

Leptin 유전자 결핍 동물모델을 이용한 시네트롤(Sinetrol-XPur)의 항비만 효과와 cAMP를 통한 UCP-2 활성화 기전 연구

유재명¹ · 이민희¹ · 권한을¹ · 최세규² · 배문형² · 김옥경³

¹경희대학교 동서의학대학원

²(주)알피코프

³전남대학교 식품영양과학부

Effects of Sinetrol-XPur on Leptin-Deficient Obese Mice and Activation of cAMP-Dependent UCP-2

Jae Myeong Yoo¹, Minhee Lee¹, Han Ol Kwon¹, Sei Gyu Choi²,
Mun Hyoung Bae², and Ok-Kyung Kim³

¹Graduate School of East-West Science, Kyung Hee University

²RP Corp Co., Ltd.

³Division of Food and Nutritional Science, Chonnam National University

ABSTRACT The present study investigated the effect of Sinetrol-XPur (polyphenolic *Citrus* spp. and *Paullinia cupana* Kunth dry extract) and defined the action mode for cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent uncoupling protein (UCP)-2 activation. Leptin-deficient obese mice were treated with two different doses, 100 mg/kg body weight (BW) and 300 mg/kg BW of each AIN93G supplement, for 7 weeks. Treatment of obese mice with both low and high doses of Sinetrol-XPur significantly reduced body weight gain compared to control obese mice. White adipose tissue weight of mice was reduced by 30.96% in high dose-supplemented groups. Serum total cholesterol and triglyceride were reduced by a high dose of Sinetrol-XPur by 20.02% and 30.96%, respectively. Serum level of high density lipoprotein (HDL) was significantly increased by treatment with both doses, as the ratio of HDL to low density lipoprotein increased by 138.78% and 171.49%, respectively. Regarding expression of biochemical factors related to lipid metabolism, fatty acid synthase significantly decreased and UCP-2 increased upon treatment with a high dose of Sinetrol-XPur, but there was no significant difference in lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase. To define cellular mechanism, intracellular cAMP levels in 3T3-L1 adipocytes significantly increased in a dose-dependent manner over the range of 50~250 µg/mL. The phosphodiesterase (PDE) inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine clearly blocked cAMP, suggesting that Sinetrol-XPur promotes lipolysis of adipocytes through inhibition of cAMP-dependent PDE, resulting in induction of cAMP response element binding protein and UCP-2. These results suggest that Sinetrol-XPur supplementation is a viable option for reducing body weight and fat by improving serum lipid profiles and genetic expression of lipid metabolic factors, especially activation of cAMP-dependent UCP-2.

Key words: anti-obesity, Sinetrol-XPur, citrus, ob/ob mice

서 론

비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형, 정신적 문제, 유전적인 원인 및 내분비장애 등으로 인한 체지방의 축적이 주된 원인으로 알려졌다. 이러한 비만은 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환 및 고혈압 등과 같은 만성 퇴행성 질환을 일으키는 것으로 알려졌다(1-3). 비만은 생리적으로 여러 인자가 관

여하고 있다. 생화학적 인자로는 triglyceride, high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein(LDL) 등이 있고 세포 내적 인자로는 fatty acid synthase(FAS), uncoupling protein-2(UCP-2), hormone-sensitive lipase (HSL) 등이 있다. 특히, UCP-2와 HSL은 세포 내 cAMP 농도와 관련되어 phosphodiesterase(PDE)와 protein kinase A(PKA) 활성화를 통해 조절 받는 것으로 알려졌다(4,5). 이러한 기전을 통해 비만을 예방하고 치료할 수 있으면서 부작용을 일으키지 않는 천연성분을 이용한 기능성 식품 소재에 관한 연구가 진행되고 있다(6).

플라보노이드는 폴리페놀 생리활성 성분 중 중요도가 높아 연구가 가장 많이 되어 있는 것으로, anthocyanin(malvi-

Received 21 December 2015; Accepted 6 January 2016

Corresponding author: Ok-Kyung Kim, Division of Food and Nutritional Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

E-mail: 20woskxm@chonnam.ac.kr, Phone: +82-62-530-1318

din, cyanidin; red orange, blueberries and wine), flavanone(naringin, hesperidin, narirutin, etc.; orange, grapefruit), flavonols(querعتetin, kaempferol; onions, broccoli) 등을 포함하고 있다(7). 또한, 플라보노이드는 염증성 질환, 심혈관 질환, 뇌혈관 질환 등과 같은 질병 예방에 유익한 효능이 있는 것으로 밝혀져 있고, cAMP-PDE의 억제제를 통해 lipolytic activity를 증가시켜 다이어트 급원으로 각광받고 있다(8-10). 시네트롤(Sinetrol-XPur)은 red orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), sweet orange(*Citrus sinensis* L. Osbeck), 자몽(*Citrus paradisi* Macfad), 파라나(*Paullinia cupana* Kunth)의 추출물을 혼합한 것으로 주요 성분은 anthocyanins과 flavanone 등과 같은 플라보노이드를 포함한다(11). 따라서 여러 가지의 플라보노이드계 생리활성물질을 포함하는 시네트롤 역시 PDE의 억제제를 통해 체중감소뿐만 아니라 체지방 감소, 허리둘레가 감소하였다는 인체 연구가 보고된 바 있다(12).

