



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

진굴잎 유래 polymethoxyflavones  
분획물의 비만 개선 효과에 대한  
연구

제주대학교대학원

생물학과

진 영 준

2022년 02월

# 진쿨잎 유래 polymethoxyflavones 분획물의 비만 개선 효과에 대한 연구

지도교수 김 세 재

진 영 준

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2022년 02월

진영준의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장

백덕배



위 원

이선경



위 원

고희준



위 원

Hur, Suw-Myo



위 원

김세재



제주대학교 대학원

2022년 02월



Study on anti-obesity effects of  
polymethoxyflavones-rich fraction derived from  
*Citrus sunki* leaves

Yeong-Jun Jin  
(Supervised by professor Se-Jae Kim)

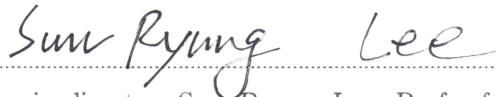
A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of Doctor of Science

2022. 02.

This thesis has been examined and approved.



Thesis director, Deok-Bae Park, Prof. of Medicine



Thesis director, Sun-Ryung Lee, Prof. of Biology



Thesis director, Hee-Chul Ko, Dr. Jeju Institute of Korean Medicine



Thesis director, Sung-Pyo Hur, Dr. Korea Institute of Ocean Science & Technology



Thesis director, Se-Jae Kim, Prof. of Biology

Feb. 2022

Date

Department of Biology  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



## ABSTRACT

Polymethoxyflavones (PMFs) are flavonoids exclusively found in citrus fruits. Among the native citrus plants cultivated in Jeju do, *Citrus sunki* Hort, ex Tanaka have the highest contents of PMFs. As PMFs have diverse health-beneficial bioactivities, it is necessary to develop a method to obtain the PMF-rich fraction (PRF) for research on their industrial application. In this study, PMF contents were compared between the fruits and leaves of *C. sunki*. The results showed approximately three-fold higher PMFs contents in the leaves than in the fruits, and thus, we established a procedure for obtaining the PRF from the leaves. Then, the anti-obesity effect of PRF was investigated *in vitro* and *in vivo*.

In this study, we used 3T3-L1 preadipocytes as *in vitro* model system. Upon simultaneous treatment with PRF and differentiation-inducing medium, PRF inhibited differentiation of preadipocytes into adipocytes in a concentration-dependent manner. PRF also inhibited the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPa), consequently reducing the expression of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), fatty acid synthase (FAS), and adipocyte fatty-acid-binding protein 2 (aP2). The treatment of differentiated 3T3-L1 adipocytes with PRF led to a decline in the expressions of PPAR $\gamma$ , as well as CEBPa, SREBP1, and FAS, which have a role in maintaining the adipocyte homeostasis. Protein kinase A (PKA)/sterol regulatory element-binding protein 1 (HSL) was activated to promote lipolysis. In addition, in differentiated 3T3-L1 adipocytes, PRF increased the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)/acetyl-CoA carboxylase (ACC) to promote fatty acid oxidation.

Based on the *in vitro* results, the anti-obesity effect of PRF in mice with high-fat-diet-induced obesity was evaluated. Five-week-old C57BL/6 male mice were supplied with a high-fat-diet (HFD) for five weeks to induce obesity. The HFD-fed obese mice were divided into three groups, the control group (HFD + 0.5% carboxymethyl cellulose), orlistat group (HFD + 15.6 mg orlistat/kg of BW), and PRF group (HFD + 50, 100, or 200 mg of PRF/kg of BW), for a 5-week oral administration period. The overall weight gain, adipose tissue weights, spleen weights, and kidney weights of the PRF and orlistat groups were significantly reduced compared to those in the controls. The PRF group exhibited lower contents of plasma triglycerides (TG) and plasma low-density lipoprotein (LDL-CHO) than the control group, whereas high-density lipoprotein (HDL-CHO) content was higher than the control group. These results suggested that PRF improves the dyslipidemia induced by the HFD. In addition, the PRF and orlistat groups exhibited an improvement in glucose tolerance compared to controls. Moreover, the PRF group exhibited a decrease in the level of insulin secretion in a concentration-dependent manner upon fasting, thereby insulin resistance estimated by homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) were improved.

A comparison of the hematoxylin and eosin-stained adipose tissue from each group showed that the size of lipid droplets was smaller in the PRF group than that in the HFD group. To identify the molecular mechanism on the anti-obesity effect of PRF, we analyzed the expressions of the proteins, which were related to lipolysis in the adipose tissues. The PRF administration reduced the expression of PPAR $\gamma$ , a factor required for the maintenance of adipose tissues. Furthermore, it increased the phosphorylation of HSL, which facilitates lipolysis. The PRF administration also activated the AMPK/ACC pathway to promote fatty acid oxidation. In addition, an analysis of the liver tissue of each group revealed that PRF potentially improved the liver function

as it inhibited the incidence of fatty liver caused by the HFD. In summary, this study has developed an efficient method to obtain PRF from *C. sunki* leaves, and the PRF was found to exert an anti-obesity effect via promoting the lipolysis and fatty acid oxidation both *in vitro* and *in vivo*.

Key words : *Citrus sunki*, Polymethoxyflavones, Anti-obesity, High-fat-diet, 3T3-L1, C57BL/6, Fatty acid oxidation, Lipolysis, Aipogenesis

# 목 차

|                              |      |
|------------------------------|------|
| A B S T R A C T .....        | i    |
| 목 차 .....                    | iv   |
| LIST OF TABLES .....         | vii  |
| LIST OF FIGURES .....        | viii |
| LIST OF ABBREVIATIONS .....  | xi   |
| <br>                         |      |
| I. 서 론 .....                 | 1    |
| <br>                         |      |
| II. 재료 및 방법 .....            | 10   |
| <br>                         |      |
| 1. 시료 채집 및 분획물 제조 .....      | 10   |
| 2. 3T3-L1 전지방세포 배양 .....     | 12   |
| 3. 세포 생존율 분석 .....           | 13   |
| 4. 세포 독성 분석 .....            | 13   |
| 5. 3T3-L1 지방세포 분화유도 .....    | 14   |
| 6. Oil Red O 염색 .....        | 14   |
| 7. Free glycerol 함량 측정 ..... | 15   |
| 8. 동물 실험 .....               | 15   |
| 9. Western blot 분석 .....     | 17   |



|  |           |
|--|-----------|
| 10. 통계 처리  | 18        |
| <b>Ⅲ. 결 과</b>                                      | <b>19</b> |
| 1. 진균 앞에서 분리한 PMFs 다량 함유 분획물(PRF)의 특성              | 19        |
| 2. PMFs 다량 함유 분획물(PRF)이 3T3-L1 전지방세포 분화에 미치는 영향    | 22        |
| 1) 지방분화 억제 효과                                      | 22        |
| 2) PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 발현 억제 효과         | 25        |
| 3. PMFs 다량 함유 분획물(PRF)이 3T3-L1 지방세포의 지방 대사에 미치는 영향 | 27        |
| 1) 중성지방 감소 효과                                      | 27        |
| 2) 지방분해 촉진 효과                                      | 31        |
| 3) 지방산화 촉진 효과                                      | 33        |
| 4. 고지방 식이 유도 비만 생쥐에서 PMFs 다량 함유 분획물(PRF)의 비만 개선 효과 | 35        |
| 1) 체중 감소 효과  | 35        |
| 2) 체중 증가량 및 사료 섭취량, 조직 무게                          | 37        |
| 3) 지질혈증 개선 효과                                      | 39        |
| 4) 내당능 및 인슐린 저항성 개선 효과                             | 41        |
| 5) 지방대사 조절 작용                                      | 45        |
| 6) 지방간 개선 효과                                       | 55        |

|          |    |
|----------|----|
| IV. 고찰   | 63 |
| V. 참고 문헌 | 69 |
| VI. 요약   | 79 |

## LIST OF TABLES

|  |    |
|--|----|
| Table 1. Gradient elution condition for HPLC separation .....  | 11 |
| Table 2. Linear regression results of standard calibration curves using three<br>flavonoid standards ..... | 12 |
| Table 3. Contents of the PMFs in <i>Citrus sunki</i> fruit and leaves<br>.....                             | 21 |
| Table 4. Effect of PRF on body weight, weight gain, food intake and organ<br>weights .....                 | 38 |

## LIST OF FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Mechanisms of adipose tissue expansion .....   | 7  |
| Figure 2. Gas/cAMP/PKA/HSL pathway to lipolysis .....  | 8  |
| Figure 3. AMPK regulates fatty acid synthesis and $\beta$ -oxidation .....   | 9  |
| Figure 4. HPLC chromatograms of three major components in PRF<br>.....   | 20 |
| Figure 5. Effects of PRF on cell viability and cytotoxicity of 3T3-L1<br>preadipocytes .....   | 23 |
| Figure 6. Effect of PRF on differentiation of 3T3-L1 preadipocyte .....  | 24 |
| Figure 7. Effect of PRF on expressions of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , FAS and aP2<br>during 3T3-L1 preadipocyte differentiation ..... | 26 |
| Figure 8. Lipolytic effects of PRF in mature 3T3-L1 adipocyte .....  | 29 |
| Figure 9. Effects of PRF on protein expressions related to adipogenesis in<br>mature 3T3-L1 adipocyte .....                                | 30 |
| Figure 10. Effects of PRF on protein expressions related to lipolysis in<br>mature 3T3-L1 adipocyte .....                                  | 32 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 11. Effects of PRF on protein expressions related to fatty acid oxidation in mature 3T3-L1 adipocyte .....                     | 34 |
| Figure 12. Effect of PRF on weight gain in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....  | 36 |
| Figure 13. Effect of PRF on serum lipid profiles in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....                                 | 40 |
| Figure 14. Effect of PRF on glucose tolerance in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....                                    | 42 |
| Figure 15. Effect of PRF on insulin resistance in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....                                   | 44 |
| Figure 16. Effect of PRF on adipose tissue weights in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....                               | 46 |
| Figure 17. Effect of PRF on lipid droplets in the epididymal adipose tissue of C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....      | 48 |
| Figure 18. Effects of PRF on PPAR $\gamma$ expression in adipose tissue of C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....          | 50 |
| Figure 19. Effects of PRF on protein expressions related to lipolysis in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....            | 52 |
| Figure 20. Effects of PRF on protein expressions related to fatty acid oxidation in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet ..... | 54 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 21. Effect of PRF on liver morphology in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....  | 56 |
| Figure 22. Effect of PRF on serum GOT, GPT levels in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....   | 58 |
| Figure 23. Effects of PRF on protein expressions related to lipolysis in liver of C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....            | 60 |
| Figure 24. Effects of PRF on protein expressions related to fatty acid oxidation in liver of C57BL/6 obese mice induced by high fat diet ..... | 62 |
| Figure 25. The anti-obesity properties exerted by PRE in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet .....                                     | 68 |

## LIST OF ABBREVIATIONS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>ACC</b>                      | Acetyl-CoA carboxylase   |
| <b>AMPK</b>                     | AMP-activated protein kinase   |
| <b>aP2</b>                      | Adipocyte fatty-acid-binding protein 2                               |
| <b>ATCC</b>                     | American type culture collection                                     |
| <b>ATGL</b>                     | Adipose triacylglycerol lipase                                       |
| <b>BCS</b>                      | Bovine calf serum  |
| <b>BMI</b>                      | Body mass index  |
| <b>BSA</b>                      | Bovine serum albumin   |
| <b>C/EBP<math>\alpha</math></b> | CCAAT/enhancer binding protein alpha                                 |
| <b>CaMKK<math>\beta</math></b>  | Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase kinase $\beta$ |
| <b>cAMP</b>                     | Cyclic adenosine monophosphate                                       |
| <b>CMC</b>                      | Carboxymethyl cellulose  |
| <b>CPT-1</b>                    | Carnitine palmitoyltransferase I                                     |
| <b>DEX</b>                      | Dexamethasone  |
| <b>DG</b>                       | Diacylglycerol   |
| <b>DMEM</b>                     | Dulbecco's minimal essential medium                                  |
| <b>DMSO</b>                     | Dimethyl sulfoxide   |
| <b>FAS</b>                      | Fatty acid synthase  |
| <b>FBS</b>                      | Fetal bovine serum   |
| <b>FFA</b>                      | Free fatty acid  |
| <b>GOT</b>                      | Glutamic oxaloacetic transaminase assay kit                          |
| <b>GPT</b>                      | Glutamic pyruvic transaminase assay kit                              |
| <b>H&amp;E</b>                  | Hematoxylin and eosin  |
| <b>HDL</b>                      | High density lipoprotein   |
| <b>HFD</b>                      | High fat diet  |
| <b>HOMA-IR</b>                  | Homeostasis model assessment - insulin resistance                    |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>HPLC</b>                    | High performance liquid chromatography                     |
| <b>HRP</b>                     | Horseradish peroxidase                                     |
| <b>HSL</b>                     | Hormone-sensitive lipase                                   |
| <b>IBMX</b>                    | 3-isobutyl-1-methylxanthine                                |
| <b>INS</b>                     | Insulin  |
| <b>LDL</b>                     | Low-density lipoprotein                                    |
| <b>LDH</b>                     | Lactate dehydrogenase                                      |
| <b>LKB</b>                     | Liver kinase B1  |
| <b>LPL</b>                     | Lipoprotein lipase   |
| <b>MCE</b>                     | Mitotic clonal expansion                                   |
| <b>MTT</b>                     | 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide    |
| <b>ND</b>                      | Normal diet  |
| <b>PBS</b>                     | Phosphate buffered saline                                  |
| <b>PKA</b>                     | Protein kinase A   |
| <b>PMFs</b>                    | Polymethoxyflavones  |
| <b>PMSF</b>                    | Phenylmethylsulfonyl fluoride                              |
| <b>POMC</b>                    | Proiomelanocortin  |
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b> | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma           |
| <b>PRF</b>                     | PMFs-rich fraction   |
| <b>PVDF</b>                    | Polyvinylidene difluoride                                  |
| <b>S.D.</b>                    | Standard deviation   |
| <b>SDS-PAGE</b>                | Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis |
| <b>SREBP1</b>                  | Sterol regulatory element-binding protein 1                |
| <b>TAK-1</b>                   | TGF $\beta$ -activated kinase                              |
| <b>TC</b>                      | Total cholesterol  |
| <b>TG</b>                      | Triglyceride   |
| <b>WAT</b>                     | White adipose tissue                                       |
| <b>WHO</b>                     | World Health Organization                                  |



## I. 서론

세계보건기구(WHO) 보고에 의하면 X 증후군으로 불리는 대사증후군은 복부 비만, 인슐린 저항성, 고혈압, 고지혈증으로 특징되는 병리학적 형태라고 정의하고 있다(Saklayen *et al*, 2018). 복부비만은 성인 남자의 허리둘레가 94 cm 이상, 여성은 80 cm 이상, 혈압은 130/85 mmHg 이상, 중성지방 150 mg/dL 이상, high density lipoprotein (HDL) 은 남성인 경우 40 mg/dL 이하, 여성인 경우 50 mg/dL 이하, 공복혈당은 100 mg/dL 이상으로 가이드라인을 정하고 있으며 특정 약물에 의한 증세 및 가족력까지 포함하고 있다(Gierach *et al*, 2014). 높은 인슐린 저항성과 고혈압, 고지방이 발생하는 대사증후군의 주된 원인은 과체중, 즉 비만으로 이로 인한 합병증이 큰 위험을 초래할 수 있다(Tenenbaum *et al*, 2004).

비만은 에너지 소비와 공급의 균형이 무너진 결과로, 소비되는 에너지보다 과잉의 에너지를 섭취하여 생기는 질환이다. 남은 에너지는 간과 지방조직에 지속적으로 축적되어 비알코올성 지방간, 동맥경화증, 제2형 당뇨병, 심근경색, 고혈압 등을 일으키는 주요인으로 작용하며 전세계에서 사회적으로 심각한 문제로 인식되고 있다(Gadde *et al*, 2018). 비만의 척도는 다양한 계산법이 있으나 body mass index (BMI)가 전세계에서 공통으로 보편화가 되어있다. 자신의 체중을 키의 제곱으로 나누어 ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) 쉽게 계산할 수 있도록 하였으며 BMI 지수가 18.5 - 24.9  $\text{kg}/\text{m}^2$ 는 정상범위, 25.0 - 29.9  $\text{kg}/\text{m}^2$ 는 과체중 범위, 30.0 - 34.9  $\text{kg}/\text{m}^2$ 는 비만 1단계, 35.0 - 39.9  $\text{kg}/\text{m}^2$ 는 비만 2단계 범위로 지정하고 있다(Engin *et al*, 2017). 2015년 연구에 따르면 1980년 이후 70개국 이상에서 비만 유병률이 2배로 증가하였고, 2015년에는 6억 명 이상이 비만이 되었으며 이 중 높은 BMI를 가진 400만 명이 사망했다고 보고하고 있다(GBD 2015 obesity collaborators, 2017). WHO의 최근 자료에 의하면 2016년 기준 전 세계 18세 이상 성인에서 약 19억 명이 과체중이며 이 중 9억5천만 명이 비만으로 조사되었다. 또한 세계 인구의 대부분은 저체중보다 과체중과 비만으로 죽는 인구가 많다

고 보고하고 있다(World Health Organization, 2020). 최근 우리나라의 비만율은 19세 이상, BMI 25 kg/m<sup>2</sup> 기준으로 33.8%로 나타나 1998년 이후 꾸준히 증가하고 있으며 특히 남성인 경우 1998년 25.1%에서 2019년 41.8%로 여성보다 비만 유병률이 높게 나타나 비만 개선을 위한 사회적 해결책이 필요한 실정이다(질병관리본부, 2019). 이러한 비만에 따른 문제점들을 해결 또는 개선하기 위해 다양한 정책들이 실행되고 있고 비만 치료 또는 예방을 위해 다양한 연구들이 진행되고 있다.

체중이 증가하는 것은 백색지방조직(white adipose tissue, WAT) 내 지방세포에 중성지방이 쌓여 지방조직이 팽창하는 결과이며 이는 기존 지방세포의 크기가 커지는 이상발달(hypertrophy) 또는 전지방세포에서 새로운 지방세포가 형성되는 비대증(hyperplasia)에 기인한다(Figure 1). Hyperplasia 조직은 정상적인 지방조직처럼 적절한 혈관형성과 인슐린 민감성, adiponectin, 그리고 대사를 조절하는 adipokine들을 유지할 수 있다. 그러나 hypertrophy 조직은 크기가 큰 지방세포이기 때문에 저산소증 반응(hypoxia)을 유발하며 이로 인한 비정상적인 혈관 생성유도와 세포괴사(necrosis), 염증으로 인한 면역세포가 모여들게 된다(Ghaben *et al*, 2019). 이들 두 가지 지방축적 기작을 통해 항비만 연구는 새로운 지방세포 형성을 억제하거나 크기가 큰 지방세포를 감소시키는 연구가 주요 전략이 될 수 있다.

이들 두 가지 지방축적을 통해 지방 크기를 조절할 수 있는 지방분해(lipolysis) 기작과 새로운 지방조직이 만들어지는 지방형성과정(adipogenesis) 기작에 대해 많은 연구가 보고되고 있다(Laurencikiene *et al*, 2011, de Sá *et al*, 2017). 비만을 예방하거나 개선 또는 치료하는 연구를 위해 가장 많이 사용하는 세포는 3T3-L1 전지방세포이다. 이 세포는 마우스에서 유래된 세포이며 다양한 물질로부터 지방 형성을 억제하거나 지방을 분해하는 연구에 많이 사용하고 있다(Gregoir *et al*, 1998, Rosen *et al*, 2006, Tung *et al*, 2017). Post-confluence 단계인 전지방세포에서 insulin (INS), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone (DEX)과 같은 호르몬 자극으로 인해 mitotic clonal expansion (MCE) 단계로 세포의 형태가 바뀌며 이후 중성지방을 형성하게 된다(Gregoire *et al*, 1998, Guru *et al*, 2020). 지방세포형성 과정에서 발현되는 전사인자 중 가

장 중요한 조절인자는 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )와 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ )이다. 이들은 지방 세포 유전자 조절 부위와 상호작용으로 지방세포 분화를 촉진 시킨다고 알려져 있다(Rosen *et al*, 2006). 또한 이들의 상호작용으로 lipoprotein lipase (LPL), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), adipocyte fatty-acid-binding protein 2 (aP2) 등 지방 형성을 촉진하는 하위유전자를 발현 시킨다(Tang *et al*, 2004). 이후 지방산과 글리세롤이 결합하여 중성지방이 생기게 되고 세포핵 주위에 쌓이게 된다.

