21.12±2.60 ng/mL), HFD+ PC low군(27.07±7.98 ng/mL), HFD+ PC high군(14.09±2.70 ng/mL)은 HFD군에 비해 각각 44.13%, 28.41%, 62.72% 유의적으로 감소하였고, 갯송이 초임계 추출물 섭취군은 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다($P<0.05$).

따라서 갯송이 초임계 추출물이 비만에 의해 증가한 혈청 leptin 함량을 감소시키는 효과가 있는 것으로 생각한다.

갯송이 초임계 추출물 섭취에 따른 지방조직 내 adipogenic transcription factor 발현 측정

Adipogenic transcription factor에는 peroxisome proliferation activated receptor gamma(PPAR- γ), sterol regulatory element binding proteins(SREBP), CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP)이 존재한다. PPAR- γ 는 백색지방 조직에 존재하고 대표적인 지방조직 분화 전사인자로 체지방 축적 및 지방세포 분화에 중요한 역할을 하고, SREBP는 간과 지방의 지방산과 콜레스테롤 대사에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. C/EBP는 지방세포 분화와 관련된 전사인자 중 가장 처음으로 밝혀졌고, 백색지방, 갈색지방에서 발현이 되며, C/EBP 발현 증가는 PPAR- γ 의 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다(3-5,30).

갯송이 초임계 추출물 섭취에 따른 지방조직 내 adipogenic transcription factor를 측정한 결과(Fig. 1), PPAR- γ 의 발현은 NC군에 비해 HFD군에서 178.49% 유의적으로 증가하였고, HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군은 HFD에 비해 각각 87.63%, 53.11%, 48.44% 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). SREBP의 발현은 NC군에 비해 HFD군에서 147.32% 유의적으로 증가하였고, HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군은 HFD에 비해 각각 89.44%, 92.99%, 58.01% 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 또한, C/EBP의 발현 역시 NC군에 비해 HFD

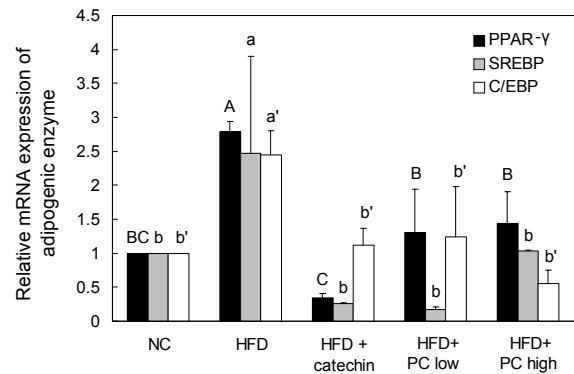


Fig. 1. Effect of pine cone (*Pinus koraiensis*) supercritical extracts on expression of adipogenic transcription factors in high-fat diet-induced obese mice. NC: normal control, HFD: high-fat diet-induced obese, HFD+catechin: high-fat diet+catechin, HFD+PC low: high-fat diet+pine cone supercritical extract 20 mg/kg b.w., HFD+PC high: high-fat diet+pine cone supercritical extract 100 mg/kg b.w.. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

군에서 144.37% 유의적으로 증가하였고, HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군에서 HFD에 비해 각각 54.43%, 49.32%, 77.11% 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 이는 갯송이 초임계 추출물이 adipogenic transcription factor의 발현을 억제하여 지방세포 내 지방산의 축적과 지방 분화를 저해하여 체지방 감소 효과를 나타내는 것으로 보인다.

갯송이 초임계 추출물 섭취에 따른 지방조직 내 adipogenic enzyme 발현 측정

지방합성에 관여하는 효소로 fatty acid synthesis(FAS), lipoprotein lipase(LPL)가 존재한다. FAS는 acetyl-CoA의 축합반응으로 긴 사슬 지방산의 합성 반응을 촉매하며, LPL은 지방산과 monoacylglycerol을 가수분해하고 에너지를 지방세포에 중성지방 형태로 저장시키며, 콜레스테롤 흡수와 LDL receptor 결합력을 증가시키는 효소이다(31, 32).