1949년 Jackson Laboratory에서 처음 발견된 C57BL/6J-ob/ob mice는 leptin encoding gene을 유전적으로 변형시킨 동물로 주로 당뇨, 비만, 대사 기전의 연구에 사용된다(12,13). Leptin은 지방세포에서 생산되는 신호전달 단백질로 melanocortin, neuropeptide Y(NPY), agouti-related peptide(AgRP) 등 anorexigenic peptide 유전자 발현을 조절하며, 간에서 lipolysis와 lipogenesis, 체중 및 식품 섭취를 조절한다(12,14). ob/ob mice는 식품 섭취 및 생물학적 기전에 의한 비만 개선 연구에 널리 사용됐으나 아직 근본적인 비만 치료 방법은 밝혀지지 않았다(15).

본 연구에서는 이전 연구의 자료를 토대로 *in vivo*를 통해 유전성 비만 마우스에 시네트롤을 식이로 제공하여 체중과 혈액 지표들의 변화를 알아보고, *ex vivo*를 통해 지방조직에서 비만 관련 유전자의 변화를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료준비

시네트롤(Sinetrol-XPur)은 (주)알피코프(Seoul, Korea; 프랑스의 Fytexia 원료)로부터 분말 형태로 공급받아 실험에 사용하였다. 동물 식이에 사용된 시네트롤 식이는 주문시 분말 형태 그대로 첨가하여 사용하도록 하였다.

실험동물

동물실험은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 심의(승인번호 KHUASP(SE)-15-019)를 거친 후 진행하였다. 실험동물은 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea) 사육장에서부터 생후 5주령의 수컷 C57BL/6J ob/ob male mice(n=18), C57BL/6J male mice(n=6)를 구입하여 일주일 동안 설치류 사육실에서 일반식이(AIN93G)를 공급하며 적응시킨 후 적응기간에 일반상태를 관찰하여 건강한 개체를 무작위법으로 군 분리를 하였다. 실험군의 분류는 정상대조군(Lean), 유

전성 비만 시험대조군(Obese), 시네트롤 100 mg/kg BW (Sinetrol low, 식이의 0.09%), 시네트롤 300 mg/kg BW (Sinetrol high, 식이의 0.27%), 총 4군으로 6마리씩 4군으로 분류하여 7주간 사육이 진행되었다. 사육환경은 온도 23±3°C, 습도 50±5%에서 light cycle이 12시간 유지되었다.

식이 및 급여

시네트롤(Sinetrol-XPur)의 항비만 효과를 관찰하기 위해 시네트롤이 첨가된 식이를 제공하고 관찰하였다. 시네트롤은 AIN93G 식이에 첨가하여 시료를 제조하여 사용하였고, 식이 농도는 사전연구(11)의 농도를 토대로 안전계수를 고려하여 정하였다. 실험 기간 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 식이효율(food efficiency ratio; FER)은 실험식이 공급일로부터 희생일까지 총 실험 기간의 식이섭취량을 나누어 산출하였다.

조직 분석

채혈 후 즉시 개복하여 간 및 지방조직(백색지방: 복부지방, 내장지방, 부고환지방; 갈색지방)을 적출한 다음 생리식염수로 씻어 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 triglyceride(TG), total cholesterol(TC), 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)

시네트롤(Sinetrol-XPur)의 섭취에 따른 지방 대사 관련 유전자의 발현을 확인하기 위해 real-time PCR을 실시하였다. 지방조직을 적출하여 RNeasy[®] Lipid Tissue Mini kit (Qiagen Sciences, 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 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였다. Real-time PCR 반응은 총 20 µL 내에 cDNA 2 µL와 2× SYBR mix 10 µL, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/µL

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

Gene	Primer sequences
FAS	F 5'-GAAGTGTCTGGACTGTGTCATTTTAC-3' R 5'-TTAATTGTGGGATCAGGAGAGCAT-3'
LPL	F 5'-CAAGATTCACCTTTTCTGGGACTGA-3' R 5'-GCCACTGTGCCGTACAGAGA-3'
HSL	F 5'-CACTAGTCCCTCCCCAGTTT-3' R 5'-AGCTGGCACAGCAGGTCTGT-3'
UCP-2	F 5'-GCCCTTACCTCTTTAGCA-3' R 5'-CCAAGCACTGGGAAGGTCTAA-3'
GAPDH	F 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3' R 5'-GCGGCACGRCAGATCCA-3'

를 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.