지방세포의 중성지방은 lipolysis 경로를 거쳐 글리세롤과 free fatty acid(FFA)로 가수분해되어 세포질 밖으로 분비가 되고 분비된 글리세롤과 FFA는 gluconeogenesis와 fatty acid oxidation을 통해 우리 몸에 에너지를 제공한다(Rui *et al*, 2014). 중성지방이 가수분해되는 과정은 adipose triacylglycerol lipase (ATGL)가 중성지방을 가수분해하여 diacylglycerol (DG)과 FA를 생성하고 DG는 monoacylglycerol lipase에 의해 monoacylglycerol과 FA로 생성되거나 hormone-sensitive lipase (HSL)에 의해 완전히 가수분해된다(Greenberg *et al*, 2001, Saponaro *et al*, 2015). Lipolysis 메커니즘 중 가장 대표적인 기작은 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 경로에 의한 지방분해 기작이다. 세포 내 cAMP 농도가 증가하게 되면 cAMP dependent protein kinase A (PKA)가 활성화 되어 하위 인자인 HSL과 perilipin을 활성화시켜 중성지방을 가수분해한다(Figure 2. Egan *et al*, 1992, Carmen *et al*, 2006). PKA에 의한 HSL 활성화 부위는 여러 곳에서 인산화가 이루어지는데 특히 Ser563과 Ser660 부위의 인산화는 중성지방의 가수분해를 촉진한다고 알려져 있다(Anthonsen *et al*, 1998, Su *et al*, 2003).

지방의 합성과 분해는 에너지 항상성에 매우 중요하다. 음식을 과잉 섭취하면서 발생하는 잉여 에너지를 간 또는 지방조직에 지방을 합성하여 저장하지만 배고프거나 운동을 하게 되는 경우 저장된 지방을 분해하여 필요한 에너지를 공급한다. 비만이나 2형 당뇨병 그리고 지방간과 같은 대사질환에서 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화 연구는 대사질환을 치료하는 주요 약리학적 기작으로 연구되고 있다(Bijland *et al*, 2013, Li *et al*, 2021). AMPK는 우리 몸 전

체에 에너지 항상성을 유지하는 중추적인 역할을 담당한다. AMPK는 근육, 간, 지방에서 지방산 및 글리코젠 합성 억제를 통해 ATP 소비를 감소시키고, 지방산화 및 미토콘드리아의 활성을 통해 ATP 합성을 촉진 시킨다(Kim *et al*, 2016). AMPK는 촉매인자( $\alpha$ )와, 두 개의 조절인자( $\beta$ ,  $\gamma$ )의 소단위로 구성되어 있으며 근육인 경우  $\alpha 2$  촉매인자를 포함한 복합체로 구성하고 있고 간에서는  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  소단위 복합체, 지방조직인 경우는  $\alpha 1$  촉매인자로 구성하고 있다. AMPK의  $\alpha$  촉매인자 내 Thr172 부위의 인산화는 AMPK를 활성화하게 되는데  $\alpha$  소단위의 상위 인자는 liver kinase B1 (LKB1),  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ), TGF $\beta$ -activated kinase (TAK-1) 등이 알려져 있다 (Figure 3. Daval *et al*, 2006, Lipovka *et al*, 2015).

Acetyl-CoA carboxylase (ACC)는 지방산 합성과 산화 경로를 조절하는 중요한 인자다. ACC는 지방산을 합성하는 동안 acetyl-CoA에서 malonyl-CoA로 카르복실화를 촉진시키며, fatty acid oxidation의 주요 인자인 carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1)을 억제한다. ACC는 ACC1과 ACC2로 구성되어 있으며, ACC1이 지방산 합성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이전연구에서 AMPK의 활성화를 통해 하위 인자인 ACC1의 Ser79번 잔기에 인산화가 되어 ACC1의 활성이 억제된다고 보고하고 있다(Wang *et al*, 2018). 따라서 AMPK의 활성화는 ACC를 인산화시켜 malonyl-CoA의 농도를 감소시키고 CPT-1을 활성화시켜 지방산화를 촉진시키게 된다(Figure 4. Wang *et al*, 2018).

비만을 치료하기 위한 약물로 미국 FDA에서는 현재까지 6종류(phentermine (1959), orlistat (1999), phentermine/topiramate (2012), lorcaserin(2012), naltrexone/bupropion sustained release (2014), liraglutide (2014) 의 항비만 치료제에 대한 허가가 되어있다. 이 약물들은 단순히 체중 감소를 위하는 식욕감퇴 또는 지방 흡수를 방해하는 것으로 체중 감소를 유도한다. 대표적으로 phentermine인 경우 시상하부에 norepinephrine분비를 촉진하여 식욕감퇴를 일으키는 물질이며, orlistat는 pancreatic lipase inhibitor로 위점막에 lipase 활성을 억제시켜 중성지방의 가수분해를 저해하고 장에서의 지방산을 감소시킨다. Lorcaserin은 시신경의 proopiomelanocortin (POMC)를 활성화하여 식욕을 억제시키며, liraglutide는 인슐린 분비를 향상시키고 배고픔을 못 느끼게 하여 식욕을

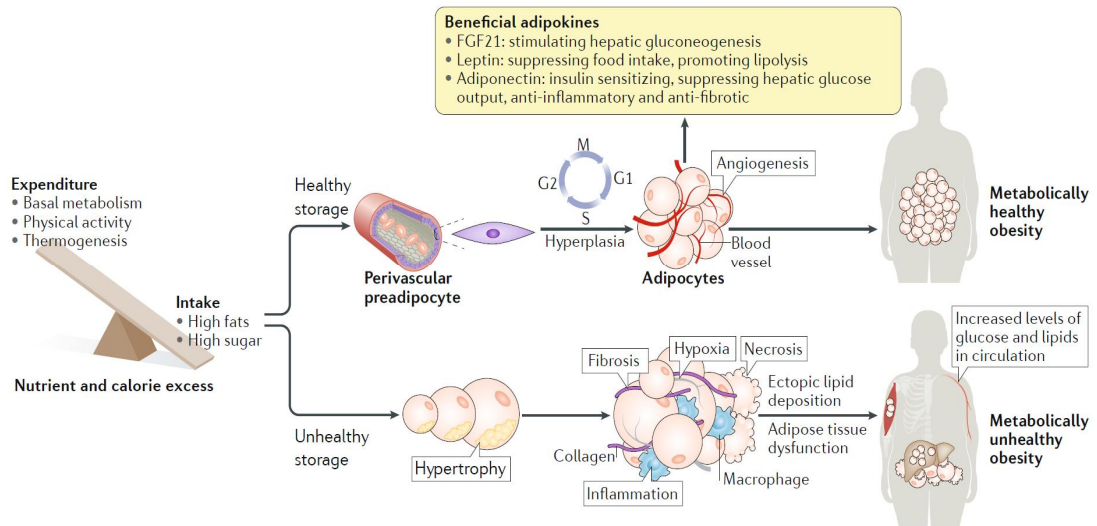
억제한다(Gouni-Berthold et al, 2019). 그러나 이런 약물 치료제는 비용이 많이 들고 phentermine을 제외한 나머지는 장기 복용을 해야 하며 이로 인한 부작용이 매우 크다. 예를 들어 phentermine인 경우 심장판막 및 쇼크, 정신이상 등이 있으며, orlistat인 경우는 간 손상을 일으킨다고 보고하고 있다(Cheung et al, 2013). 이처럼 효능 및 안정성, 장기 복용으로 인한 부작용으로 인해 연구자들은 안전한 항비만 치료제에 관심을 두고 있다.

지방분화 및 억제 그리고 지방분해 및 지방산화에 대한 많은 기작들이 연구를 통해 밝혀지면서 음식 또는 약용식물 등 자연에서 얻어지는 자원들을 이용하여 안전하고 부작용을 최소화할 수 있는 생리활성물질의 규명 및 기작 분석에 많은 연구가 이루어지고 있다(Tung et al, 2017, Chang et al, 2019, Guru et al, 2021). 이중 감귤에 함유되어있는 플라보노이드는 자연에서 얻어지는 가장 매력 있는 자원이며 플라보노이드의 구성 성분에 따라 다양한 생리활성을 나타낸다. 많은 연구자들은 감귤 과피에서의 기능성에 관한 관심이 높아 항산화, 항염, 항암뿐만 아니라 간 기능개선, 항비만, 제2형 당뇨병 같은 대사질환 개선에도 많은 생리활성 연구들을 보고하고 있다(Mahmoud et al, 2019, Ahmed et al, 2021). 감귤 플라보노이드의 구성 성분 중 polymethoxyflavones (PMFs)는 일부 감귤류에만 존재하는 플라보노이드로 알려져 있다(Raman et al, 2005). PMF는 메톡시(CH<sub>3</sub>O)가 결합한 수와 위치에 따라 nobiletin, tangeretin, sinensetin으로 구분되며 다른 플라보노이드 활성과 같이 항산화, 항염, 항암, 간 기능개선, 항비만에 효능이 있다고 알려져 있다(Gao et al, 2018).

제주도 자생감귤인 진귤(*Citrus sunki* Hort, ex Tanaka)은 제주지역에서 ‘산물’로 불리고 있다. 진귤 과피를 건조시킨 것을 진피라 하여 한의학에서는 없어서는 안 될 한약재로 사용하고 있으나 온주밀감의 말린 과피를 진피로 오인하여 사용하고 있다(Kang et al, 2005). 진귤은 PMFs가 다량 함유되어있다고 알려져 있으며 진귤 과피에 대한 다양한 생리활성 연구가 이루어지고 있다(Kang et al, 2005, Choi et al, 2007, Shin et al, 2011, Kang et al, 2012).

많은 감귤류의 과피에서 PMFs의 함량을 분석하여 다양한 생리활성 연구를 진행하고 있으나 감귤잎에서의 PMFs 함량 및 생리활성 연구는 이루어지지 않았다. 또한 여러 생리활성 연구들 중 PMFs의 항비만 연구는 고지방식이와 PMFs

를 동시에 공급한 쥐에서 체중 증가 억제 및 지질대사를 억제하는 연구가 많이 보고되고 있으나, 고지방식으로 비만을 유도한 쥐에서 PMFs를 공급했을 경우의 체중 증가 억제 및 지질대사 개선에 관한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 진꿀 앞에서 PMFs를 다량 함유한 분획물 (PMFs-rich fraction, PRF)을 제조하여 *in vitro*와 고지방식으로 비만을 유도한 생쥐에서 PRF의 비만 개선 효과를 연구하였다.



**Figure 1. Mechanisms of adipose tissue expansion (Ghaben *et al*, 2019).** Adipose tissue can primarily expand in one of two ways: through differentiation of resident tissue precursors to form new adipocytes (hyperplasia) or through enlargement of existing adipocytes (hypertrophy).

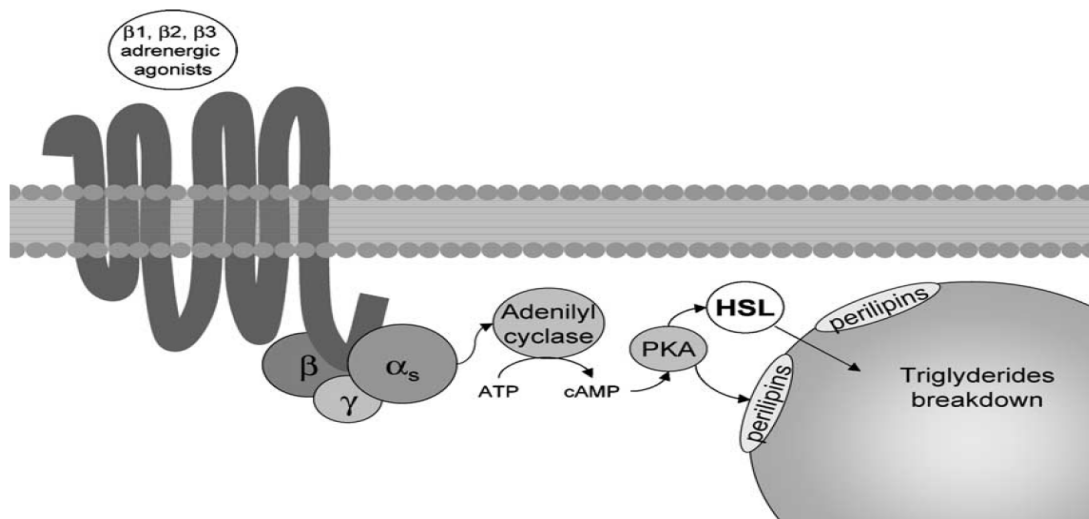


Figure 2. Gas/cAMP/PKA/HSL pathway to lipolysis (Carmen *et al*, 2006). This mechanism implicates the coupling of hormone receptors in the plasma membrane to a Gs family of GTP-binding proteins. Gas, as subunit of G-protein; PKA, cAMP dependent protein kinase; HSL, hormone sensitive lipase.



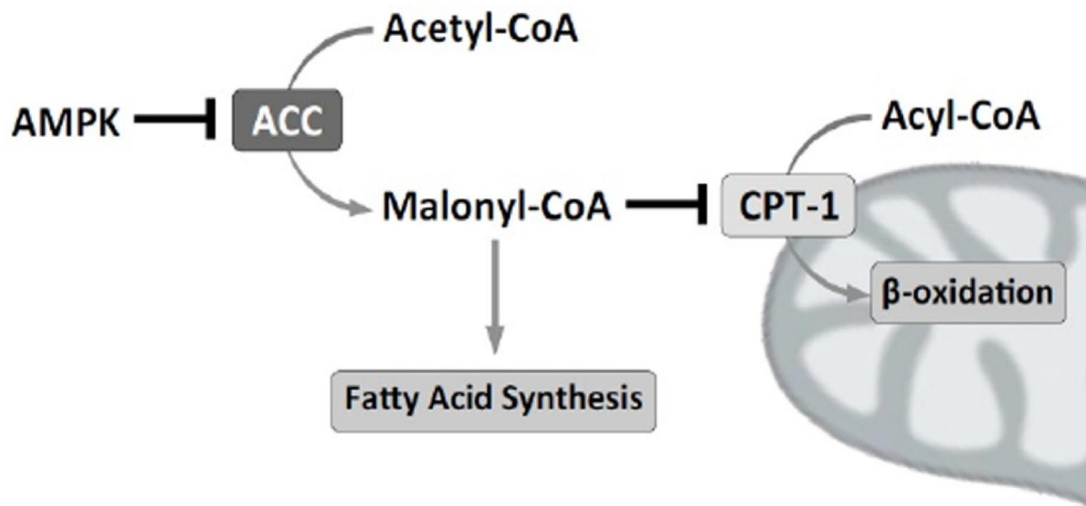


Figure 3. AMPK regulates fatty acid synthesis and  $\beta$ -oxidation. (Lipovka *et al.*, 2015). AMPK, AMP-activated protein kinase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; CTP-1, carnitine palmitoyltransferase-1.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 채집 및 분획물 제조

#### 1) 시료 채집

본 연구에 사용된 진굴 과실과 잎은 2021년 2월 제주도 제주시 애월읍 남읍리 부근에서 채집하였다.

#### 2) 시료 추출 및 분획

채집된 과실과 잎은 바로 세척하여 60°C에서 24시간 건조 후 분쇄하였다. PMFs가 다량 함유된 분획물(PMFs-rich fraction, PRF)을 얻기 위하여 시료의 추출 및 분획은 Ko 등(Ko *et al.*, 2010)의 방법을 사용하였다. 분쇄시료 2 kg를 여과포에 넣고 3차 증류수 20 L를 가하여 100°C 항온수조에서 5시간 동안 열수 추출하였다. 추출물을 수득하고 식힌 후 분획 깔때기에 추출물과 hexane의 비율을 1:1로(v/v) 혼합하여 hexane층을 회수하였고 감압 농축기(40°C)를 이용하여 용매를 제거하여 농축하였다. 농축물은 동결 건조기에서 (IlshinBioBase Co. Ltd., Korea) 건조 분말 시료 제조 후 -20°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 표준용액의 조제

PMFs 정량 분석을 위한 표준용액은 nobiletin, tangeretin, sinensetin (Interpharm, Korea)을 각 10 mg씩 ethanol과 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 1:1(v/v) 비율로 희석한 용매로 용해한 후 5분 동안 초음파 처리하여 100 mL로 정용하였다. 이후 표준물질의 농도는 0.010, 0.025, 0.050, 0.100 mg/mL가 되도록 조제하여 이를 표준용액으로 사용하였다.

#### 4) 식물 화합물의 HPLC 분석

과실 및 잎에서 준비한 PRF의 함량은 PDA 검출기로 구성된(Waters 2695 Alliance system) HPLC를 사용하였으며, 분석 software는 Empower (Version 2)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 XBridge BEH C<sub>18</sub> Column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm. Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고 330 nm 흡광도 파장에 서 확인하였다. 이동상은 0.1% 인산이 첨가된 증류수(A)와 0.1% 인산이 첨가된 acetonitrile (ACN, B)을 사용하였으며 0.0분 80%;A, 0.0-5.0분 80%;A, 5.0-40.0분 30%;A, 40-41.1분 0%;A, 41.1-43.0분 0%;A, 43.0-44.0분 80%;A, 44.0-45.0분 80%;A로 분석되었다. 다음 시료 분석을 위해 6분간 최종 이동상 비율을 유지하였으며, Injection volume은 10 μL, 유속은 0.8 mL/min, 컬럼온도 40°C에서 분석되었다(Table 1). 각각의 PMFs 함량은 UV 스펙트럼을 표준품과 비교하고 분석 피크면적을 통해 얻은 표준곡선을 사용하여 각 추출물의 PMFs 농도를 계산하였다.

Table 1. Gradient elution condition for HPLC separation.

| Time (min) | Flow (mL/min) | A (%) | B (%) |
|------------|---------------|-------|-------|
| 0          | 0.8           | 80    | 20    |
| 5          | 0.8           | 80    | 20    |
| 40         | 0.8           | 30    | 70    |
| 41         | 0.8           | 0     | 100   |
| 43         | 0.8           | 0     | 100   |
| 44         | 0.8           | 80    | 20    |
| 45         | 0.8           | 80    | 20    |

A : Water in 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

B : Acetonitrile in 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Table 2. Linear regression results of standard calibration curves using three flavonoid standards

| Standards  | R <sup>2</sup> | A <sup>b</sup>              | B <sup>c</sup>              |
|------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Sinensetin | 0.998487       | -3.250927 × 10 <sup>3</sup> | 4.647635 × 10 <sup>4</sup>  |
| Nobiletin  | 0.998374       | -7.381774 × 10 <sup>2</sup> | 3.584141 × 10 <sup>4</sup>  |
| Tangeretin | 0.998981       | 5.672935 × 10 <sup>4</sup>  | 58.678878 × 10 <sup>4</sup> |

R<sup>2</sup>: correlation coefficient; Linear equation formula:  $y = Ax + B$ ;  $y$  = peak areas; A<sup>b</sup>: slope; B<sup>c</sup>: intercept;  $x$  = concentration (mg).