갯송이 초임계 추출물 섭취에 따른 지방 조직 내 FAS의 발현을 측정한 결과(Fig. 2), NC군에 비해 HFD군에서 150.39% 유의적으로 증가하였고, HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군은 HFD에 비해 각각 87.88%, 91.56%, 89.87% 유의적으로 감소하였으나($P<0.05$), 식이 섭취군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. SREBP의 발현을 측정한 결과(Fig. 3), NC군에 비해 HFD군에서 72.71% 증가하였고, HFD+ catechin군, HFD+ PC low군, HFD+ PC high군은 HFD에 비해 각각 66.74%, 76.28%, 78.91% 유의적으로 감소하였으나($P<0.05$), 식이섭취군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 따라서 갯송이 초임계 추출물이 FAS와 LPL 발현을 저해하여 지방산의 합성을 억제함으로

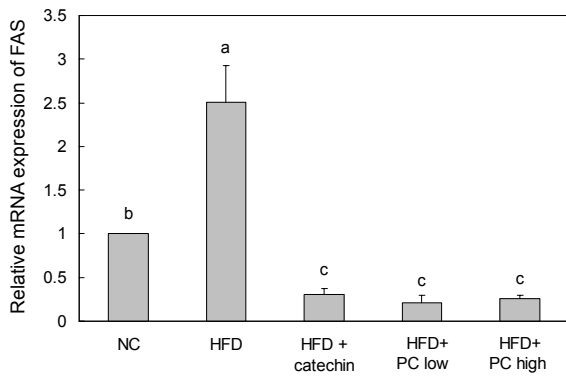


Fig. 2. Effect pine cone (*Pinus koraiensis*) supercritical extracts on expression of FAS in high-fat diet-induced obese mice. NC: normal control, HFD: high-fat diet-induced obese, HFD+catechin: high-fat diet+catechin, HFD+PC low: high-fat diet+pine cone supercritical extract 20 mg/kg b.w., HFD+PC high: high-fat diet+pine cone supercritical extract 100 mg/kg b.w.. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

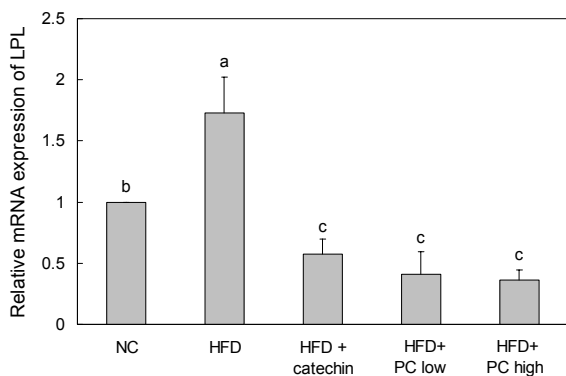


Fig. 3. Effect of pine cone (*Pinus koraiensis*) supercritical extracts on expression of LPL in high-fat diet-induced obese mice. NC: normal control, HFD: high-fat diet-induced obese, HFD+catechin: high-fat diet+catechin, HFD+PC low: high-fat diet+pine cone supercritical extract 20 mg/kg b.w., HFD+PC high: High-fat diet+pine cone supercritical extract 100 mg/kg b.w.. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

써 지방 축적을 감소시킨 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 C57BL/6J 마우스에 고지방 식이를 통한 비만을 유도시키며 동시에 잣송이 초임계 추출물을 식이에 첨가하여 8주간 식이 투여하여 항비만 식품 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 잣송이 초임계 추출물 20 mg/kg b.w.(HFD+ PC low), 잣송이 초임계 추출물 100 mg/kg b.w.(HFD+ PC high) 섭취군의 체중증가량은 고지방식이 유도

비만 대조군(HFD)에 비해 각각 유의적으로 감소하였고, 간, 백색 지방, 총 지방 무게의 변화량 역시 잣송이 초임계 추출물 섭취군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다. 실험동물의 혈청 지질 함량은 총콜레스테롤, 중성지방, LDL/VLDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤이 HFD군에 비해 잣송이 초임계 추출물 섭취군에서 유의적으로 감소하였으나, HDL/LDL 비율을 계산한 결과에서는 잣송이 초임계 추출물 섭취군이 HFD군에 비해 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. 실험동물군의 지방 조직에서 adipogenic transcription factor (PPAR- γ , SREBP, C/EBP)의 발현을 측정된 결과, 잣송이 초임계 추출물 섭취군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한, adipogenic enzyme(FAS, LPL)의 발현을 측정된 결과, 잣송이 초임계 추출물 섭취군이 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과로부터 잣송이 초임계 추출물이 항비만 효과를 가진 천연 기능성 식품의 개발에 있어 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 농림수산식품부 고부가가치사업 연구비 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Korea Health Statistics. 2014. 2014: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-2). Ministry of Health and Welfare, Seoul, Korea. p 50.
2. Chua SC, Leibel RL. 1996. Obesity genes: Molecular and metabolic mechanisms. *Diabetes* 5: 2-7.
3. Berger J, Moller DE. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53: 409-435.
4. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109: 1125-1131.
5. Ramji DP, Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365: 561-575.
6. Spiegelman BM, Flier JS. 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87: 377-389.
7. Kim DJ, Kwon CK, Choi DJ, Ka KH, Kim TM, Kim BT, Lee BK, Hwang JH, Ann ES, Kim DY. 2009. Effect of nutritional education and exercise intervention on improvement of diet intakes and metabolic risk factors in obese middle aged women. *Korean J Exerc Nutr* 13: 179-184.
8. Ahn IS, Park KY, Do MS. 2007. Weight control mechanisms and antiobesity functional agents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 503-513.
9. Mason EE. 1992. Methods for voluntary weight loss and control. *Obes Surg* 2: 275-276.
10. Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
11. Bray GA, Tartaglia LA. 2000. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* 404: 672-677.
12. Apfelbaum M, Vague P, Ziegler O, Hanotin C, Thomas F, Leutenegger E. 1999. Long-term maintenance of weight loss after a very-low-calorie diet: a randomized blinded trial of