3T3-L1 세포배양과 분화 및 시네트롤 처리

3T3-L1 preadipocyte를 10% newborn calf serum (NCS)과 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% hepes, 1% NEAA mixture를 함유한 high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 2일마다 배양액을 교환하였고 세포가 단일층으로 플라스크 바닥에 70% 이상 부착하면 PBS 용액을 사용하여 세포표면을 씻었으며, 0.25% trypsin-EDTA를 첨가한 뒤 배양기에서 3분간 방치하여 세포를 분리하였다. 그 후 원심분리기(GYROZEN 416G, BMS, Seoul, Korea)를 사용하여 1,600 rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 모았다. 이들 세포를 6 well plate(TPP)에 5×10^5 cells/well이 되게끔 균등하게 분주하였고, 100% confluent 상태인 4일 후 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% sodium pyruvate, 1% hepes, 1% NEAA mixture를 함유한 high-glucose DMEM에 adipogenic cocktail[MDI solution인 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx, 0.5 mM), insulin(5 μ g/mL), dexamethasone(DEX, 0.25 μ M)]을 혼합하여 분화 유도를 시작하였다. 분화 기간은 총 9일간 지속하였으며, 분화 초기 3일 동안 매일 같은 배양액을 교환해 주었다. 분화 중기 3일 동안 배양액을 insulin(5 μ g/mL)만을 포함하는 10% FBS를 함유한 DMEM으로 교환하여 매일 교환해 주었고, 분화 후기 3일 동안은 10% FBS를 함유한 DMEM 배양액으로 매일 교환해 주었다. 지방 분화 후(10일째) 시네트롤

(Sinetrol-XPur)을 24시간 동안 50, 100, 250 μ g/mL로 처리하였다.

세포 내 cAMP 수준 측정 및 UCP-2 유전자 발현 측정

시네트롤(Sinetrol-XPur) 처리 시 cAMP 변화를 확인하기 위해 cAMP Direct Immunoassay kit(Abcam, Cambridge, MA, USA)으로 제조사의 protocol에 따라 측정하였다. 1 M HCl을 첨가하여 cAMP 수준을 iMARK™ Microplate Reader(Bio-Rad Laboratories Inc.)를 이용하여 450 nm 파장에서 optical density를 측정하였다. 또한 시네트롤 처리 시 UCP-2 유전자 발현을 확인하기 위해 real-time PCR을 실시하였다. 유전자 서열은 Table 1에 나타내었다.

통계처리

본 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) version 20 프로그램을 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.

결 과

시네트롤 섭취에 따른 실험동물의 체중증가, 간 및 지방조직 무게 변화

시네트롤이 실험동물의 체중 변화, 간 및 지방조직 무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 측정된 결과(Table 2), 실험동물의 체중증가는 정상대조군(Lean; 12.67 ± 1.29 g)보다 유전성 비만군(Obese, 20.23 ± 2.38 g; Sinetrol low, 16.75 ± 2.07 g; Sinetrol high, 14.92 ± 1.88 g)의 체중이 유의적으로 증가하여 비만이 유도되었음을 확인하였다. 유전성 비만 시혜대조군(Obese)에 비해 시네트롤 100 mg/kg BW(Sinetrol low), 시네트롤 300 mg/kg BW(Sinetrol high)에서 각각 17.18%, 26.23% 유의적으로 감소하였다.

간 무게변화량은 Lean군과 유전성 비만군 간에 유의적인 차이가 나타났는데 Obese군에 비해 Sinetrol low군과 Sinetrol high군에서 각각 15.70%, 30.96% 감소하였으나, Sinetrol low군은 Obese군과 유의적인 차이가 없었고 Sinetrol high군은 Obese군과 유의적인 차이가 나타났다.

지방조직 무게는 백색지방과 갈색지방으로 나누어 측정하였다. 백색지방 무게변화량은 Lean군보다 유전성 비만군에서 유의적으로 높았는데 Obese군에 비해 Sinetrol low군과 Sinetrol high군에서 각각 18.29%, 41.06% 감소하였다. 따라서 Sinetrol high군에서만 Obese군과 유의적인 차이가 나타났다. 갈색지방 무게변화량은 Lean군보다 유전성 비만군에서 유의적으로 높았고, Obese군에 비해 Sinetrol low

Table 2. Effect of Sinetrol-XPur on body weight gain and tissue weight in obese mice

	Lean	Obese	Sinetrol low	Sinetrol high
Weight gain (g)	12.67±1.29 ^c	20.23±2.38 ^a	16.75±2.07 ^b	14.92±1.88 ^b
Tissue weight (g)				
Liver	1.09±0.06 ^c	3.53±0.86 ^a	2.97±0.68 ^{ab}	2.44±0.21 ^b
White adipose tissue	3.55±0.99 ^c	13.75±1.24 ^a	11.23±2.55 ^a	8.10±2.24 ^b
Brown adipose tissue	0.25±0.02 ^b	0.31±0.06 ^a	0.36±0.06 ^a	0.31±0.12 ^a

All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range test after one-way ANOVA and using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Sinetrol low: Obese+Sinetrol 100 mg/kg BW, Sinetrol high: Obese+Sinetrol 300 mg/kg BW.