## 2. 3T3-L1 전지방세포 배양

Mouse 유래 세포주인 3T3-L1 세포를 american type culture collection (ATCC)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포는 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin, 10% bovine calf serum (BCS, Gibco, USA)이 포함된 dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Gibco, USA) 배양액을 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3-4일을 주기로 실행하였다.

## 3. 세포 생존율 분석

세포 생존율 분석은 Hsu 등(2006)의 방법을 수정하여 수행하였다. 3T3-L1 전지방세포를 96 well cell culture plate (1×10<sup>4</sup> cells/well)에 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 3일 동안 배양하였다. 3일 배양 후 2 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)

용액을 400 ug/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 4시간 동안 암반응 하였다. 이후 용액을 제거하고 MTT에 의해 환원된 formazan 침전물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 3회 반복 실험하였으며 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도 값과 비교하여 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{\text{Sample OD}_{540}}{\text{Control OD}_{540}} \times 100$$

#### 4. 세포 독성 분석

시료에 대한 전지방세포의 독성 유무를 분석하기 위해 cell cytotoxicity assay kit (DoGen, Korea)을 이용하여 수행하였다. 3T3-L1 전지방세포를 96 well cell culture plate ( $1 \times 10^4$  cells/well)에 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 3일 동안 배양하였다. 3일 배양 후 대조군 및 시료군의 배양액을 취하여 lactate dehydrogenase (LDH) 반응액을 넣고 microplate reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 세포에 lysis solution을 처리하여 세포배양액을 사용하였으며 각 시료의 독성 분석은 3회 반복 실험하여 다음 식에 의해 산출된 평균값으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{A - B}{C - B} \times 100$$

A : Exp. - Background control

B : Low control - Background control

C : High control - Volume control

## 5. 3T3-L1 지방세포 분화유도

3T3-L1 전지방세포를 48 well cell culture plate ( $3 \times 10^5$  cells/well)에 2일 동안 배양하여 confluence 상태가 되도록 하였으며, 배양액을 교환한 후 2일 더 배양하였다. Post-confluence 상태(Day 0)에서 분화유도 배지[10 ug/mL insulin (INS, Sigma, USA), 1 uM dexamethasone (DEX, Sigma, USA), 0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma, USA), DMEM/10% fetal bovine serum (FBS)]로 교환하여 2일 동안 분화유도를 촉진 시켰다. 2일 후 10 ug/mL insulin이 포함된 DMEM/10% FBS 배양액으로 교환하였고, 이후 2일 간격으로 DMEM/10% FBS 배양액으로 교환하여 총 8일 동안 분화유도를 하였다. 시료는 분화유도 전 기간에 배양액과 함께 처리하였으며 분화유도는 3 반복 하였다.

## 6. Oil Red O 염색

분화유도 이후 분화된 지방세포는 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 2회 세척 후 4% formalin/PBS 용액에 1시간 고정하였고, 이후 증류수로 2회 세척하였다. Isopropanol로 희석한 0.6% Oil Red O (Sigma, USA)용액은 증류수와 6:4로 다시 희석하여 여과하여 사용하였다. 세척된 세포는 Oil Red O 용액으로 1시간 염색하였고 이후 증류수로 세척한 후 분화된 양상을 현미경 하에서 관찰하였다. 염색된 지방소적을 수치화하기 위해 isopropanol 용액으로 희석한 4% nonidet P-40 (Amresco, USA)으로 용해한 후 microplate reader(Bio-Tek, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7. Free glycerol 함량 측정

지방세포 분화유도 방법에 따라 3T3-L1 전지방세포를 지방세포로 100% 분화시켰다. 이후 DMEM/2% BSA 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하였고, 이후 양성대조군(IBMX)과 PMF(10, 20, 40 ug/mL)를 DMEM/2% BSA에 혼합하여 2일간 처리하였다. 2일 동안 분비되는 glycerol 함량을 free glycerol assay kit (Biomax, Korea)를 이용하여 측정하였다.

## 8. 동물 실험

동물 실험은 제주대학교 동물연구윤리위원회의 승인(승인번호 : 2021-0012)을 받은 후 수행하였고 비만 유도 등 실험 방법 설계는 Wang 등(2012)을 참조하였다. 4주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 CRONEX사(Gyeonggi-do, Korea)로부터 구입하여 온도 23±2℃, 습도 55±5%, 그리고 명암주기 12시간 사육 조건 내에서 일반사료와 물을 자유롭게 공급하여 1주간 적응시켰다.

### 1) 비만 유도 및 시료 투여

1주일 적응 후 마우스를 무작위로 선별하여 일반사료(Normal, 5L79, Orientbio, Korea)군과 60% 지방이 있는 고지방식이(Research Diet, D12492, USA)군으로 나누어 5주 동안 비만을 유도하였다. 5주 후 비만이 유도된 고지방식이군을 다시 고지방식이군(HFD), Orlistat 투여군(HFD + Orlistat 15.6 mg/kg/day), PRF 투여군(PRF + 50, 100, 200 mg/kg/day)로 구분하여 5주 동안 경구투여하였다. Orlistat의 농도는 Jiao 등(2019)과 Reagan-Shaw 등(2008)을 참조하여 결정하였고, 모든 시료는 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma, USA)에 희석하여 매일 1회 투여하였다.

## 2) 체중 및 사료 섭취량 측정

체중과 증가량, 사료 섭취량은 1주일 간격으로 일정한 시간에 측정하여 1주일간 차이를 분석하였다.

## 3) 내당능 검사

실험이 끝난 마우스를 8시간 금식시킨 후 혈당검사측정기(Glunco plus, OSANG healthcare, Korea)를 이용하여 꼬리 정맥에서 공복혈당을 측정하였다. 이후 glucose 2 g/kg을 경구투여하여 30, 60, 90, 120분 간격으로 꼬리 정맥에서 혈당을 측정하였다.

## 4) 혈액 채취 및 조직 적출

혈액 채취는 8시간 금식시킨 마우스를 CO<sub>2</sub>로 마취하여 심장에서 전혈하였다. 혈액은 상온에서 5시간 이상 방치하여 혈액 응고하였고, 응고된 혈액은 4000 × g에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 혈액 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 전혈된 마우스는 개복하여 간, 지방조직, 비장, 신장을 적출하여 각 무게를 측정하였고, 간과 지방은 무게 측정 후 분석을 위해 액체질소에 보관하였으며 또한, 조직 염색을 위해 PBS로 세척한 후 4% paraformaldehyde (Biosesang, Korea)에 고정하였다.

## 5) 혈청 내 생화학적 분석

혈청 내 생화학 분석은 glutamic oxaloacetic transaminase assay kit (GOT, ASAN, Korea), glutamic pyruvic transaminase assay kit (GPT, ASAN, Korea), triglyceride assay kit (TG assay kit, Dogen, Korea), high-density lipoprotein/low-density lipoprotein assay kit (HDL/LDL assay kit, Dogen, Korea), total cholesterol assay kit (TC assay kit, Dogen, Korea)을 사용하여 분석하였다.

## 6) 인슐린 농도 및 HOMA-IR 분석

혈청 내 인슐린 농도는 mercodia mouse insulin ELISA assay kit



(Mercoxia, Sweden)를 사용하여 분석하였고, 공복혈당과 인슐린 측정치를 바탕으로 다음과 같이 계산하여 homeostasis model assessment - insulin resistance (HOMA-IR) 값을 구하였다(Matthews 등, 1985).

$$\text{HOMA-IR} = [\text{fasting glucose (mg/dL)} \times \text{fasting insulin(mU/L)}] / 405$$

#### 7) H&E 염색

4% paraformaldehyde에 고정된 간과 지방은 조직이 완전히 고정할 수 있도록 2차 고정한 뒤 증류수로 수세하였다. 이후 histocorePEARL (Leica, Germany) 조직처리기를 이용하여 50%, 70%, 80%, 90%, 100% 에탄올로 탈수하였고, xylene과 파라핀을 침투하였다. 파라핀이 침투된 조직은 tissue embedding & cooling system (Wincom, China)으로 파라핀 블록을 제작하였고, 이후 microtome (Leica, Germany)을 이용하여 7 um의 두께로 절편하였다. 절편된 조직은 xylene, 100% ~ 50% 에탄올 순서로 함수한 후 hematoxylin & eosin 염색하였고, 염색된 조직은 탈수과정을 거쳐 canada balsam (Junsei, Japan)으로 봉입하여 현미경(Olympus IX71, Japan)으로 관찰하였다.

### 9. Western blot 분석

3T3-L1 세포 및 간과 지방조직을 RIPA lysis buffer (1×RIPA (Millipore Germany), 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma, USA), 1 mM NaF (Merk, Germany), 1 ug/mL aprotinin (Amresco, USA), 1 ug/mL lupeptin (Millipore, Germany), 1 ug/mL pepstatin (Amresco, USA))를 첨가하여 균질화하였다. 균질화된 시료는 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하였고 시료의 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였다. 10 ug의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 100V에서 2시간 동안 전

기영동 하여 단백질을 분리하였으며, polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore USA) membrane으로 전이하였다. 전이된 membrane은 blocking buffer (5% skim milk/0.1% TBST)로 blocking 하였고, 1차 항체는 3% bovine serum albumin (BSA, Vovogen, Australia) 또는 skim milk로 희석하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 0.1% TBST로 세척하였고 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 mouse, rabbit 또는 goat 2차 항체(Vector laboratories, USA)를 blocking buffer에 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 0.1% TBST로 세척하여 westar ECL (Cyanagen, Italy) kit로 반응시킨 후 x-ray 필름(Agfa, Belgium)을 이용하여 현상하였다. 1차 항체는 PPAR $\gamma$ , FAS, SREBP1,  $\beta$ -actin, aP2 (Santacruz, USA), phospho-AMPK, AMPK, phospho-ACC, ACC, phospho-HSL, HSL, p-ACC (Cell signaling, USA)를 사용하였다.

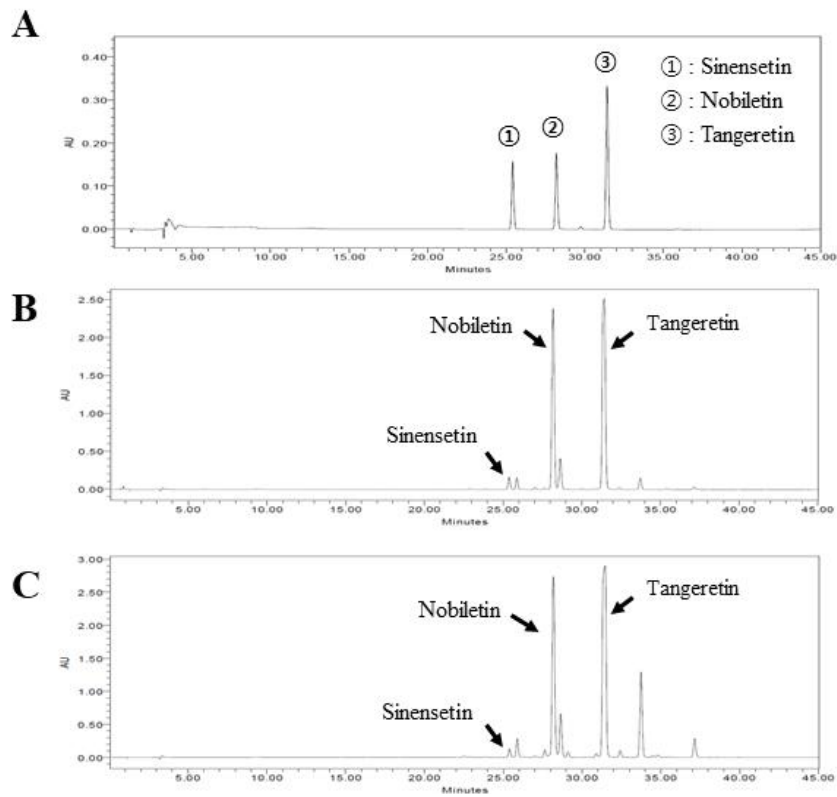
## 10. 통계 처리

모든 실험 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표현하였으며, 처리군 간의 유의성 검정은 SPSS 프로그램 (IBM SPSS statistics 21, USA)을 이용하여 t-test 또는 일원 배치 분산분석(One-way analysis of variance, ANOVA) 중 Duncan 다중 검정으로 분석하여 표현하였다. 유의성은  $p < 0.05$  이하의 수준에서 유의성을 판단하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 진굴 잎에서 분리한 PMFs 다량 함유 분획물(PRF)의 특성

본 연구는 진굴 잎과 과실에서 분리한 PMFs 함량을 비교 분석하였다. PMFs의 대표적인 물질인 nobiletin, sinensetin, tangeretin을 표준용액으로 분석하였을 때, sinensetin은 25.694분, nobiletin은 28.488분, tangeretin은 31.777분에 피크가 나타났다(Figure 4. A). 표준용액의 피크를 기준으로 각 과실과 잎에서 동일 시간대에 나타나는 3개의 PMFs 함량을 분석한 결과, 과실에서의 sinensetin은 낮은 함량을 나타냈으며 nobiletin과 tangeretin은 높은 함량을 보였다(Figure 4. B). 잎에서의 PMFs는 과실에서 분석된 피크의 양상과 비슷하였다(Figure 4. C). 분석된 피크로 각 PMFs의 함량을 분석한 결과 과실에서의 sinensetin은 검출되지 않았고 nobiletin은 8.07 mg/g, tangeretin은 13.96 mg/g으로 분석되었으며, 잎에서는 sinensetin 1.10 mg/g, nobiletin 15.81 mg/g, tangeretin 50.34 mg/g으로 과실과 잎에서의 PMFs는 tangeretin 함량이 대부분을 차지한 것을 확인하였다(Table 1). 또한 과실보다 잎에서의 PMFs 함량이 매우 높은 것을 확인하였고 3가지의 PMFs 함량을 종합하였을 때 과실보다 잎에서의 PMFs 함량이 3배 이상 높은 것으로 분석되었다(Table 3).



**Figure 4.** HPLC chromatograms of three major components in PRF  
 (A) Standard mixture; (B) Analysis of PMFs in *Citrus sunki* fruit; (C)  
 Analysis of PMFs in *Citrus sunki* leaves.

Table 3. Contents of the PMFs in *Citrus sunki* fruit and leaves

| Samples(mg/g) | Sinensetin | Nobiletin | Tangeretin | Total |
|---------------|------------|-----------|------------|-------|
| Fruit         | ND         | 8.07      | 13.96      | 22.03 |
| Leaves        | 1.10       | 15.81     | 50.34      | 67.25 |

## 2. PMFs 다량 함유 분획물(PRF)이 3T3-L1 전지방세포 분화에 미치는 영향

진굴 앞에서 분리한 PRF가 3T3-L1 전지방세포 분화유도를 억제하는지 판단하기 위해서 우선 PRF에 대한 세포 생존율 및 독성에 대한 효과를 분석하였다 (Figure 5.). MTT 그리고 LDH 분석 결과 PRF의 농도가 50 ug/mL 이상 증가할수록 90%의 세포 생존율을 보여 저리하지 않은 대조군과 유의적인 차이가 있었으며, 세포 성장 저해가 PRF의 독성에 의한 것인지 분석한 결과 50 ug/mL 농도에서  $4.20 \pm 1.67\%$ , 100 ug/mL의 농도에서  $15.8 \pm 1.62\%$ 로 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 따라서 PRF는 50 ug/mL 미만의 농도에서 본 실험에 사용하였다.

### 1) 지방분화 억제 효과

진굴 앞에서 분리한 PRF의 함량과 실험에 사용할 농도를 결정한 후 3T3-L1 전지방세포 분화유도에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. 분화유도 8일 후 Oil Red O 염색하여 지방축적 정도를 확인한 결과 PRF 20 ug/mL 농도에서부터 지방축적이 억제가 된 것을 확인하였고 40 ug/mL의 농도는 지방축적 정도가 대조군과 차이가 있었다(Figure 6. A). 염색된 지방소적을 정량한 결과 PRF 농도가 증가할수록 각  $94.6 \pm 0.6$ ,  $85.5 \pm 0.82$ ,  $52.5 \pm 5.04\%$ 로 지방소적이 대조군보다 유의적으로 줄어든 것으로 확인되었다(Figure 6. B). 따라서 진굴 앞에서 분리한 PRF는 3T3-L1 전지방세포 분화를 억제한다고 판단된다.

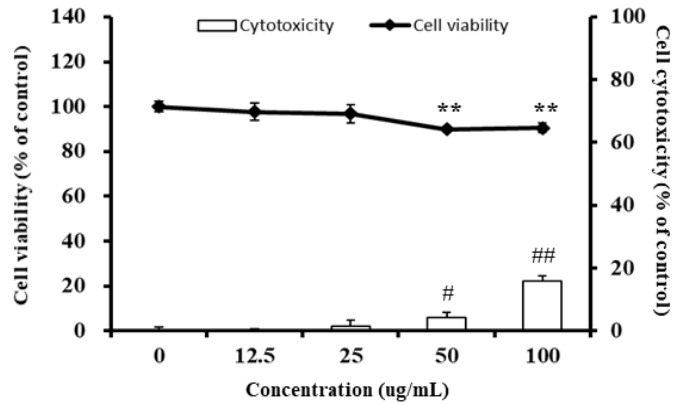
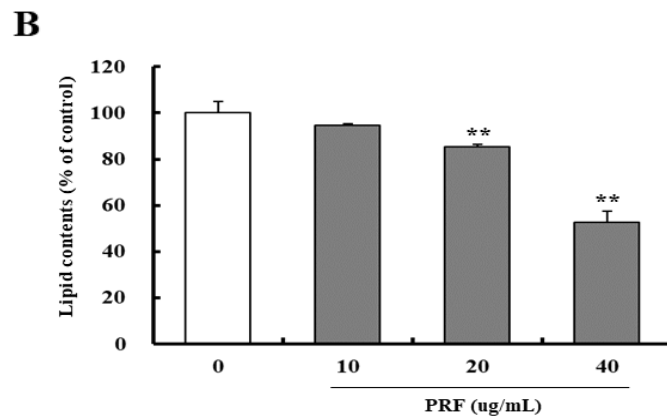
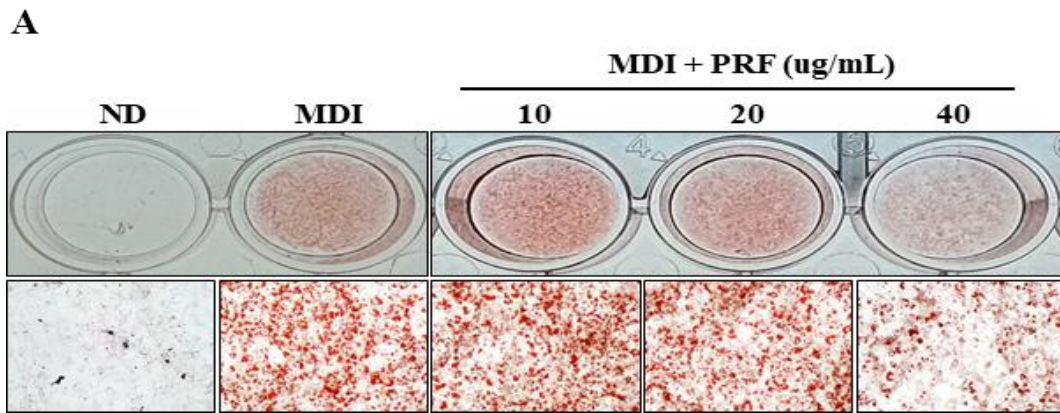


Figure 5. Effects of PRF on cell viability and cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 preadipocytes were treated with various concentrations for 72h. Cell viability and cytotoxicity were analyzed by MTT and LDH assays. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; \* < 0.05, \*\* < 0.01, # < 0.05, ## < 0.01 compared to non treated group)



**Figure 6. Effect of PRF on differentiation of 3T3-L1 preadipocyte.** Two day Postconfluent 3T3-L1 cells differentiated with MDI (1 uM DEX, 0.5 mM IBMX, 10 ug/mL Insulin) medium in the presence of absence PRF. (A) Differentiated adipocytes were stained with Oil Red O on day 8 and stained triglycerides were presented at 200 X magnification. (B) Lipid contents were measured at 520 nm by microplate reader. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared to non-treated group)



## 2) PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 발현 억제 효과

PRF가 3T3-L1 지방세포 분화를 억제함에 따라 지방세포 분화 과정에 주요 인자인 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  그리고 하위 인자인 FAS 및 aP2의 발현 양상을 분석하였다. 분화유도 8일 후 분화유도물질을 처리한 군(MDI)은 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현이 강하게 나타났으며 지방합성을 촉진하는 FAS와 aP2의 발현도 유도하는 것을 확인하였다(Figure 7. A). PRF를 처리한 군에서는 농도가 증가할수록 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현 양상이 뚜렷하게 감소하는 것으로 나타났으며 하위 인자인 FAS와 aP2의 발현 역시 억제되는 것으로 나타났다. 특히 PPAR $\gamma$  발현인 경우 PPAR $\gamma$ 2의 감소가 10 ug/mL의 낮은 농도에서부터 대조군보다 뚜렷하게 억제됨을 확인할 수 있었다. 발현억제 양상을 수치화한 결과 PPAR $\gamma$ 2 발현이 10 ug/mL의 농도부터 대조군보다 유의적으로 억제되는 결과를 보였으며, C/EBP $\alpha$ , FAS, aP2의 발현에서도 PRF의 농도가 증가할수록 대조군과 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Figure 7. B). 이는 PRF가 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현 및 지방합성을 억제함으로써 지방분화를 억제함을 알 수 있다.