- the efficacy and tolerability of sibutramine. *Am J Med* 106: 179-184.
13. Yum KS. 2001. Orlistat (XenicalR). *Korean J Obes* 10: 25-36.
 14. Padwal RS, Majumdar SR. 2007. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet* 369: 71-77.
 15. Zhi J, Moore R, Kanitra L, Mulligan TE. 2003. Effects of orlistat, a lipase inhibitor, on the pharmacokinetics of three highly lipophilic drugs (amiodarone, fluoxetine, and simvastatin) in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 43: 428-435.
 16. Cercato C, Roizenblatt VA, Leança CC, Segal A, Lopes Filho AP, Mancini MC, Halpern A. 2009. A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of diethylpropion in the treatment of obese subjects. *Int J Obes* 33: 857-865.
 17. Critchfield WB, Little EL Jr. 1996. *Geographic distribution of the pines of the world*. Forest Service, US Department of Agriculture, Washington, DC, USA. p 4.
 18. Lee SS, Choe YJ, Choe DH, Hong IP. 2003. Extractives of *Pinus koraiensis* wood. *J Korean Wood Sci Technol* 31: 48-49.
 19. Caldefie-Chézet F, Guerry M, Chalchat JC, Fusillier C, Vasson MP, Guillot J. 2004. Anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radic Res* 38: 805-811.
 20. Hwang HJ, Yu JS, Lee HY, Kwon DJ, Han W, Heo SI, Kim SY. 2014. Evaluations on deodorization effect and anti-oral microbial activity of essential oil from *Pinus koraiensis*. *Korean J Plant Res* 27: 1-10.
 21. Ju YW, Lee MY, Woo MJ, Byun SY. 2005. The current status of supercritical fluid extraction technology and industrial application. *Kor J Biotechnol Bioeng* 20: 239-337.
 22. Ju YW, Kang MH. 2005. Production of functional sesame oil by supercritical fluid extraction. *Food Industry and Nutrition* 10(3): 22-29.
 23. Park PJ, Kim CW, Cho SY, Rha CS, Seo DB, Lee SJ. 2010. Aqueous spray-dried green tea extract regulates body weight and epididymal fat accumulation in mice. *Korean J Food Sci Technol* 42: 103-108.
 24. Green A, Rumberger JM, Stuart CA, Ruhoff MS. 2004. Stimulation of lipolysis by tumor necrosis factor- α in 3T3-L1 adipocytes is glucose dependent: implications for long-term regulation of lipolysis. *Diabetes* 53: 74-81.
 25. Lee JS, Lee MK, Ha YT, Bok SH, Park HM, Jeong KS, Woo MN, Do GM, Yeo JY, Choi MS. 2006. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppressed body weight gain in rats fed high-fat diet. *Food Chem Toxicol* 44: 1875-1883.
 26. Imano H, Noda H, Kitamura A, Sato S, Kiyama M, Sankai T, Ohira T, Nakamura M, Yamagishi K, Ikeda A, Shimamoto T, Iso H. 2011. Low-density lipoprotein cholesterol and risk of coronary heart disease among Japanese men and women: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Prev Med* 52: 381-386.
 27. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 62: 707-716.
 28. Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. 1992. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta* 1127: 141-146.
 29. Dallas C, Gerbi A, Tenca G, Juchaux F, Bernard FX. 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.
 30. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2: 236-240.
 31. Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. 1992. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 29: 243-268.
 32. Ronnett GV, Kim EK, Landree LE, Tu Y. 2005. Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. *Physiol Behav* 85: 25-35.