군과 Sinetrol high군에서 각각 115.61%, 100.14% 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 따라서 시네트롤의 섭취가 지방의 축적을 억제하고 체중을 감소시키는 효과가 있는 것으로 보인다.

시네트롤 섭취에 따른 혈청 지질 함량 측정

시네트롤의 섭취가 실험동물의 혈청 지질 함량에 미치는 영향을 알아보기 위해 TC, TG, HDL-콜레스테롤, LDL/VLDL-콜레스테롤을 측정하였다(Fig. 1). TC 함량(Fig. 1A)은 정상대조군(Lean)보다 유전성 비만군(Obese, Sinetrol low, Sinetrol high)에서 유의적으로 증가하였고, Obese군에 비해 Sinetrol low군과 Sinetrol high군에서 각각 14.77%, 20.02% 유의적으로 감소하였다. TG 함량(Fig. 1B) 역시 Lean군보다 유전성 비만군이 유의적으로 높았다. Sinetrol low군과 Sinetrol high군은 Obese군에 비해 각각 15.70%, 30.96% 유의적으로 감소하였다. HDL-콜레스테롤 함량(Fig. 1C)은 Lean군과 유전성 비만군 간에 유의적인 차이는 나타났으나, Obese군과 시네트롤군 간에 유의적인

차이는 나타나지 않았다. LDL/VLDL-콜레스테롤 함량(Fig. 1D)은 Lean군보다 유전성 비만군에서 유의적으로 높게 나타났고, Obese군에 비해 Sinetrol low군과 Sinetrol high군에서 각각 20.36%, 32.9% 감소하였으나, Sinetrol low군은 유의적인 차이가 나타나지 않았고 Sinetrol high군은 유의적인 차이가 나타났다. HDL/LDL ratio(Fig. 1E)를 계산한 결과, Lean군이 유의적으로 가장 높았고(0.87±0.07) Obese군이 유의적으로 가장 낮게 나타났(0.37±0.21). Sinetrol low군과 Sinetrol high군은 0.51±0.05, 0.63±0.11로, Obese군에 비해 각각 138.78%, 171.49% 유의적으로 증가하였다. 따라서 시네트롤의 섭취가 혈청 지질의 함량을 개선하는 것으로 보인다.

시네트롤 섭취에 따른 지방조직 내 유전자 발현 측정

시네트롤의 섭취가 실험동물의 지방조직 내 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 FAS, lipoprotein lipase (LPL), HSL, 그리고 UCP-2를 측정하였다(Fig. 2, 3). FAS 발현 정도는 유전성 비만군에서 Lean군보다 유의적으로 높