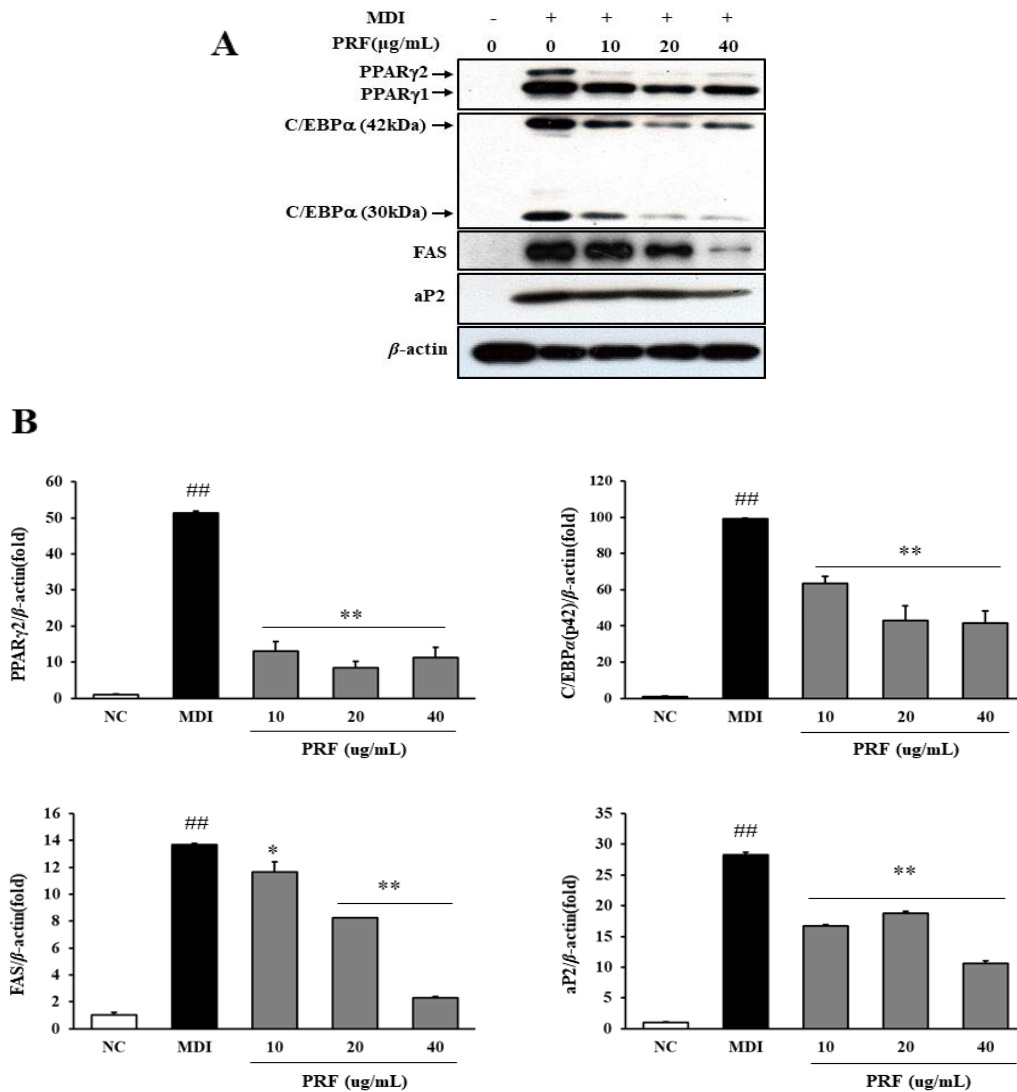


Figure 7. Effect of PRF on expressions of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , FAS and aP2 during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. Two-day postconfluence 3T3-L1 cells differentiated with the MDI plus various concentration PRF, respectively. (A) Western blot analysis measured the PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , FAS, aP2 and  $\beta$ -actin expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; #p < 0.05, ##p < 0.01, compared to NC(undifferentiated control) , \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, compared to MDI). MDI : differentiation medium.

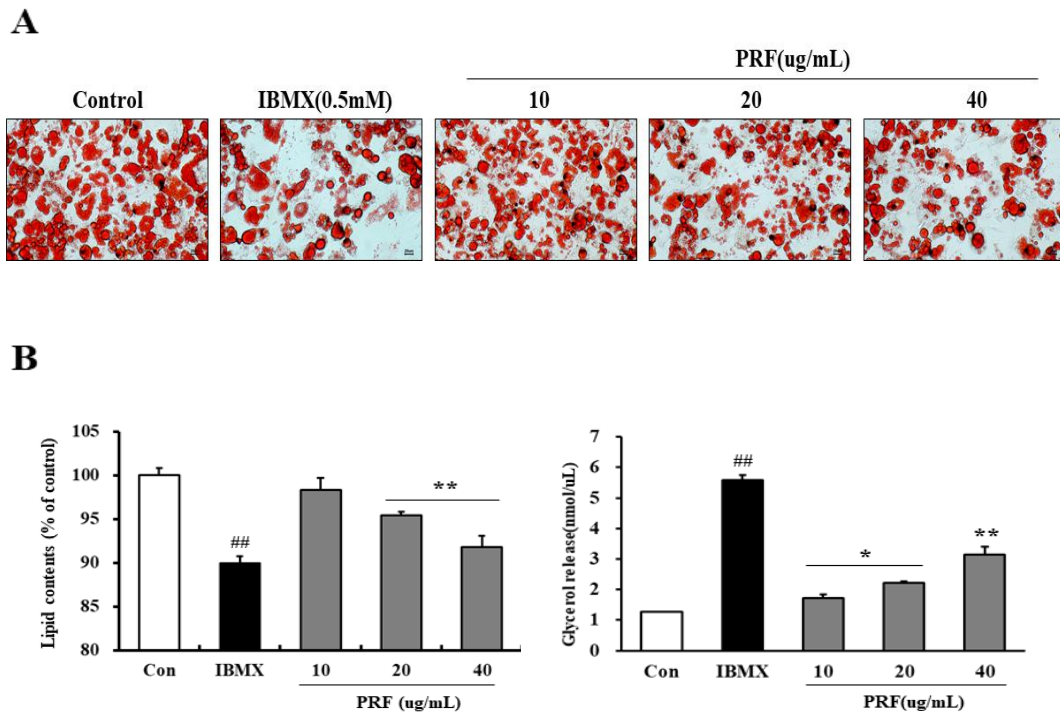
### 3. PMFs 다량 함유 분획물(PRF)이 3T3-L1 지방세포의 지방대사에 미치는 영향

#### 1) 중성지방 감소 효과

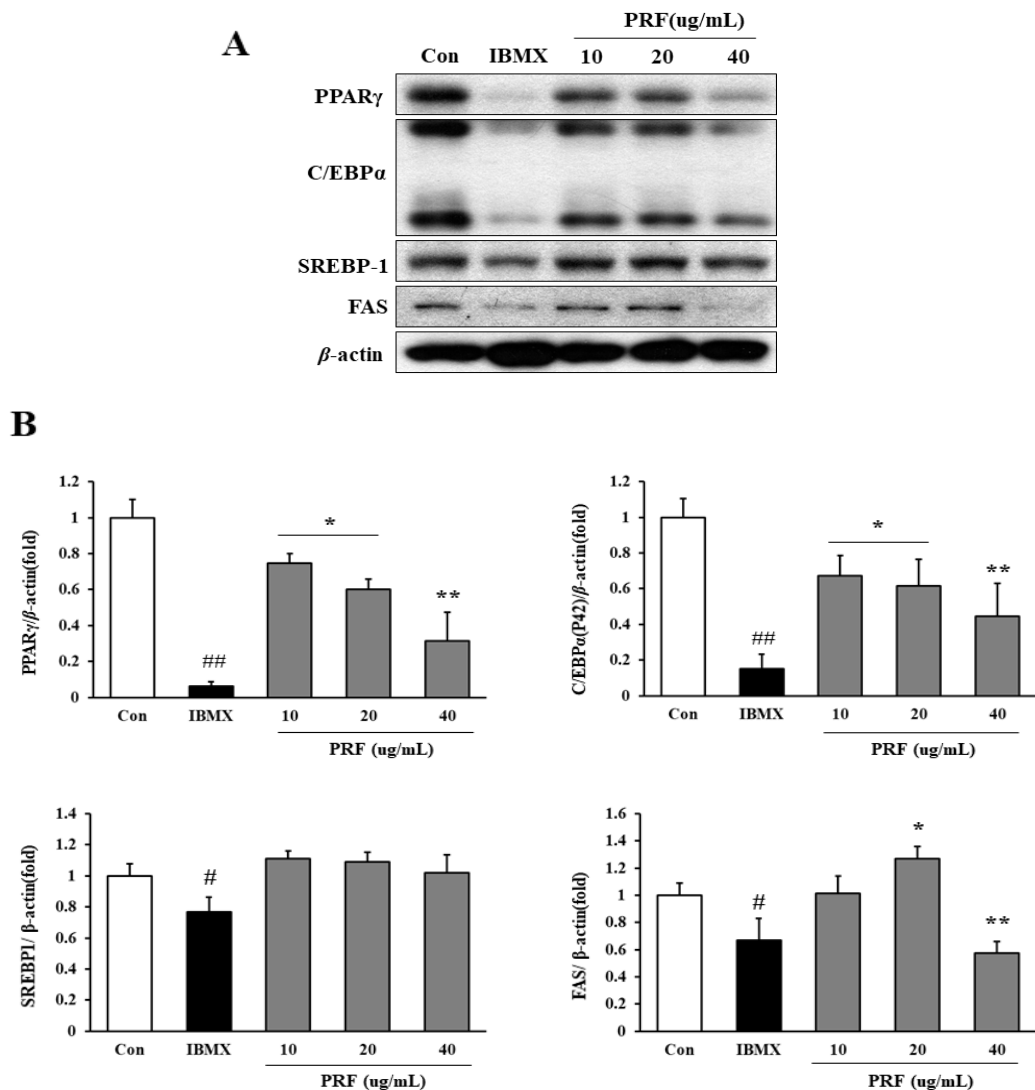
진골 앞에서 분리한 PRF가 충분히 분화된 3T3-L1 지방세포에서 중성지방을 분해하는 효과가 있는지 분석하였다. 충분히 분화된 3T3-L1 지방세포를 24시간 starvation한 후 phosphodiesterase inhibitor인 IBMX와 PRF를 48시간 처리하여 Oil Red O 염색을 하였다. 충분히 분화된 3T3-L1 지방세포는 지방의 크기가 크고 밀집되어있는 반면, 양성대조군인 IBMX는 염색된 지방소적이 작아지거나 흔적만 있는 것으로 관찰되었다. PRF를 농도별로 처리하였을 때 10 ug/mL에서부터 염색된 지방소적이 연해지는 것을 확인하였으며 농도가 증가할수록 염색된 지방소적이 없어지는 것을 관찰하였고 40 ug/mL의 농도에서는 IBMX를 처리한 군과 같이 지방소적의 흔적만 남는 것이 관찰되었다(Figure 8. A). 염색된 지방소적을 정량화하여 분석한 결과 IBMX를 처리한 군에서는 대조군에 비해 약 10%의 지방함량이 감소하는 것으로 나타났으며 PRF의 농도가 증가할수록 지방소적의 함량이 유의적으로 감소하여, 40 ug/mL의 농도에서는 IBMX와 비슷한 함량을 보였다(Figure 8. B). 염색된 지방소적이 감소한다는 것은 축적된 지방이 글리세롤과 FFA로 분해하여 세포질 밖으로 분비하게 되는데, 분비되는 글리세롤의 함량을 측정된 결과 IBMX는  $5.59 \pm 0.12$  nmol/uL의 농도로 글리세롤 분비량이 유의적으로 높게 나타났으며 PRF는 농도가 증가할수록 각  $1.72 \pm 0.04$ ,  $2.21 \pm 0.26$ ,  $3.13 \pm 0.12$  nmol/uL로 유의적으로 증가하였다(Figure 8. C). 이는 PRF가 지방을 글리세롤과 FFA로 분해하여 지방소적을 감소시키는 것으로 판단된다.

PRF가 3T3-L1 지방세포의 지방을 글리세롤과 FFA로 분해하여 지방소적을 감소시킴에 따라 지방분화에 관여하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  그리고 지방합성에 관여하는 SREBP1과 FAS 발현에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에 PRF를 48시간 처리하여 발현 양상을 분석한 결과 대조군은 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  그리고 지방합성에 관여하는 SREBP1과 FAS 발현이 유지되고 있음을 확인하였다. IBMX를 처리한 군에서는 PPAR $\gamma$ 와

C/EBP $\alpha$  발현이 크게 감소되었으며 하위 인자인 SREBP1과 FAS 발현 또한 감소되고 있음을 확인하였다. PRF를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현이 감소되었고, 하위 인자인 SREBP1과 FAS 발현 또한 농도가 증가할수록 감소하는 것을 확인하였다(Figure 9. A). 유전자 발현 양상을 정량한 결과 IBMX를 처리하였을 때 4개의 발현인자 모두 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, PRF를 처리하였을 때 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현은 농도가 증가할수록 유의적인 감소 현상이 뚜렷하였으며, 지방합성에 관여하는 SREBP1는 유의성은 없었으나 감소하는 경향을 보이고 있었고 FAS 발현은 PRF 40 ug/mL의 농도에서 감소하였다(Figure 9. B). 이것은 PRF가 지방세포를 유지하게 하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현을 감소시키고 지방합성 인자들의 발현을 감소하여 지방세포의 유지와 기능을 잃어버리게 하는 것으로 판단된다.



**Figure 8. Lipolytic effects of PRF in mature 3T3-L1 adipocyte.** Differentiated 3T3-L1 cells were starved for 24h and treated with IBMX (0.5mM) and PRF (10, 20, 40 ug/mL) for 48h. (A) Differentiated adipocytes were stained with Oil Red O and stained triglycerides were presented at 200 X magnification. (B) The stained lipids were dissolved in isopropanol and measured at 520 nm by microplate reader. (C) Glycerol contents were determined in the culture medium. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, #p < 0.05, ##p < 0.01 compared to Con). Con: differentiated control.



**Figure 9. Effects of PRF on protein expressions related to adipogenesis in mature 3T3-L1 adipocyte.** Differentiated 3T3-L1 cells were starved for 24h and treated with IBMX (0.5 mM) and PRF (10, 20, 40 ug/mL) for 48h. Cells were lysed and western blot analysis. (A) Western blot analysis measured the PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP1, FAS and  $\beta$ -actin expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; #p < 0.05, ##p < 0.01 , \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, compared to control)

## 2) 지방분해 촉진 효과

앞선 결과에서 PRF는 분화된 3T3-L1 지방세포의 지방소적을 감소시켰고 지방분해로 인한 글리세롤이 세포 밖으로 분비되었으며, 지방세포의 항상성을 위한 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현이 감소시키는 결과를 얻었다. 따라서 지방분해가 어떠한 기작으로 글리세롤과 FFA로 분리되어 세포 밖으로 분비되는지를 분석하였다. IBMX를 양성대조군으로 PRF의 지방분해 기작을 비교 분석한 결과, IBMX는 PKA, HSL 인산화가 강하게 활성화된 것을 확인하였으며 PRF 또한 농도가 증가할수록 PKA와 HSL이 인산화가 강해지는 것을 확인하였다(Figure 10. A). 각 발현 양상을 정량한 결과 IBMX는 cAMP 증가로 인한 PKA 인산화가 대조군보다 6배 이상 증가하여 강한 활성을 보여주었고, PKA 하위 인자인 HSL 인산화 또한 대조군보다 8배 이상 강하게 활성을 나타내었다(Figure 10. B). PRF 역시 농도가 증가할수록 PKA의 인산화가 대조군에 비해 유의적으로 활성화를 보여 40 ug/mL의 농도에서 3배 이상의 활성을 보이고 있었으며, 하위 인자인 HSL 인산화 또한 농도가 증가할수록 유의적으로 강하게 활성화 되어 40 ug/mL의 농도에서 4배 이상의 강한 활성을 보였다(Figure 10. B). 따라서 PRF는 PKA 경로를 활성화시켜 지방분해를 촉진시킨다고 할 수 있다.