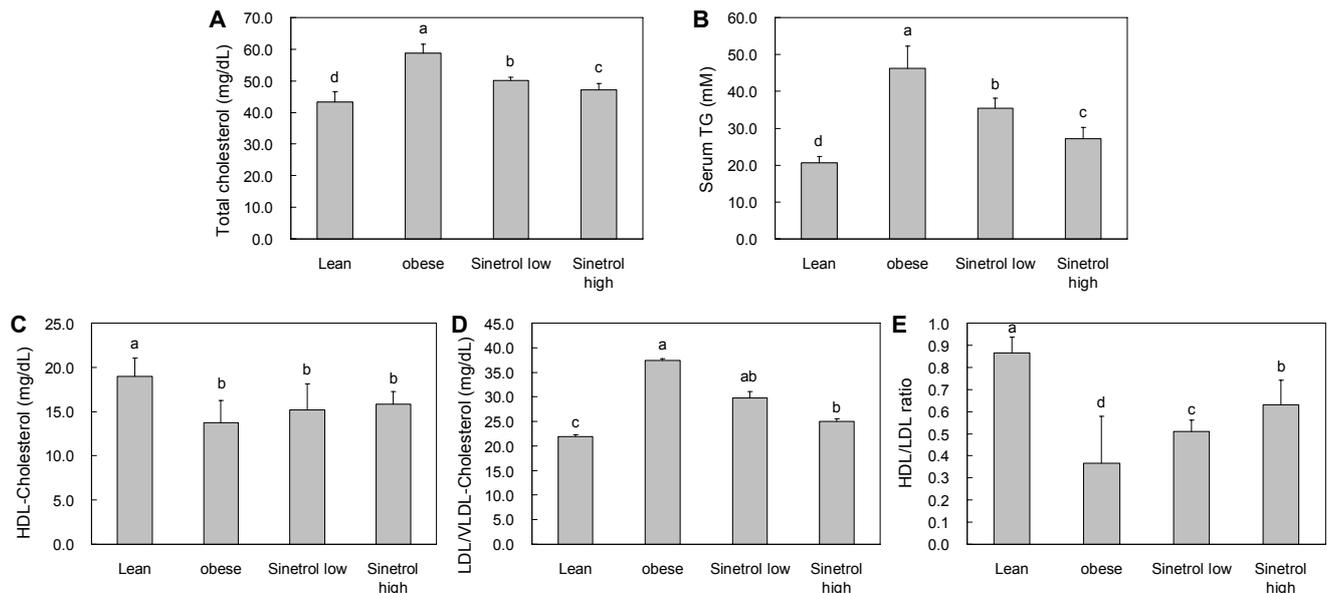


Fig. 1. Effect of Sinetrol-XPur on lipid profiles in obese mice. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range test after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Sinetrol low: Obese+Sinetrol 100 mg/kg BW, Sinetrol high: Obese+Sinetrol 300 mg/kg BW. (A) Total cholesterol, (B) Serum triglyceride, (C) HDL-cholesterol, (D) LDL/VLDL-cholesterol, (E) HDL/LDL ratio.

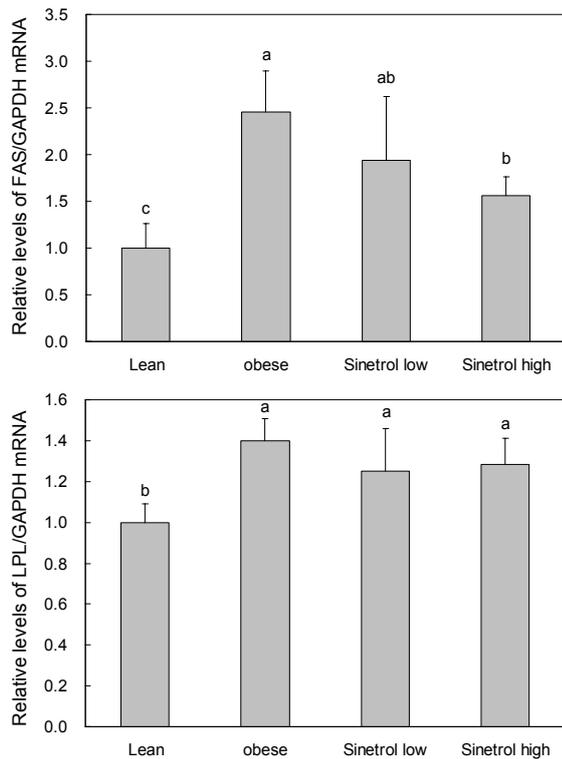


Fig. 2. Effect of Sinetrol-XPur on expression of fatty acid synthase (FAS) and lipoprotein lipase (LPL) in obese mice. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range test after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Sinetrol low: Obese+Sinetrol 100 mg/kg BW, Sinetrol high: Obese+Sinetrol 300 mg/kg BW.

왔고 Obese군에 비해 Sinetrol low군과 Sinetrol high군에서 각각 21.35%, 36.69% 감소하였으나, Sinetrol low군은 Obese군과 유의적인 차이가 없었고 Sinetrol high군은 Obese군과 유의적인 차이가 나타났다. LPL 발현 정도는 Lean군에 비해 유전성 비만군에서 유의적으로 높았고, Obese군과 시네트롤군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. HSL 발현 정도는 유전성 비만군에서 Lean군보다 유의적으로 높았고, Obese군에 비해 Sinetrol low군과 Sinetrol high군에서 각각 2.73%, 1.07% 감소하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. UCP-2 발현 정도는 Lean군이 유전성 비만군보다 유의적으로 가장 낮았고, Sinetrol low군과 Sinetrol high군은 Obese군에 비해 각각 113.10%, 128.86% 증가하였다. 특히, Sinetrol low군은 Obese군과 유의적인 차이가 없었지만 Sinetrol high군은 Obese군에 비해 유의적인 차이가 나타났다.

세포 내 cAMP 수준 및 UCP-2 유전자 발현

3T3-L1에 시네트롤 및 inhibitor 유무에 따른 cAMP 수준과 UCP-2 유전자 발현을 측정하였다(Fig. 4, 5). 3T3-L1에 시네트롤만을 처리한 후 cAMP 수준을 측정할 결과 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였고, 증가한 cAMP

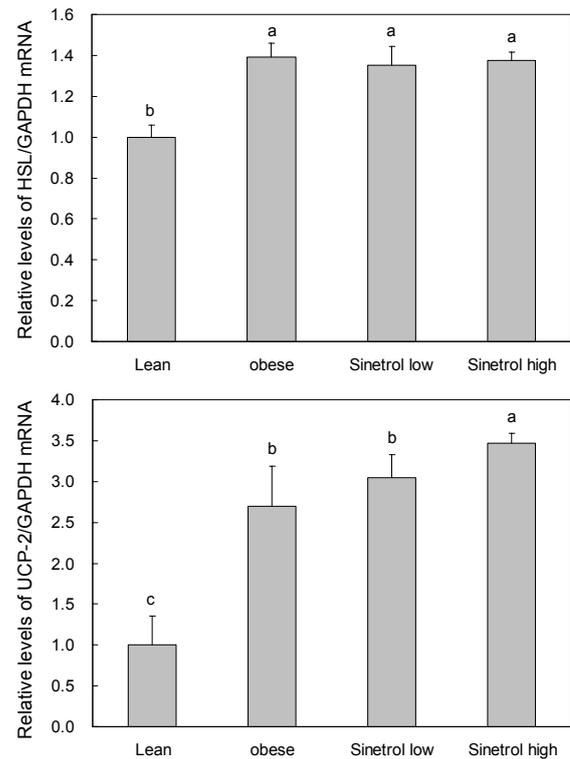


Fig. 3. Effect of Sinetrol-XPur on expression of hormone-sensitive lipase (HSL) and UCP-2 in obese mice. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range test after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$. Sinetrol low: Obese+Sinetrol 100 mg/kg BW, Sinetrol high: Obese+Sinetrol 300 mg/kg BW.

가 PDE에 영향을 받는지 알아보려고 비특이적 PDE inhibitor인 IBMX와 시네트롤을 처리한 결과, IBMX만을 처리한 대조군에 비해 시네트롤을 함께 처리한 군에서 cAMP가 증가하는 것을 확인하였다. UCP-2 유전자 발현을 측정할 결과 시네트롤만을 처리한 군에서 UCP-2의 발현이 아무것도 처리하지 않은 군(100.0±7.9%)에 비해 유의적으로 증가한 반면, cAMP response element binding protein(CREB)의 inhibitor인 cyclosporin A/FK506을 시네트롤과 함께 처리한 군에서는 inhibitor만을 처리한 군(10.2±3.3%)에 비해 유의적으로 증가하는 하였으나, 같은 농도로 시네트롤만을 처리한 군에 비해 유의적으로 감소하였음을 확인하였다.

고 찰

비만은 단순한 외형적인 문제뿐만 아니라 건강상으로 심각한 문제를 일으켜 세계적으로도 큰 문제가 되고 있다. 소비되고 남은 에너지가 지방으로 축적되고, 축적된 지방은 간의 지질대사에 문제를 초래하여 간의 중성지질 및 콜레스테롤의 함량을 증가시키며, 간 무게 역시 증가한다(16,17). 본 연구에서 시네트롤 섭취군은 비만 대조군 대비 간의 무게와 백색지방의 무게가 감소한 것을 확인하였다. 따라서 시네

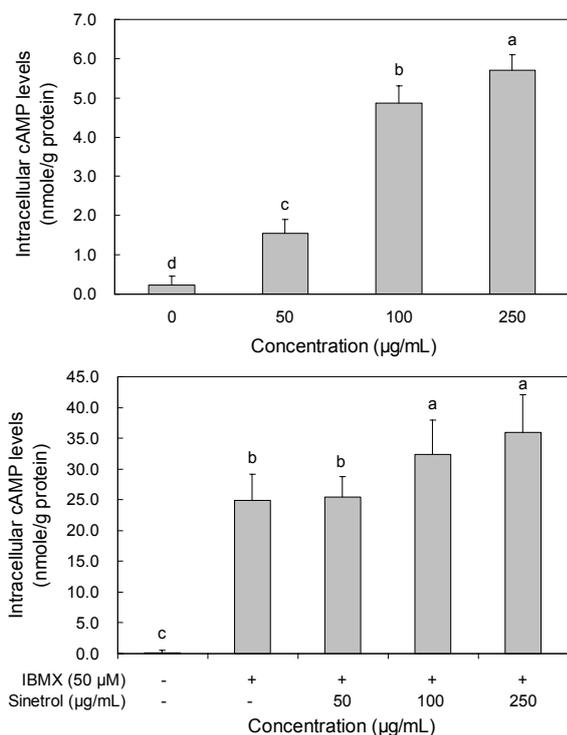


Fig. 4. Effect of Sinetrol-XPur on intracellular cAMP levels in 3T3-L1 cells. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range test after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

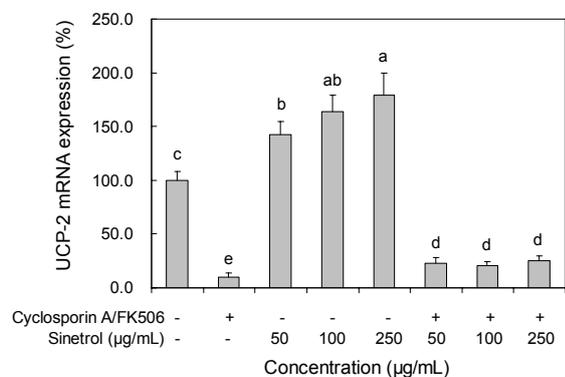


Fig. 5. Effect of Sinetrol-XPur on expression of UCP-2 gene in 3T3-L1 cells. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range test after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