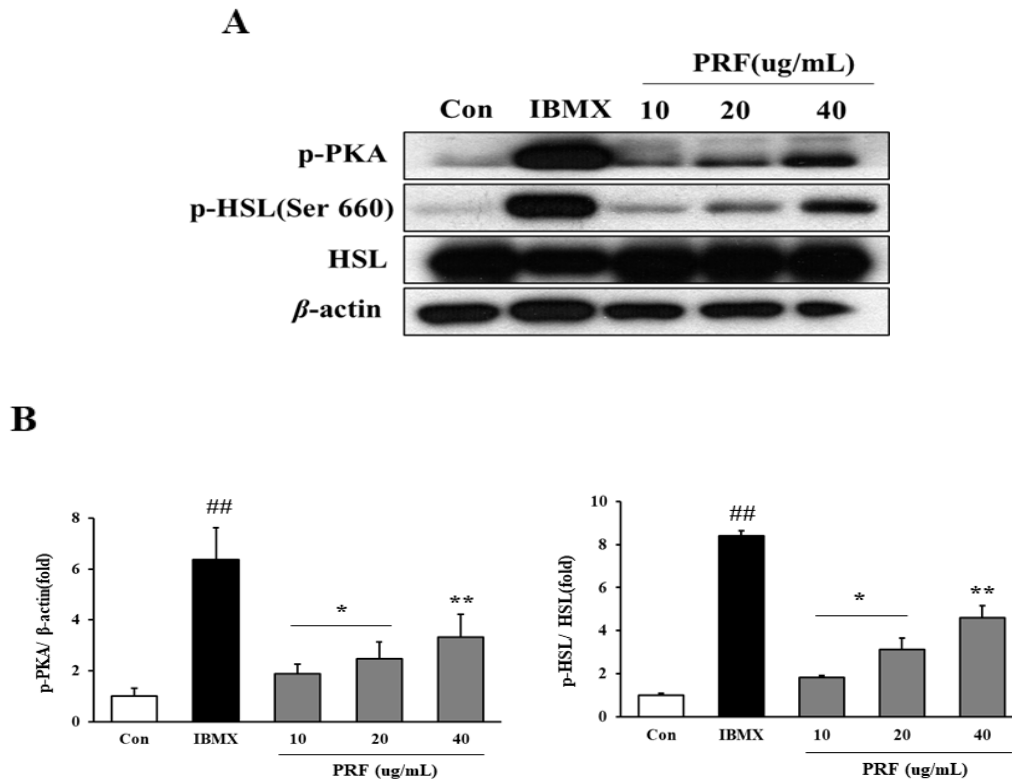


Figure 10. Effects of PRF on protein expressions related to lipolysis in mature 3T3-L1 adipocyte. Differentiated 3T3-L1 cells were starved for 24h and treated with IBMX (0.5 mM) and PRF (10, 20, 40 ug/mL) for 48h. Cells were lysed and western blot analysis. (A) Western blot analysis measured the p-PKA, p-HSL, HSL and  $\beta$ -actin expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, #p < 0.05, ##p < 0.01 compared to control)



### 3) 지방산화 촉진 효과

PRF는 PKA 경로를 통해 중성지방을 글리세롤과 FFA로 분해하고, 지방세포의 유지 및 지방합성이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 PRF가 지방산화 경로를 통해 분비된 글리세롤과 FFA를 소비하는지 분석하였다. 실험 결과 시료를 처리하지 않은 대조군은 AMPK와 ACC 인산화가 되지 않아 지방산화 활성이 없는 것을 확인하였고 IBMX를 처리한 군에서는 AMPK와 ACC 인산화가 강하게 활성화가 되어 지방산화가 강하게 나타나는 것을 확인하였다. PRF를 처리한 군에서는 농도가 증가할수록 AMPK와 ACC의 활성이 유의적으로 증가하고 있음을 보였다(Figure 11. A). 각 인산화에 대한 활성을 정량한 결과 PRF를 처리한 군은 AMPK 활성이 10 ug/mL의 농도부터 유의적인 결과가 나타났으며 40 ug/mL의 농도에서는 IBMX를 처리한 군과 비슷한 활성을 보였다. 또한 AMPK 활성화로 인한 하위 인자인 ACC 활성은 PRF 10 ug/mL에서 활성이 나타났지만 20 ug/mL의 농도에서부터 유의적인 활성화를 보였다(Figure 11. B). 따라서, PRF는 AMPK를 활성화시켜 ACC를 활성화시킴으로써 AMPK 경로를 통한 지방산화를 촉진시킨다고 볼 수 있다.

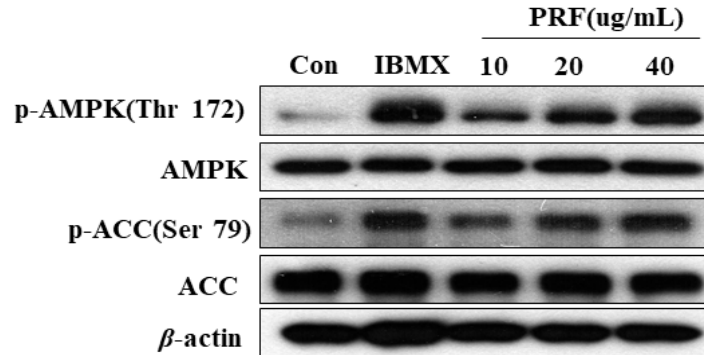
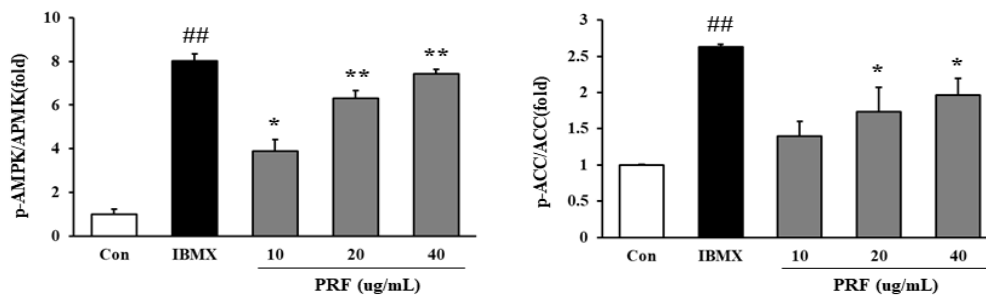
**A****B**

Figure 11. Effects of PRF on protein expressions related to fatty acid oxidation in mature 3T3-L1 adipocyte. Differentiated 3T3-L1 cells were starved for 24h and treated with IBMX (0.5 mM) and PRF(10, 20, 40 ug/mL) for 48h. Cells were lysed and western blot analysis. (A) Western blot analysis measured the p-AMPK, AMPK, p-ACC, ACC and  $\beta$ -actin expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, #p < 0.05, ##p < 0.01 compared to control)

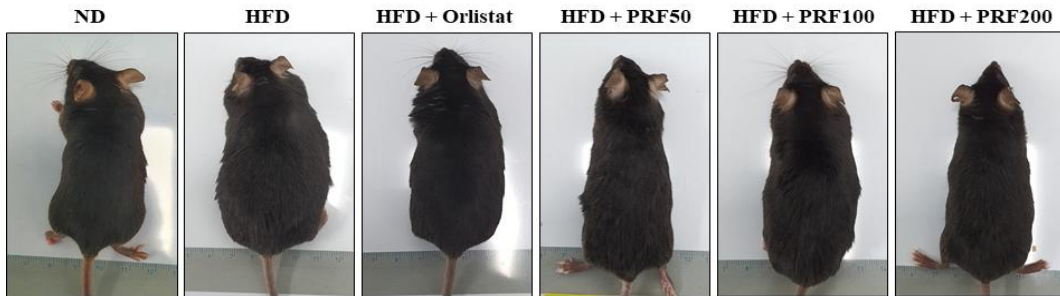
#### 4. 고지방 식이 유도 비만 생쥐에서 PMFs 다량 함유 분획물(PRF)의 비만 개선 효과

본 연구는 진균 잎에서 분리한 PRF가 고지방식이로 비만을 유도한 생쥐에서 비만 개선 효과가 있는지 조사하였다. C57BL/6 마우스를 무작위로 선발하여 일반식이군과 고지방식이군으로 구분한 후 5주 동안 비만을 유도 시켰다. 이후 고지방식이군을 무작위로 나누어 고지방식이군(HFD), orlistat군(HFD + orlistat 15.6 mg/kg/day), PRF군 (HFD + PRF 50 mg/kg/day, 100 mg/kg/day, 200 mg/kg/day)으로 나누어 5주간 경구투여하였다. 실험 종료 후 체중 증가량, 혈액 내 지표 분석, 인슐린 저항성, 조직 내 지방함량 분석 등을 수행하였다.

##### 1) 체중 감소 효과

5주간 고지방식이로 비만을 유도한 후 5주간 PRF를 경구투여한 결과 육안으로 비교하였을 때 고지방식이군이 몸집이 커져 있었고 orlistat와 PRF 군에서는 고지방식이군보다 몸집이 작은 것을 확인할 수 있었다(Figure 12. A). 총 10주간 체중 측정을 하여 분석 한 결과 비만 유도 기간 4주 후부터 일반식이군(ND)과 고지방식 군에서 체중이 차이가 나기 시작하였으며, 5주 후 일반식이군 27g, 고지방식이군은 평균 32g으로 유의적인 차이를 나타내었다. 경구투여 1주 후부터 고지방식이군과 orlistat 군, PRF 군의 유의적인 차이를 보이기 시작하였으며 경구투여 5주 후 체중을 측정한 결과 일반식이군  $28.73 \pm 0.3g$ 으로 체중 증가가 일어나지 않은 반면, 고지방식이군은  $43.26 \pm 5.68g$ 으로 일반식이군과 유의적인 차이를 보였다. Orlistat군은  $37.36 \pm 3.98g$ , PRF군은 각  $37.54 \pm 5.12g$ ,  $37.07 \pm 3.56g$ ,  $36.71 \pm 4.66g$ 으로 고지방식이군과 유의적으로 체중이 차이가 나타났다(Figure 12. B).

**A**



**B**

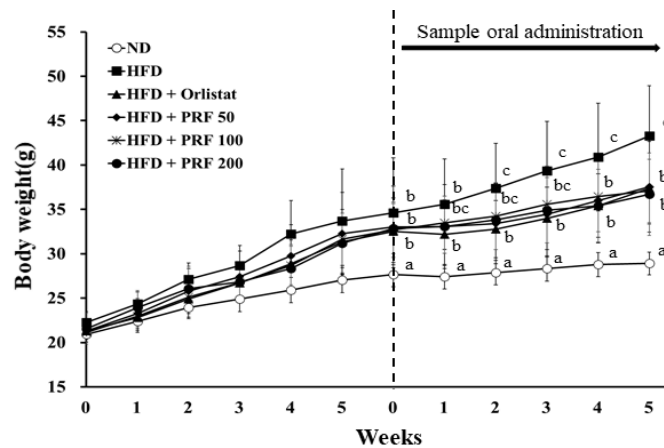


Figure 12. Effect of PRF on weight gain in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. Mice(n=7) were divided into high fat diet(HFD), HFD + orlistat(15.6mg/kg/day), HFD + PRF 50 (50 mg/kg/day), HFD + PRF 100 (100mg/kg/day), HFD + PRF 200 (200 mg/kg/day) groups and orally administered for 5 weeks after inducing obesity by ingesting a HFD for 5 weeks. (A) Representative photographs of each groups after the end of the experiment. (B) Body weight was monitored weekly. The results were expressed the means  $\pm$  S.D(n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test( $p < 0.05$ ). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

## 2) 체중 증가량 및 사료 섭취량, 조직 무게

PRF를 5주간 경구투여 후 체중 증가량, 먹이 섭취량 및 각 조직 무게를 비교 분석하였다(Table 2). 일반식이 군은  $27.64 \pm 1.26\text{g}$ 에서  $28.73 \pm 0.3\text{g}$ 으로  $1.26 \pm 0.3\text{g}$ 이 증가한 반면, 고지방식이군은  $34.6 \pm 6.20\text{g}$ 에서  $43.26 \pm 5.68\text{g}$ 으로  $8.66 \pm 1.2\text{g}$ 이 증가하여 체중 증가가 유도되었음을 확인할 수 있었다. Orlistat 군은  $32.53 \pm 3.78\text{g}$ 에서 5주 후  $37.36 \pm 3.98\text{g}$ 으로  $4.83 \pm 1.93\text{g}$  증가하여 고지방식이군보다 유의적으로 체중이 증가하지 않았으며 PRF 투여군의 체중 증가량도 각  $4.53 \pm 2.1\text{g}$ ,  $4.37 \pm 2.17\text{g}$ ,  $3.87 \pm 2.22\text{g}$ 으로 PRF 농도가 증가할수록 체중 증가량이 감소하는 경향을 보이고 있었다.

사료 섭취량은 총 5주 동안 일반식이 군이  $142.77 \pm 17.98\text{g}$ 으로 섭취하였으며 orlistat, PRF 투여군을 포함한 고지방식이군은 95 ~ 106g으로 섭취하여 일반식이군 보다 섭취량이 적었으나, 고지방식이군 내에서의 사료 섭취량은 차이를 보이지 않았다.

실험 종료 후 개복하여 신장과 비장의 무게를 측정한 결과 고지방식이군에서 신장과 비장의 무게가 각  $0.36 \pm 0.02\text{g}$ ,  $0.13 \pm 0.02\text{g}$ 으로 다른 군보다 유의적으로 무거웠으며, orlistat와 PRF 투여군은 모두 고지방식이군보다 적은 무게를 나타내었다.

Table 2. Effect of PRF on body weight, weight gain, food intake and organ weights

|                                 | Normal                      | HFD                       | HFD + Orlistat              | HFD + PRF 50                | HFD + PRF 100             | HFD + PRF 200              |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Initial weight(g)               | 27.64 ± 1.26 <sup>a</sup>   | 34.60 ± 6.20 <sup>b</sup> | 32.53 ± 3.78 <sup>b</sup>   | 33.01 ± 4.61 <sup>b</sup>   | 32.70 ± 3.11 <sup>b</sup> | 32.84 ± 2.83 <sup>b</sup>  |
| Final weight(g)                 | 28.73 ± 0.3 <sup>a</sup>    | 43.26 ± 5.68 <sup>c</sup> | 37.36 ± 3.98 <sup>b</sup>   | 37.54 ± 5.12 <sup>b</sup>   | 37.07 ± 3.56 <sup>b</sup> | 36.71 ± 4.66 <sup>b</sup>  |
| weight gain(g)                  | 1.26 ± 0.3 <sup>a</sup>     | 8.66 ± 1.20 <sup>c</sup>  | 4.83 ± 1.93 <sup>b</sup>    | 4.53 ± 2.10 <sup>b</sup>    | 4.37 ± 2.17 <sup>b</sup>  | 3.87 ± 2.22 <sup>b</sup>   |
| Food intake<br>(g/mouse/5weeks) | 142.77 ± 17.98 <sup>a</sup> | 96.43 ± 6.47 <sup>b</sup> | 106.63 ± 11.73 <sup>b</sup> | 101.09 ± 17.48 <sup>b</sup> | 91.44 ± 7.90 <sup>b</sup> | 95.77 ± 19.56 <sup>b</sup> |
| Kidney(g)                       | 0.30 ± 0.03 <sup>a</sup>    | 0.36 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.31 ± 0.04 <sup>a</sup>    | 0.35 ± 0.03 <sup>b</sup>    | 0.34 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.34 ± 0.03 <sup>b</sup>   |
| Spleen(g)                       | 0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>    | 0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>    | 0.08 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 0.09 ± 0.03 <sup>a</sup>   |

The results were expressed the means ± S.D(n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test(p<0.05). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction

### 3) 지질혈증 개선 효과

PRF가 체중 증가 억제에 따른 혈액 내 triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL) 함량을 분석하였다(Figure 13.). 고지방식이군은 TG와 TC 함량이 각  $1.97 \pm 0.31$  nmol/uL,  $2.65 \pm 0.79$  ug/uL로 일반식이 군( $1.23 \pm 0.18$  nmol/uL,  $1.56 \pm 0.21$  ug/uL) 보다 유의적으로 높게 나타나 고지방식으로 인한 비만 유도가 되어 혈액 지질혈증이 높아짐을 알 수 있었다. PRF를 투여한 군에서는 농도가 증가할수록 TG 함량이 각  $1.37 \pm 0.22$  nmol/uL,  $1.30 \pm 0.11$  nmol/uL,  $1.27 \pm 0.22$  nmol/uL로 고지방식이군보다 유의적으로 차이가 낮으며 일반식이 군과 같은 함량을 나타내었다. TC 함량은 각  $1.74 \pm 0.31$  nmol/uL,  $2.26 \pm 0.24$  nmol/uL,  $2.44 \pm 0.30$  nmol/uL로 PRF의 농도가 증가할수록 TC 함량이 증가하였다. 고지방식이군인 경우 TC 함량이 높은 이유는 HDL-cholesterol 함량보다 LDL-cholesterol 함량이 다른 군보다 높은 경향을 보이고 있기 때문이다. 반면 PRF 투여군은 LDL-cholesterol보다 HDL-cholesterol 함량이 고지방식이군보다 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 이는 PRF 투여군이 중성지방을 낮추고 HDL 콜레스테롤을 증가시켜 지질혈증을 개선한다고 판단된다.

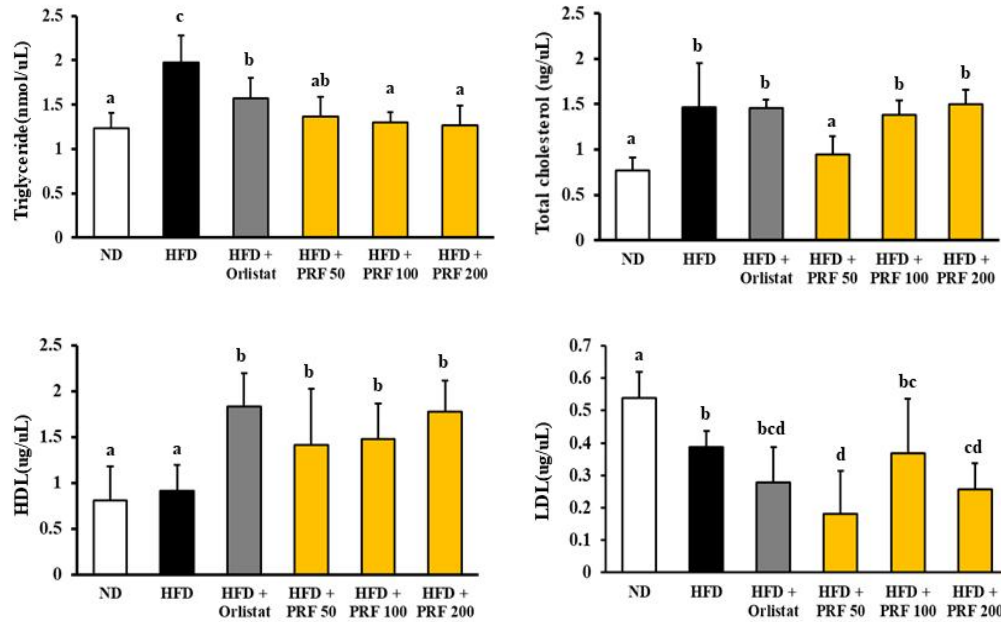


Figure 13. Effect of PRF on serum lipid profiles in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. The results were expressed the means  $\pm$  S.D (n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test(p<0.05). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.



#### 4) 내당능 및 인슐린 저항성 개선 효과

본 연구는 PRF가 고지방식이로 유도된 생쥐에서의 혈당 개선 및 인슐린 저항성에 영향을 미치는지 분석하였다. 실험이 종료된 마우스를 8시간 금식시켜 꼬리 정맥에서 공복혈당을 측정하였으며 2 g/kg의 glucose를 경구투여하여 시간별 혈당을 측정하였다. 이후 혈액에서 인슐린 농도 및 HOMA-IR을 분석하여 인슐린 저항성 개선 효과를 분석하였다.

##### (1) 내당능 개선 효과

8시간 동안 금식시킨 마우스에서의 공복 혈당은 일반식이 군에서  $133 \pm 9.18$  mg/dL이었으며 고지방식이군은  $226.67 \pm 35.06$  mg/dL로 공복혈당이 올라가 있었다. PRF 투여군에서는 각  $198.17 \pm 23.40$  mg/dL,  $186.00 \pm 14.94$  mg/dL,  $160.50 \pm 20.06$  mg/dL로 일반식이 군보다 높게 나타났지만, 고지방식이군과는 유의적인 차이를 나타내었다(Figure 14. A). 2 g/kg의 glucose를 경구투여하여 시간별 혈당을 측정한 결과 고지방식이군은 30분에서  $308.67 \pm 62.84$  mg/dL로 높게 나타났고 이후 120분에서도  $216.17 \pm 35.12$  mg/dL로 높은 혈당을 유지하여 고혈당 증세를 나타내었다. PRF를 투여한 군에서는 일반식이군에 비해 공복혈당이 올라갔으나 내당능 검사 30분 후에는 각  $228.5 \pm 10.43$  mg/dL,  $226.17 \pm 19.16$  mg/dL,  $226.17 \pm 24.90$  mg/dL로 고지방식이군과는 유의적인 차이를 보였으며 이후 시간이 경과할 수록 고지방식이군보다 빠른 회복을 보이고 있었다(Figure 14. B). 이는 PRF가 비만을 유도한 이후에도 혈당 개선 효과가 있다고 보여진다.