트롤 추출물이 지방의 축적을 억제하여 비만 및 비만 관련 질환에 효과가 있을 것으로 생각한다. 지질은 호르몬, 담즙, 세포막의 주요 성분이지만, 혈중 지질 함량이 높으면 심혈관계질환 등 다양한 질병의 위험도를 높이는 것으로 알려졌다(18). 또한 LDL 콜레스테롤은 간에서 다른 조직으로 콜레스테롤을 운반하고, 콜레스테롤을 체내에 축적하여 심혈관계질환에 중요한 biomarker이다(19). 선행연구들에서 플라보노이드의 섭취는 LDL oxidation을 억제하여 심혈관 질환을

예방한다고 알려졌으며, 천연 hesperidin 및 그 대사물의 투여가 plasma 콜레스테롤과 TG의 함량을 유의적으로 낮추고, acyl-CoA와 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시켜 콜레스테롤 합성을 감소하는 것으로 보고되었다(20,21). 본 연구에서 사용된 시네티롤 또한 플라보노이드가 다량 함유되어 있으므로 이와 같은 작용으로 혈중 지질 함량들이 개선되었을 것으로 생각한다.

지방 합성은 malonyl-CoA와 acetyl-CoA의 축합반응으로 긴 사슬 지방산의 합성 반응을 촉매하는 FAS와 monoacylglycerol과 지방산을 가수분해하고 과잉의 에너지를 지방세포에 중성지방 형태로 저장하는 LPL이 중요한 효소로 작용한다(22-24). 본 연구에서는 Obese군이 Lean군에 비해 FAS와 LPL의 발현이 증가했지만, 시네티롤 섭취군에서는 FAS와 LPL의 발현이 감소하였고 지방 합성 또는 지방의 축적이 감소하였음을 의미한다.

지방 분해는 cAMP cascade를 통해 매개되고, 증가한 cAMP는 HSL을 활성화하는데, HSL은 중성지방이 지방산과 glycerol로 가수분해될 때 관련된 효소이다(25,26). 또한, cAMP는 PDE inhibition에 의해 증가하고 증가한 cAMP는 PKA를 활성화하고, 활성화된 PKA는 CREB를 활성화한다. 그리고 활성화된 CREB는 지방세포의 핵 내로 translocation 되고 UCP-2 유전자의 TATA box에 부착되어 UCP-2의 유전자 발현을 증가시킨다(27-29). UCP-2는 백색지방세포뿐만 아니라 갈색지방세포를 포함한 골격근, 간, 췌장, 대식세포, 폐 등 여러 조직에 존재하며, β -2,3 아드레날린성 수용체와 직접적인 관련성이 있고 에너지 대사를 조절하는 것으로 알려졌다(30,31). UCP-2의 발현이 증가했다는 것은 에너지 소비가 증가한 것을 의미하기도 한다(32). 본 연구에서 시네티롤을 분화된 지방세포에 처리 시 cAMP가 증가하였음을 확인하였고, PDE에 의해 cAMP가 증가하였는지 확인하기 위해 PDE를 비특이적으로 inhibition 하는 IBMX를 처리한 결과, cAMP가 증가하는 것을 확인하였고 IBMX와 시네티롤을 함께 처리 시 cAMP가 더욱더 증가하는 것을 확인하였다. Cyclosporin A/FK506에 의해 CREB가 inhibition 되어 UCP-2의 발현이 감소하였으나, 시네티롤을 함께 처리 시 UCP-2의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 시네티롤이 PDE를 억제하여 cAMP를 증가시켰으며, 증가한 cAMP가 CREB를 활성화하고 UCP-2 발현을 증가시켜 에너지 소비를 증가시킨 것으로 생각한다. 그러나 본 연구의 지방 분해와 관련된 결과 중 HSL은 변화가 없었는데, 이는 시네티롤의 섭취가 HSL과 관련된 기전이 아닌 UCP-2와 관련된 기전에 더 많이 관여하는 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 시네티롤(Sinetrol-XPur)을 유전성 비만 마우스(Obese)에 7주간 식이 투여하여 항비만 효과를 알아보