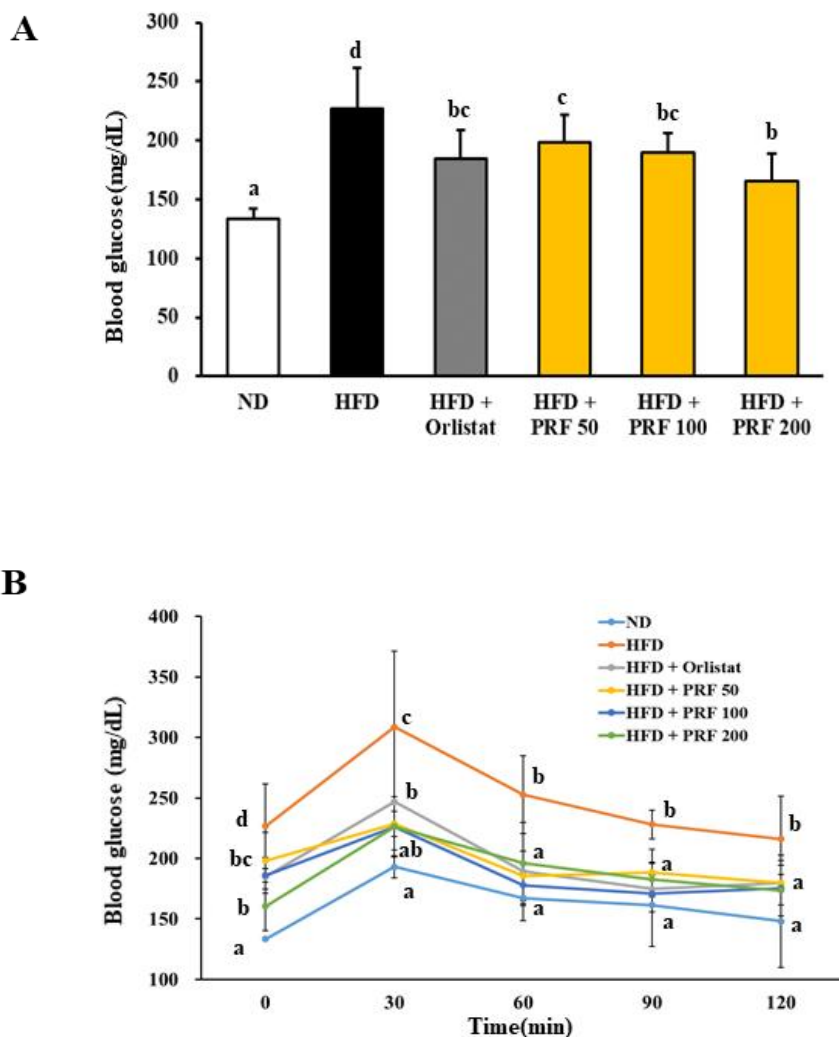


Figure 14. Effect of PRF on glucose tolerance in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. The mice were fasted for 8h before measuring blood glucose. (A) Fasting blood glucose levels were measured after 8h of fasting. (B) After oral administration of 2 g/kg glucose, blood glucose levels were measured at 30, 60, 90 and 120min. The results were expressed the means  $\pm$  S.D (n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

## (2) 인슐린 저항성 개선 효과

8시간 금식시킨 마우스의 혈액을 채취하여 혈액 내 인슐린 함량을 분석한 결과 고지방식이군에서의 인슐린 농도가  $55.17 \pm 26.17$  mU/L의 농도로 일반식이 군( $20.25 \pm 19.9$  mU/L)에 비해 두 배 이상의 인슐린 농도를 보이고 있었다. 이는 고지방식이군이 많은 인슐린 분비가 이루어짐에도 불구하고 혈당이 떨어지지 않는 고혈당 증세가 나타난 것이라 판단되었다. PRF를 투여한 군에서는 인슐린 농도가 각  $29.47 \pm 20.52$  mU/L,  $27.85 \pm 17.38$  mU/L,  $19.12 \pm 7.48$  mU/L의 농도로 PRF의 농도가 높은 군일수록 인슐린 분비량이 적었다(Figure 15. A). 공복혈당과 인슐린 분비량으로 HOMA-IR을 분석한 결과 고지방식이군이 인슐린 저항성이 가장 높게 나타나 고혈당 증세를 보이는 반면 PRF를 투여한 군에서는 농도가 올라갈수록 HOMA-IR 수치가 감소하는 경향이 뚜렷하였다(Figure 15. B). 이 결과는 PRF가 인슐린 저항성으로 인한 고혈당 증세를 개선할 수 있다고 판단된다.

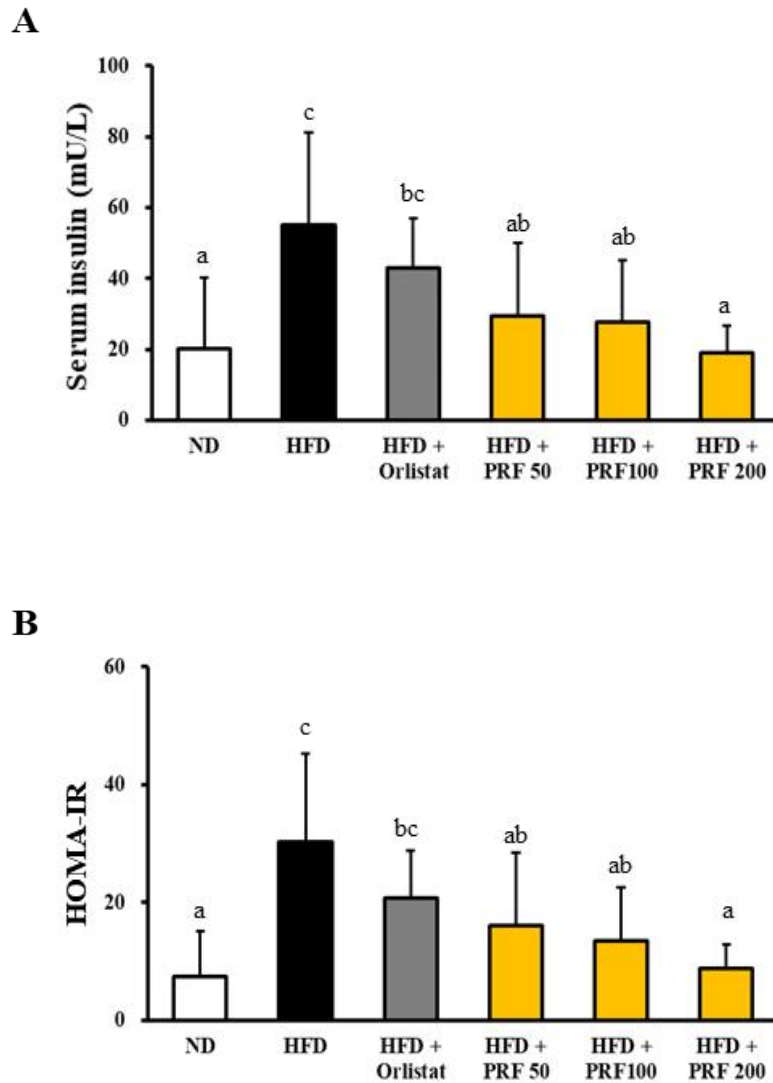


Figure 15. Effect of PRF on insulin resistance in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. The mice were fasted for 8h before measuring blood glucose. (A) After fasting 8h, bloods were collected and measured serum insulin levels and (B) HOMA-IR was calculated. The results were expressed the means  $\pm$  S.D (n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

## 5) 지방대사 조절 작용

본 연구는 PRF가 체중 증가를 억제한다는 결과를 근거로 지방조직의 무게 및 형태 그리고 지방대사 과정에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. 실험이 끝난 후 고환지방(epididymal fat) 과 신장주위지방(perirenal fat)을 적출하여 무게를 측정하였고, 고환지방을 염색하여 조직학적 형태를 분석하였다. 이후 western blot 분석으로 지방분해 및 지방산화에 대한 메커니즘을 분석하였다.

### (1) 지방합성 억제 효과

실험 종료 후 고환지방과 신장주위지방을 적출하여 군 간의 무게를 비교 분석하였다. 고환지방의 무게는 일반식이 군은  $0.67 \pm 0.17\text{g}$ 으로 나타났으며 고지방식이군은  $2.55 \pm 0.6\text{g}$  으로 일반식이 군보다 약 4배 정도의 무게로 커져 있었다. Orlistat 투여군은  $2.11 \pm 0.2\text{g}$ 으로 고지방식이군보다 낮았으나 PRF를 투여한 군에서는 각  $1.70 \pm 0.41\text{g}$ ,  $1.93 \pm 0.41\text{g}$ ,  $1.74 \pm 0.77\text{g}$ 으로 PRF 투여군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 모두 고지방식이군의 무게와 유의적인 차이를 나타내었다(Figure 16. A).

신장주위지방의 무게를 비교 분석한 결과 일반식이 군은  $0.19 \pm 0.07\text{g}$ 인 반면 고지방식이군은  $0.92 \pm 0.2\text{g}$ 으로 커져 있음을 확인하였다. Orlistat 투여군은  $0.67 \pm 0.17\text{g}$ 으로 고지방식이군보다 유의적으로 지방 무게가 적었으며, PRF 투여군은 각  $0.58 \pm 0.15\text{g}$ ,  $0.80 \pm 0.2\text{g}$ ,  $0.67 \pm 0.3\text{g}$ 으로 분획물 간 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 고지방식이군과의 무게와 유의적인 차이를 보였다(Figure 16. B). 이 결과에서는 PRF는 지방축적에 의한 체중 증가를 억제하는 것으로 판단된다.

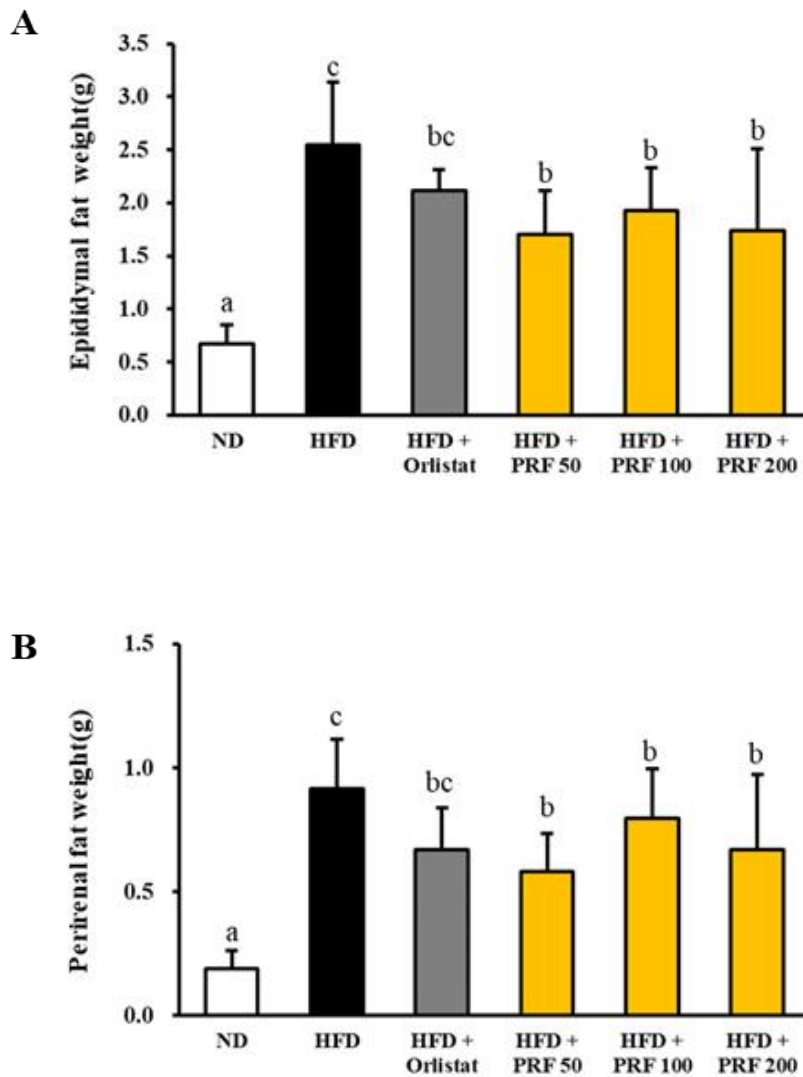


Figure 16. Effect of PRF on adipose tissue weights in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. (A) Epididymal fat tissue weight analysis for each group. (B) Perirenal fat tissue weight analysis for each group. The results were expressed the means  $\pm$  S.D (n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

## (2) 지방구 감소 효과

각 군의 고환지방을 적출하여 H&E 염색을 한 후 지방소적의 크기를 비교 분석하였다. 일반식이 군의 지방구는 크기가 작고 조밀한 반면 고지방식이군의 지방구는 크고 비대하였다. 이는 고지방식으로 인한 잉여 에너지가 지방으로 축적되어 지방구의 크기가 커짐으로 지방조직의 무게가 증가하였음을 나타낸다. Orlistat 투여군의 지방구는 고지방식이군에 비해 크기가 작아진 것을 확인하였고, PRF 투여군에서도 지방구의 크기가 작아진 것을 확인하였다. 특히 PRF 200 mg/kg 투여군에서는 일반식이 군과 같은 지방구의 크기를 보였다(Figure 17. A). 지방구의 크기를 수치화한 결과에서도 일반식이 군의 지방구 면적은  $5000 \text{ um}^2$  이하의 크기인 작은 지방구가 밀집되어 있는 반면 고지방식이군의 지방구 면적은 약  $15000 \text{ um}^2$ 로 일반식이 군보다 3배 정도의 크기를 가진 지방구가 밀집되어 있는 것으로 나타났다. Orlistat 투여군은 지방구 면적이 약  $10000 \text{ um}^2$ 의 크기로 고지방식이군보다 유의적으로 작은 지방구가 밀집되어 있는 것으로 나타났고, PRF를 투여한 군은 농도가 증가할수록 각  $7900 \text{ um}^2$ ,  $6900 \text{ um}^2$ ,  $4700 \text{ um}^2$ 의 작은 지방구 크기가 밀집되어 있어 고지방식이군, orlistat 투여군보다 유의적으로 차이가 있는 것을 확인하였다(Figure 17. B). 이는 PRF가 지방축적을 억제시키거나 또는 조직 내 지방을 분해시키는 효과를 보인다고 할 수 있다.

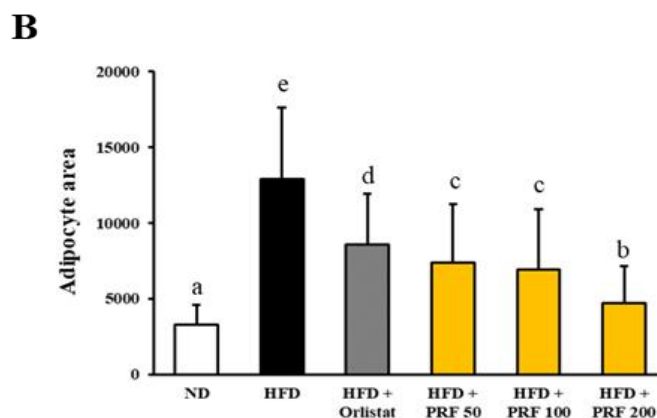
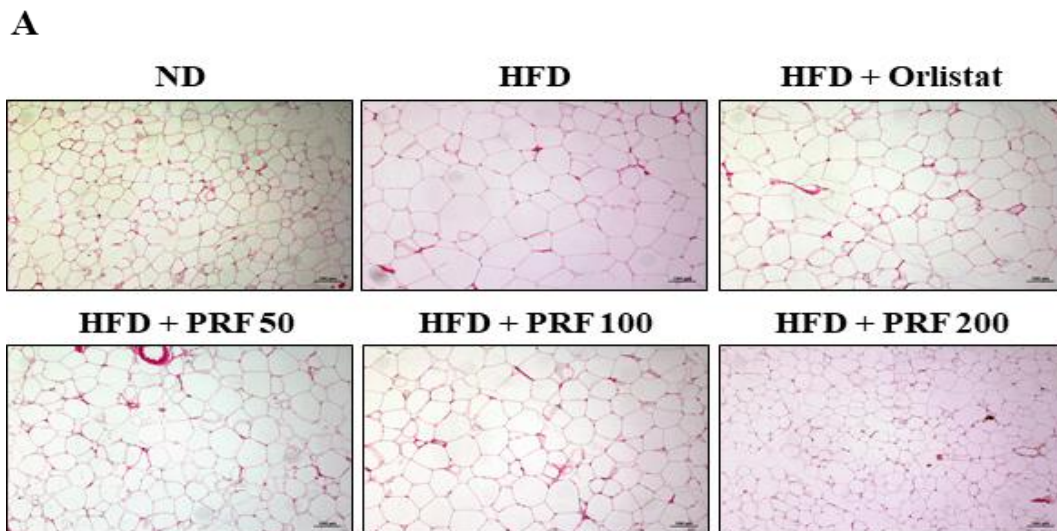


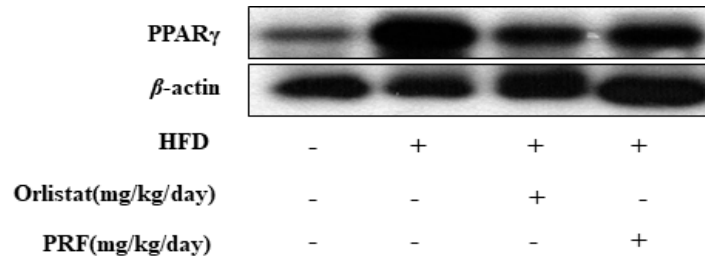
Figure 17. Effect of PRF on lipid droplets in epididymal adipose tissue of C57BL/6 mice induced by high fat diet. (A) photographs of a mice epididymal fat section stained with H&E staining after the end of the experiment (100X). (B) The epididymal adipocyte size of each group was presented as graphs. The results were expressed the means  $\pm$  S.D (n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.



### (3) PPAR $\gamma$ 발현억제 효과

앞선 결과에서 PRF는 3T3-L1 지방세포의 지방 형성 유지에 관여하는 PPAR $\gamma$  와 C/EBP $\alpha$  의 발현을 감소시켰고, 지방합성에 관여하는 FAS의 발현 또한 억제하였음을 밝혔다(Figure 9.). 따라서 이번 연구는 실제로 *in vivo* 에서 지방세포를 유지하는 PPAR $\gamma$ 의 발현이 감소하는지 분석하였다. 고지방식이군에서 일반식이 군보다 PPAR $\gamma$  발현이 강하게 나타나 지속적으로 지방 형성과 함께 유지하는 것으로 나타났으며 orlistat 투여군과 PRF를 투여한 군에서는 PPAR $\gamma$  발현 양상이 고지방식이군보다 뚜렷하게 감소되는 것으로 나타났다(Figure 18. A). 각 군의 PPAR $\gamma$  발현 양상을 정량한 결과 orlistat와 PRF 투여군에서 고지방식이군의 PPAR $\gamma$  발현 정도보다 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Figure 18. B). 이 결과는 PRF가 3T3-L1 지방세포와 동일하게 지방조직 내에서도 지방 형성 및 유지를 억제하는 것으로 판단된다.

**A**



**B**

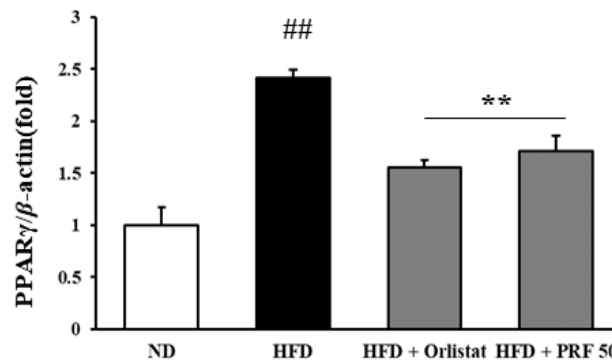
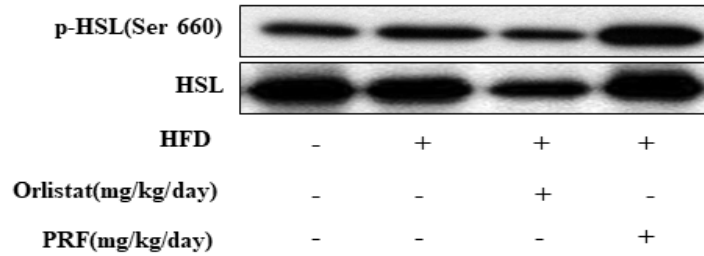


Figure 18. Effects of PRF on PPAR $\gamma$  expression in adipose tissue of C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. (A) Western blot analysis measured the PPAR $\gamma$  expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D. (n=3; ##p < 0.01 compared to ND, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared to HFD), ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

#### (4) 지방분해 촉진 효과

앞선 결과에서 PRF가 3T3-L1 지방세포에서 PKA를 활성화하여 PKA 경로를 통해 지방분해를 촉진한다고 하였다(Figure 10.). 따라서 이번 연구에서는 고지방식으로 비만을 유도한 생쥐에서 PRF가 PKA 경로를 통한 지방분해 기작으로 지방분해를 일으키는지 분석하였다. 결과에서 보듯이 일반식이 군과 고지방식이군에서는 HSL 활성이 차이가 없게 나타났으며, orlistat를 투여한 군에서 HSL 활성이 떨어지는 결과를 보였다. PRF 50 mg/kg을 투여한 군에서는 HSL 인산화가 고지방식이군보다 높게 나타났다(Figure 19. A). HSL의 인산화를 정량한 결과 일반식이 군과 고지방식이군에서는 유의적인 차이가 나지 않았으며, orlistat 투여군은 고지방식이군보다 유의적인 감소가 나타났다. 이전연구에서 orlistat는 HSL을 억제시키는 결과로 지방분해를 저해한다고 보고되고 있어(Clifford *et al*, 2000, Iglesias *et al*, 2016) 이번 연구에서도 orlistat는 HSL의 활성을 저해하는 것으로 판단된다. PRF 투여군에서는 HSL 활성이 다른 군보다 유의적으로 활성이 높게 나타남을 알 수 있었다(Figure 19. B). 따라서 PRF는 고지방식으로 비만을 유도한 생쥐에서도 HSL 활성을 촉진하여 지방분해를 일으킨다고 판단된다.

**A**



**B**

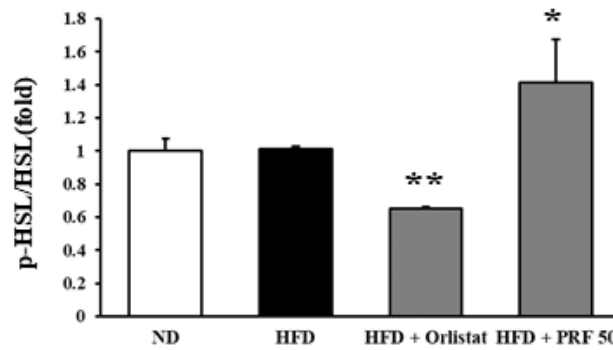
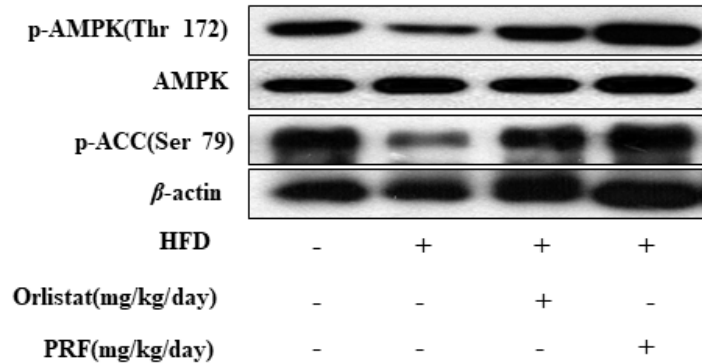


Figure 19. Effects of PRF on protein expressions related to lipolysis in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. (A) Western blot analysis measured the p-HSL and HSL expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D. (n=3; ##p < 0.01 compared to ND, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared to HFD), ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

#### (5) 지방산화 촉진 효과

앞선 결과에서 고지방식이로 유도된 비만 생쥐에서 PRF가 지방합성을 억제시키고 지방분해를 촉진하는 결과를 보였다. 지방분해로 증가하는 글리세롤과 FFA는 3T3-L1 지방세포에서 AMPK의 경로로 지방산화를 일으키는 것을 확인하였다(Figure 11.). 이번 연구는 고지방식이로 비만을 유도한 생쥐에서 PRF가 AMPK 경로를 통해서 지방산화가 촉진하는지 분석하였다. 고지방식을 섭취한 고지방식이군에서는 AMPK와 ACC 활성이 일반식이 군보다 감소하는 경향이 나타났으며 orlistat를 투여한 군에서는 AMPK 활성은 일반식이 군과 고지방식이군과 차이가 나지 않았지만, ACC의 인산화가 강하게 나타나는 것이 관찰되었다. 반면, PRF 50 mg/kg을 투여한 군에서는 AMPK와 ACC 인산화가 강하게 나타났다(Figure 20. A). 인산화된 발현 양상을 정량한 결과에서도 AMPK 활성은 일반식이 군과 고지방식이군 그리고 orlistat 투여군에서는 유의적인 차이를 보이지 않고 있지만, PRF 50 mg/kg 투여군에서는 AMPK의 활성이 유의적으로 높아진 것을 확인하였다. 또한 ACC 활성은 고지방식이군에서 유의적으로 감소한 것이 나타났으며, orlistat와 PRF 50 mg/kg 투여군에서는 ACC 활성이 유의적으로 높게 나타남을 알 수 있었다(Figure 20. B). 따라서 PRF는 3T3-L1 지방세포에서 AMPK 경로를 통해 지방산화를 일으키는 것과 같이 비만을 유도한 생쥐에서도 지방산화를 일으키는 것으로 판단된다.

**A**



**B**

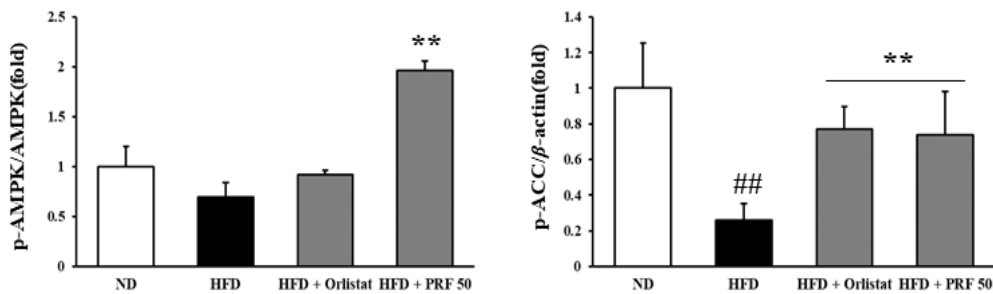


Figure 20. Effects of PRF on protein expressions related to fatty acid oxidation in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. (A) Western blot analysis measured the p-AMPK, AMPK, p-ACC and  $\beta$ -actin expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D. (n=3; ##p < 0.01 compared to ND, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared to HFD). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

## 6) 지방간 개선 효과

본 연구는 고지방식이로 5주 동안 비만을 유도한 후 PRF를 5주간 투여하여 간 기능 개선에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. 실험 종료 후 혈액 내 GOT, GPT를 분석하였고 간을 적출하여 무게 측정 및 H&E 염색으로 조직학적 형태를 분석하였다.

### (1) 지방간 억제 효과

각 군의 간을 적출하여 간 무게를 측정하였고 H&E 염색을 하여 지방간 생성을 분석하였다. 고지방식이군의 간은 지방구가 전반적으로 넓게 퍼져있는 전형적인 지방간의 형태를 보이고 있었으며 orlistat 투여군과 PRF 투여군의 간 조직은 일반식이 군의 간 조직 형태와 비슷하게 지방구의 형태가 거의 없음을 관찰하였다(Figure 21. A), 간 무게를 측정한 결과에서도 고지방식이군에서  $1.53 \pm 0.43\text{g}$ 으로 다른 군과는 유의적으로 높게 나타나 간 조직 내 지방 축적이 일어난 것을 알 수 있었으며 orlistat 투여군은 간 조직 무게가 다른 군과 유의적으로 낮게 나타나 지방간을 개선하는 효과를 보였다. PRF 투여군의 간 조직 무게는 각  $1.32 \pm 0.12\text{g}$ ,  $1.15 \pm 0.15\text{g}$ ,  $1.25 \pm 0.08\text{g}$ 으로 고지방식이군과 큰 차이를 보였으며, 일반식이 군보다도 유의적으로 낮게 나타났다(Figure 21. B). 이는 PRF가 지방간 개선에 효과가 있음을 시사한다.

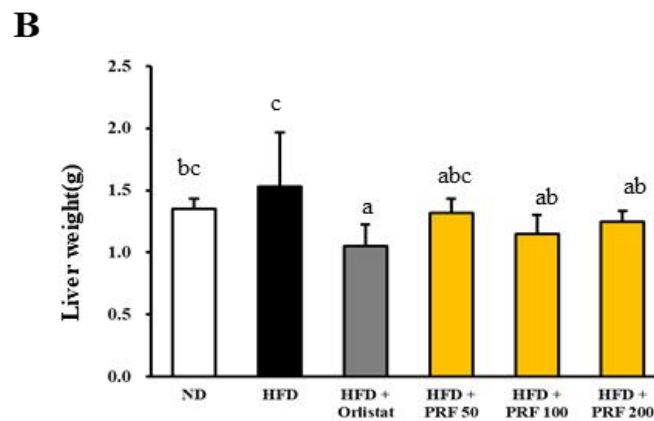
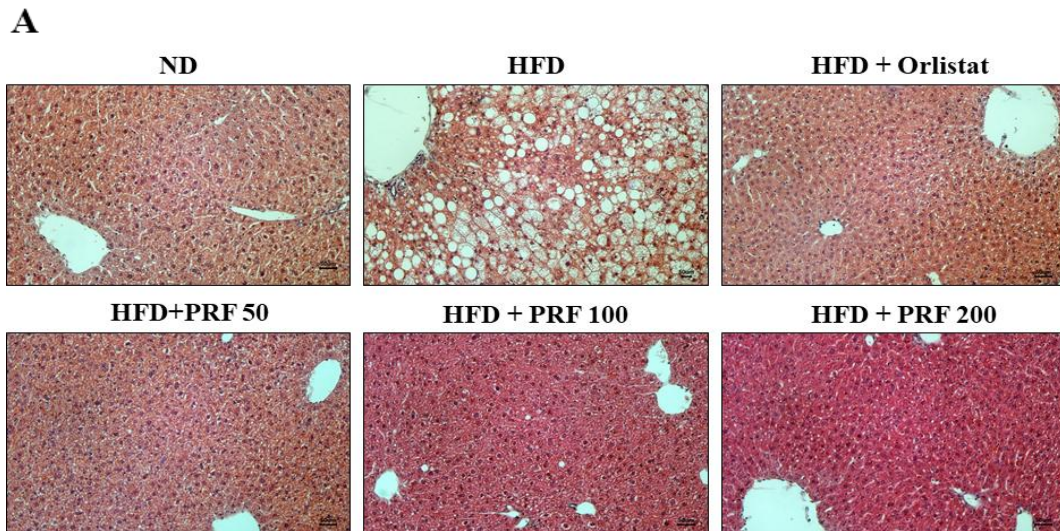


Figure 21. Effect of PRF on liver morphology in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. (A). photographs of a mice liver stained with H&E staining after the end of the experiment (200X). (B) Liver weight analysis for each group. The results were expressed the means  $\pm$  S.D (n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test( $p < 0.05$ ). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.



## (2) 간 기능 개선 효과

PRF가 고지방식이로 비만을 유도한 생쥐에서 간 기능 개선 효과가 있는지 알아보기 위해 혈액 내 GOT, GPT 분석을 하였다(Figure 22.). 고지방식이군의 GOT 수치는  $28.62 \pm 8.62$  IU/L로 일반식이 군  $24.26 \pm 5.25$  IU/L보다 다소 높게 나타났다. Orlistat 투여군의 GOT 수치는  $23.54 \pm 3.43$  IU/L로 고지방식이군보다 낮은 수치를 보였고, PRF 투여군에서는 분획물의 농도 간 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 각  $18.04 \pm 2.73$  IU/L,  $20.28 \pm 4.14$ ,  $17.11 \pm 5.08$  IU/L로 일반식이, 고지방식이군, orlistat 투여군보다 유의적으로 함량이 낮은 것으로 분석되었다. GPT 수치를 분석한 결과에서는 고지방식이군이  $12.95 \pm 5.29$  IU/L로 다른 군보다 유의적으로 수치가 높게 분석되었다. 이는 고지방식이군이 지방간으로 인한 간 손상이 시작되었다고 보여진다. Orlistat 투여군은  $6.85 \pm 1.09$  IU/L로 고지방식이군과 유의적인 차이를 보여 GOT, GPT 수치를 분석하였을 때 지방간으로 인한 간 기능 손상을 어느 정도 개선했다고 볼 수 있다. PRF를 투여한 군의 GPT 수치는 각  $5.83 \pm 2.60$  IU/L,  $5.98 \pm 0.54$  IU/L,  $6.73 \pm 1.24$  IU/L로 유의적으로 낮은 수치를 보여주었다. 이는 PRF가 orlistat와 같이 지방간으로 인한 간기능손상 개선에 효과가 있음을 보여준다.

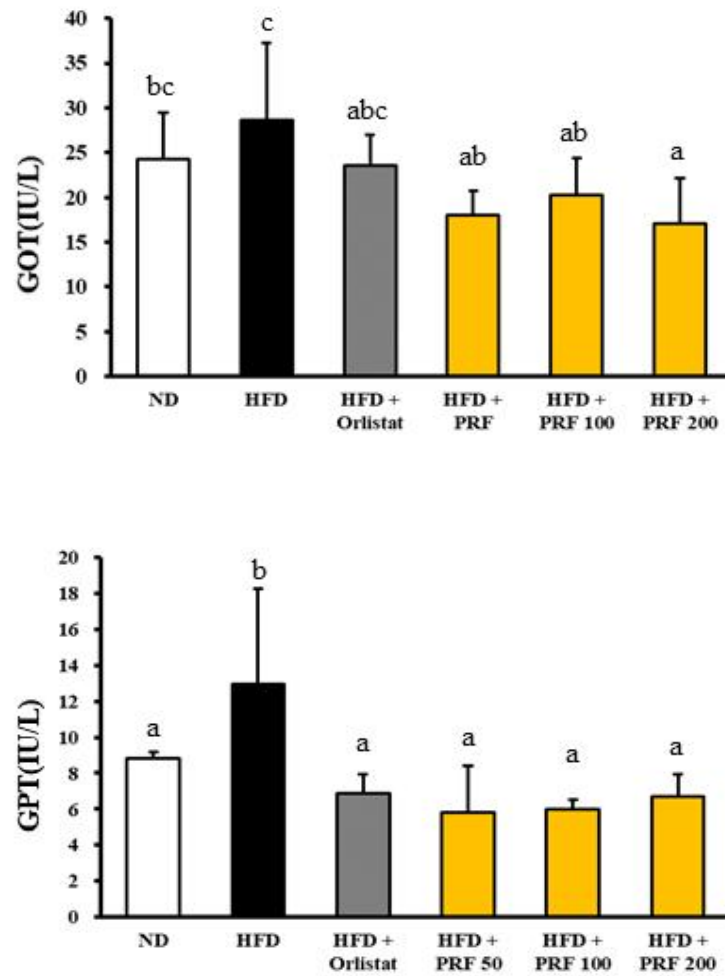
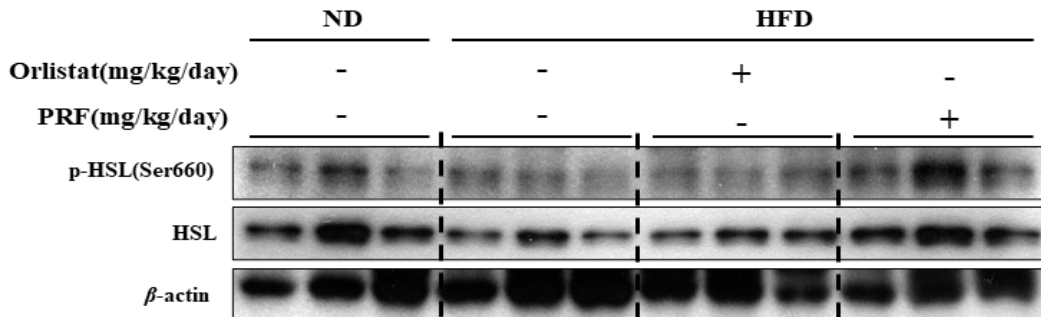


Figure 22. Effect of PRF on serum GOT, GPT levels in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. The results were expressed the means  $\pm$  S.D (n=7) and analyzed using a one way ANOVA followed by Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ ). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

### (3) 지방분해 촉진 효과

앞선 결과에서 PRF가 고지방식으로 비만을 유발한 생쥐의 간에서 지방간을 억제하고 간 기능을 개선시켰다고 하였다. 이번 연구는 지방간 억제 효과가 지방분해 기작과 관련이 있는 것인지 분석하였다. 고지방식이군의 간 조직은 HSL 활성이 나타나지 않아 지방분해 기작이 일어나지 않음을 확인하였으며, orlistat 투여군에서도 지방조직과 같이 HSL 활성을 억제시키는 결과를 보여주었다(Figure 23. A). 그러나 PRF 투여군에서는 HSL 활성이 고지방식이군보다 유의적으로 높은 활성을 보이고있어(Figure 23. B), 지방조직과 같이 간 조직에서도 PRF가 PKA/HSL 활성 경로를 통해 지방분해를 촉진하고 있다고 보여진다.

**A**



**B**

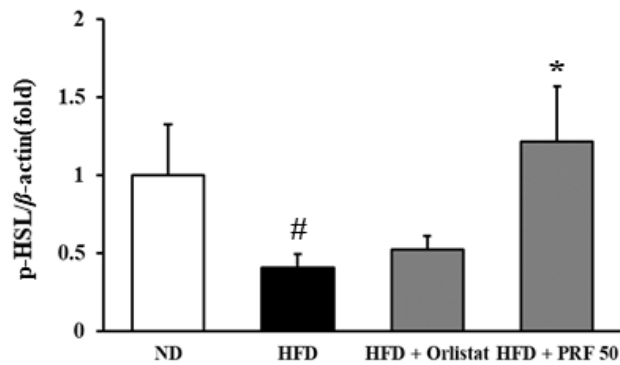


Figure 23. Effects of PRF on protein expressions related to lipolysis in liver of C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. (A) Western blot analysis measured the p-HSL and HSL expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; ##p < 0.01 compared to ND, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared to HFD), ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

#### (4) 지방산화 촉진 효과

앞선 결과에서 PRF가 고지방식이로 비만을 유도한 생쥐의 지방간 축적 억제에는 PKA/HSL 활성화 경로를 통한 지방분해로 보여진다고 하였다. 다음은 간 조직 내에서 분해된 글리세롤과 FFA가 AMPK/ACC 활성화 경로를 통해 지방산화가 일어나고 있는지 분석하였다. 고지방식이군에서의 간 조직은 일반식이군보다 AMPK 활성이 어느 정도 일어나는 것으로 나타났지만, ACC 활성은 일반식기와 같이 활성화되지 않고 있었다(Figure 23. A). 그러나 orlistat와 PRF 투여군에서는 모두 AMPK와 ACC 활성이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 밴드의 발현 양상을 정량화한 결과 orlistat와 PRF 투여군이 AMPK 활성이 고지방식이군보다 약 2배 정도 활성이 나타남을 보였고, ACC 활성은 orlistat군보다 높은 활성이 나타났다(Figure 23. B). 이는 지방조직과 같이 간 조직 내에서도 PRF가 PKA/HSL 활성화 경로를 통해 지방을 분해할 뿐만 아니라 AMPK/ACC 활성화 경로를 통해 지방을 산화시키는 것을 알 수 있었다.