고자 하였다. 시네트롤을 섭취한 유전성 비만 마우스군 (Sinetrol low와 Sinetrol high)의 체중증가량은 Obese군에 비하여 유의적으로 감소하였고, 간 무게변화량은 Sinetrol high군에서 Obese군보다 유의적으로 감소하였다. 백색지방의 무게변화량은 Sinetrol high군에서 Obese군보다 유의적으로 감소하였음을 확인하였다. 실험동물의 혈청 지질 함량은 TC, TG, LDL/VLDL-콜레스테롤이 Obese군에 비해 Sinetrol군에서 감소하였고, HDL-콜레스테롤은 유전성 비만군(Obese, Sinetrol low, Sinetrol high) 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. HDL/LDL ratio를 계산한 결과에서는 Sinetrol군에서 Obese군보다 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. 실험동물군의 지방조직에서 비만 관련 유전자들의 발현을 측정된 결과, FAS와 LPL의 발현은 Obese군보다 Sinetrol군에서 감소하였고 HSL의 발현은 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, UCP-2의 발현은 Obese군에 비해 Sinetrol high군에서 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. 또한 세포 내 cAMP를 측정된 결과 시네트롤 처리 시 농도 의존적으로 cAMP가 증가하였음을 확인하였고, 증가한 cAMP에 의해 UCP-2의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 시네트롤이 지방 합성과 관련된 유전자 발현의 억제 및 에너지 소비와 관련된 유전자의 발현을 증가시키고 체내 지방의 축적이나 합성을 감소시켜 체중의 증가를 예방하며, 혈중 지질 함량들을 개선하여 항비만 효과가 있는 천연 기능성 식품으로 활용할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

REFERENCES

1. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. 1996. Obese, a new mutation in the house mouse. *Obes Res* 4: 101.
2. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
3. Inui A. 2001. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2: 551-560.
4. Xiong Y, Qu Z, Chen N, Gong H, Song M, Chen X, Du J, Xu C. 2014. The local corticotropin-releasing hormone receptor 2 signalling pathway partly mediates hypoxia-induced increases in lipolysis via the cAMP-protein kinase A signalling pathway in white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 392: 106-114.
5. Aubert J, Champigny O, Saint-Marc P, Negrel R, Collins S, Ricquier D, Ailhaud G. 1997. Up-regulation of UCP-2 gene expression by PPAR agonists in preadipose and adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 606-611.
6. Cho YS, Jang EM, Jang SM, Chun MS, Shon MY, Kim MJ, Lee MK. 2007. Effect of grape seed water extract on lipid metabolism and erythrocyte antioxidant defense system in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1537-1543.
7. Chen D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L, Wang Z, Wan SB, Lam WH, Chan TH, Dou QP. 2004. Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Front Biosci* 9: 2618-2631.
8. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341: 454-457.
9. Kuppasamy UR, Das NP. 1992. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 44: 1307-1315.
10. Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643.
11. Dallas C, Gerbi A, Elbez Y, Caillard P, Zamaria N, Cloarec M. 2014. Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals. *Phytother Res* 28: 212-218.
12. 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.
13. Chae MH, No JG, Jhon DY. 2007. Hangbisan sulfur-based oriental medicine, lowers the blood cholesterol level of *ob/ob* obese mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 27-31.
14. Chua S, Leibel RL. 1997. Obesity genes: Molecular and metabolic mechanism. *Diabetes Rev* 5: 2-7.
15. Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
16. Kim AR, Hwang YG, Lee JJ, Jung HO, Lee MY. 2011. Effects of *Eriobotrya japonica* Lindl. (loquat) leaf ethanol extract on cholesterol and antioxidative activity in rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 673-681.
17. Park PJ, Kim CW, Cho SY, Pha 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.
18. Lee JS, Lee MK, Ha TY, Bok SH, Park HM, Jeong KS, Woo MN, Do GM, Yeo JY, Choi MS. 2006. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppresses body weight gain in rats fed high-fat diet. *Food Chem Toxicol* 44: 1875-1883.
19. 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.
20. Cook NC, Samman S. 1996. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-76.
21. Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS. 2003. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim Acta* 327: 129-137.
22. Ronnett GV, Kim EK, Landree LE, Tu Y. 2005. Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. *Physiol Behav* 85: 25-35.
23. Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. 1992. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 29: 243-268.
24. Lee JJ, Chung CS, Kim JG, Choi BD. 2000. Effects of fasting-refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase activity and lipogenesis: influence of food restriction during refeeding. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 471-478.
25. Langin D, Holm C, Lafontan M. 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc*

- Nutr Soc* 55: 93-109.
26. Steinberg D, Khoo JC. 1977. Hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *Fed Proc* 36: 1986-1990.
 27. Conti AC, Blendy JA. 2004. Regulation of antidepressant activity by cAMP response element binding proteins. *Mol Neurobiol* 30: 143-155.
 28. Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. 2004. What turns CREB on?. *Cell Signal* 16: 1211-1227.
 29. Puigserver P, Herron D, Gianotti M, Palou A, Cannon B, Nedergaard J. 1992. Induction and degradation of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a rapidly degradable pool. *Biochem J* 284: 393-398.
 30. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. 1997. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 79-82.
 31. Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. 1997. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β 3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 272: 24129-24132.
 32. Yanovski JA, Diament AL, Sovik KN, Nguyen TT, Li H, Sebring NG, Warden CH. 2000. Associations between uncoupling protein 2, body composition, and resting energy expenditure in lean and obese African American, Caucasian, and Asian children. *Am J Clin Nutr* 71: 1405-1420.