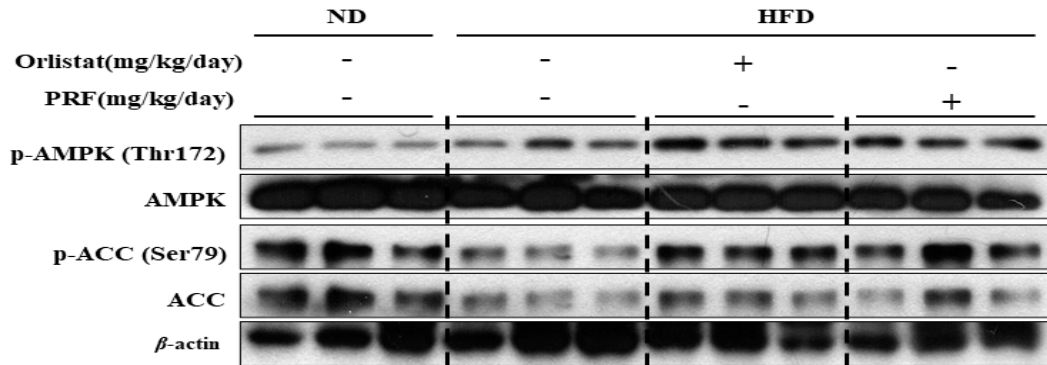
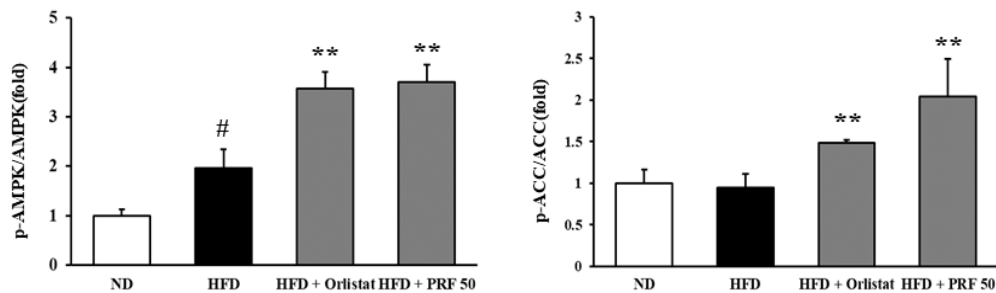
**A****B**

Figure 24. Effects of PRF on protein expressions related to fatty acid oxidation in liver of C57BL/6 obese mice induced by high fat diet. (A) Western blot analysis measured the p-AMPK, AMPK, p-ACC and ACC expression. (B) The intensity of each band was determined using ImageJ. The results are expressed the means  $\pm$  S.D.(n=3; ##p < 0.01 compared to ND, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared to HFD). ND, normal diet; HFD, high-fat diet; PRF, polymethoxyflavones-rich fraction.

## IV. 고 찰

제주에서 자생 또는 재배되고 있는 감귤류는 naringin, hesperidin, rutin, PMFs 등 다양한 플라보노이드를 함유하고 있다고 알려져 있다. 건강 증진 효능을 가진 플라보노이드 중에서 nobiletin, sinensetin, tangeretin을 포함한 PMFs 류는 진귤 과피에서 가장 높게 검출된다고 알려져 있다(Choi et al, 2007). 예로부터 진귤 과피는 약용으로 사용되고 있지만, 진귤 잎은 미활용되고 있기에 진귤 잎의 기능성 생물 소재로서의 활용 가능성에 관한 연구가 필요한 실정이다.

진귤 과피의 PMFs 함량은 과실의 성숙 단계에 따라 다르며(Choi et al, 2007), 미성숙 과피 추출물의 PMFs 3종의 함량[sinensetin (4.23 mg/g), nobiletin (38.83 mg/g), tangeretin (55.13 mg/g)]은 성숙 과피추출물의 함량[sinensetin (0.91 mg/g), nobiletin (8.67 mg/g), tangeretin (14.52 mg/g)]보다 높다(Shin et al, 2011, Kang et al, 2012). PMFs는 사람의 건강에 유익한 다양한 생리활성을 나타내기 때문에 본 연구에서는 PRFs를 효율적으로 획득하기 위한 생물자원을 발굴하기 위해 진귤 과실과 잎의 PMFs 3종 함량을 비교분석 하였다. 성숙한 진귤 과실과 잎에서 tangeretin, nobiletin, sinensetin 순으로 함량이 많게 나타났으나 총 PMFs 함량은 성숙된 과실보다 잎에서 3배 정도 높다는 것을 확인하였다. 이는 PMFs를 다량 함유한 분획물을 획득하기에는 채취 기간이 한정적인 미성숙에 비해 연중 채취 가능한 잎을 활용하는 것이 더 효율적임을 제시해주었다. 따라서 미활용되는 진귤 잎을 사용하여 PMFs 다량 함유 분획물(PRF)을 효율적으로 획득하는 간편한 추출 방법을 확립하여 PRF 획득한 후, PRF의 비만 개선 효과를 *in vitro* 와 *in vivo* 에서 분석하였다.

진귤 잎에서 분리한 PRF는 3T3-L1 지방세포 분화에 주요 인자인 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  의 발현 및 지방합성에 관여하는 SREBP1 과 FAS의 발현을 억제하여 지방분화 및 지방합성을 저해시켰다. 감귤류 과피에서 분리한 PMFs의 일종인 nobiletin과 tangeretin 또는 수종의 PMFs 화합물로 구성된 복합물은 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제한다고 알려져 있다(Choi et al, 2011, Kanda et al, 2012,

He *et al*, 2015, Tung *et al*, 2018). 본 연구에서 사용한 진굴 잎 유래 PRF의 화합물 조성 또한 nobiletin과 tangeretin 함량이 높기에 당연히 지방세포 분화 억제 활성을 보이는 것으로 사료된다. PRF는 전사인자인 PPAR $\gamma$ 2 발현을 억제함으로써 3T3-L1 전구 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 나타났다. 지방세포 분화 및 지방형성에 주요한 인자로 작용하는 PPAR $\gamma$ 은 두 종류의 형태인 PPAR $\gamma$ 1과 PPAR $\gamma$ 2로 구분되는데 PPAR $\gamma$ 1 보다 30개 아미노산이 더 많은 PPAR $\gamma$ 2가 지방세포 분화에 중요하다. 이는 zinc finger repressor protein 55(ZFP55)의 발현은 PPAR $\gamma$ 1 발현에는 영향을 미치지 않지만, PPAR $\gamma$ 2의 발현을 50% 이상 감소시켜 지방세포 분화를 50% 감소시키며, PPAR $\gamma$ 2를 과발현시켰을 때 PPAR $\gamma$ 1의 과발현보다 지방세포 분화를 회복시킨다는 보고가 있기 때문이다 (Ren *et al*, 2002, Zhu *et al*, 2005). 따라서 PRF는 지방세포 분화의 필수 인자인 PPAR $\gamma$ 2의 발현을 억제하고 아울러 C/EBP $\alpha$ 의 발현 및 FAS와 aP2의 지방합성 인자를 억제하여 지방세포 분화를 억제한다고 사료된다. 또한 분화된 지방세포에서 PPAR $\gamma$ 의 중요한 역할은 지방세포의 특성을 지속적으로 유지시킬수 있도록 하위유전자의 발현을 유도하는 것이다(Tamori *et al*, 2002). 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에서 PRF를 처리한 결과 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현이 감소하였다. 따라서 분화된 3T3-L1 지방세포에서 PRF는 PPAR $\gamma$ 의 발현을 억제시켜 분화된 지방세포의 특성을 잃어버리게 하는 효과를 보인다고 할 수 있다.

3T3-L1 지방세포에서 sinensetin, nobiletin, tangeretin은 PKA 경로를 통해 지방분해를 촉진한다고 알려져 있다(Saito *et al*, 2007, Kang *et al*, 2015, Ting *et al*, 2013). 이처럼 PMFs류 중 단일 화합물에 관한 연구는 많이 보고되었지만, PMFs 복합물에 대한 시너지 효과에 관한 연구는 미흡하다. Phosphodiesterase inhibitor인 IBMX는 세포내 cAMP의 농도를 증가시켜 PKA 경로를 통한 지방분해를 촉진시킨다고 알려져 있다(Elks *et al*, 1984, Chen *et al*, 1998, Boone *et al*, 1999). HSL의 인산화는 cAMP 농도가 증가할 때 PKA 인산화를 통해 HSL Ser563 과 Ser660 부위의 활성화가 되어 지방분해를 조절한다. 본 연구에서도 PRF는 PKA/HSL 경로를 통해 지방분해를 유도한다고 판단된다.

공복으로 에너지를 공급받지 못하거나 운동 등 많은 에너지가 필요할 때 지방조직은 PKA 경로를 통해 중성지방이 분해하여 글리세롤과 FFA를 세포질 밖



으로 분비한다. 분비된 글리세롤과 FFA는 지방산화를 통해 ATP를 생성하여 에너지를 공급하는데 주요한 기작은 AMPK 경로를 통해 조절된다(Li *et al*, 2021). HSL은 AMPK의 하위인자로 작용한다고 알려져 있으며 AMPK $\alpha$  Thr172 부위의 활성화는 HSL Ser565 부위를 인산화시켜 HSL Ser660과 Ser563 부위의 인산화를 저해함으로써 지방분화 기작을 억제한다(Wang *et al*, 2018). 본 연구에서는 PRF가 분화된 지방세포에서 AMPK $\alpha$  Thr172의 인산화가 및 하위인자인 ACC Ser79 부위의 인산화를 촉진하였다. 이는 PRF가 지방세포에서 AMPK/ACC 활성화 경로를 통해 지방산화를 촉진한다고 판단되지만, AMPK 활성화로 인한 HSL의 활성 억제와 PMFs의 작용 기전에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

최근 들어 PMFs에 의한 대사증후군 및 항비만 연구들이 많이 진행되고 있다(Feng *et al*, 2019, Zeng *et al*, 2020, Zhang *et al*, 2020). 하지만 이 연구들은 대부분 고지방식이와 PMFs를 동시에 투여하는 동물 모델로 비만 예방 효능을 평가하는 것이라 할 수 있다. 본 연구는 고지방식으로 비만을 유도한 비만 쥐를 대상으로 PRF가 비만 치료 혹은 개선 효과를 평가하기 위해 수행하였다. 정상 식이군의 체중에 비교해서 고지방 식이한 생쥐의 체중은 5주 후에 유의적으로 증가하였다. 이렇게 고지방식으로 유도된 비만 생쥐들은 고지방식이와 orlistat 혹은 PRF를 5주간 구강 투여하였다. Orlistat는 미국 FDA에서 승인된 비만 치료제로 pancreatic lipase 저해제로 위장에서 지방 흡수를 방해하여 체중을 감소시키는 약품이다(Heck *et al*, 2000). Orlistat 군과 마찬가지로 PRF 투여군은 유의적인 체중 감소 효과를 나타내었다. PRF 투여군 간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았지만, 저농도의 PRF 투여군(50 mg/kg of BW)의 낮은 농도에서도 orlistat 투여군과 같은 체중 억제 효과를 나타내었고 또한 PRF 농도가 증가할수록 체중 억제 효과는 관찰되었지만, PRF 투여에 의한 독성효과는 확인되지 않았다.

PRF는 혈액 내 지질 프로파일을 개선하는 것으로 나타났다. 고지방식이 군은 혈액 내 TG, TC, LDH 함량은 높고 HDL 함량은 낮았다. 반면에, orlistat 군과 PRF 투여군에서는 고지방식으로 유도된 지질이상혈증을 유의적으로 개선하였다. 비만으로 유발되는 제2형 당뇨병은 인슐린이 분비되더라도 혈당이 간 또는 지방에 흡수가 되지 않아 고혈당으로 인한 심각한 합병증을 일으킬 수 있다. 비만 생쥐에서 PRF가 포도당 대사에 미치는 영향을 분석하였다. PMFs 복합물은

fructose로 유도된 인슐린 저항성을 개선한다고 보고된 바 있다(Li et al, 2006). 고지방식이로 유도된 비만 쥐에서 공복혈당은 정상식이 군보다 높았지만, orlistat 및 PRF 투여군은 고지방식이 군보다 공복혈당이 유의적으로 낮은 결과를 보여주었다. 특히 내당능 검사 결과 및 HOMA-IR 수치로 볼 때 PRF는 고지방식이로 유도된 인슐린 저항성을 개선하였다. 다만, 포도당 항상성 및 인슐린 저항성 개선에 PRF가 어떤 기작으로 작용하는지에 대한 추가 연구가 필요하다.

3T3-L1 지방세포에서 PRF는 PKA 활성화/AMPK 활성화를 통해 지방분해/지방산화를 촉진함을 보여주었다. 실제로 비만 쥐에서도 이러한 작용이 일어나는지 분석하였다. 고지방식이 군의 지방조직의 지방세포는 크기가 크고 무거운 반면, orlistat와 PRF 투여군은 고지방식이 군보다 지방세포 크기가 작은 지방세포가 밀집된 것을 확인하였다. 특히, PRF 농도가 증가할수록 지방세포의 크기가 작아지는 결과는 PRF가 지방세포 내 지방 축적을 감소시켜 체중 감소 효과를 나타낸다고 사료된다. 실제로 PRF는 지방조직에서 PKA/HSL 경로를 활성화하여 지방분해를 촉진하였고, AMPK/ACC 경로를 활성화하여 지방산화를 촉진하였다. 하지만, PKA 경로와 AMPK와 경로 간의 상세 기작에 대한 추가 연구가 필요하다.

비만 쥐의 간 조직에 PRF가 어떠한 영향이 있는지 분석하였다. 비만이 유도된 고지방식이 군의 간 조직은 전형적인 지방간 형태를 하였지만, PRF와 orlistat 투여군의 간 조직은 지방구 수가 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 간 조직 무게 및 간 손상 척도인 GOT/GPT 수치 또한 고지방식이 군에 비해 PRF와 orlistat 투여군에서는 유의적으로 개선되었다. 고지방식이로 인한 비만 관련 지표변화 연구에 따르면 지방간은 12주 이상 고지방식이 군을 섭취하였을 때 뚜렷하게 관찰할 수 있다(Song et al, 2016). 본 연구는 10 주간의 고지방 식이의 결과임을 감안하면 본 연구의 고지방식이 군의 간 조직 무게 및 간 손상 수치는 지방간 증상이 시작되고 있는 시점이라고 판단된다. 그렇지만 PRF 투여한 군 모두 간 조직 무게 및 GOT/GPT 수치가 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. PRF의 지방간 개선 효과는 지방조직의 경우와 마찬가지로 HSL 활성화 및 AMPK/ACC 활성화를 통해 지방분해 및 지방산화를 촉진한다고 사료되며, PRF가 지방간 및 간 기능을 개선하는 상세한 기작 연구가 필요하다.

요약하면, 본 연구는 미활용 진굴잎을 활용하여 PMFs를 다량 함유한 분획물 (PRF)를 획득하는 간편한 방법을 확립하였다. 그리고 진굴 유래 PRF는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 PKA/HSL 경로를 통한 지방 분해와 AMPK/ACC 경로를 통한 지방산산화를 촉진하였다. 따라서 PRF는 비만으로 인한 체중 증가 및 인슐린 저항성, 지방간 등을 개선할 수 있는 기능성 소재로 활용할 수 있다고 사료된다 (Figure 25).

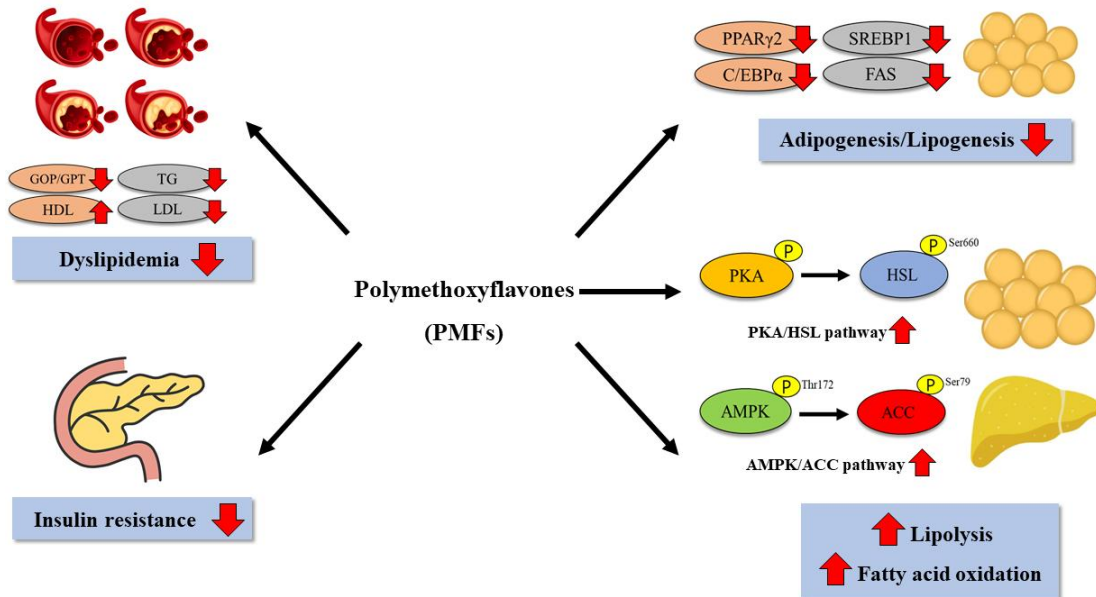


Figure 25. The anti-obesity properties exerted by PRE in C57BL/6 obese mice induced by high fat diet.

## V. 참고문헌

- 질병관리본부. 2019. 2019 국민건강통계. 보건복지부(국가승인통계 제117002호, 국민건강영양조사)
- Ahmed, O.M.; AbouZid, S.F.; Ahmen, N.A; Zaky, M.Y.; Liu, Han. 2021. An up-to-date review on citrus flavonoids: chemistry and benefits in health and diseases. *Curr. Pharm. Des.* 27(4), 513-530.
- Anthonsen, M.W.; Rönstrand, L.; Wernstedt, C.; Degerman, E.; Holm, C. 1998. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J. Biol. Chem.* 273(1), 215-221.
- Bijland, S.; Mancini S.J.; Salt, I.P. 2013. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin. Sci. (Lond)*. 124(8), 491-507.
- Boone, C.; Grégoire, F.; Remacle, C. 1999. Various stimulators of the cyclic AMP pathway fail to promote adipose conversion of porcine preadipocytes in primary culture. *Differentiation*. 64, 225-262.
- Carmen, G.Y.; Victor, S.M. 2006. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell. Signal*. 18(4), 401-408.
- Chang, E.; Kim, C.Y. 2019. Natural products and obesity: A focus on the regulation of mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Molecules*. 24(6), 1157.

- Chen, T. C.; Hinton, D.R.; Zidovetzki, R.; Hofman, F.M. 1998. Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induced differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab. Invest.* 78(2), 165-174.
- Cheung, B.M.Y.; Cheung, T.T.; Samaranyake, N.R. 2013. Safety of antiobesity drugs. *Ther. Adv. Drug. Saf.* 4(4), 171-181.
- Choi, S.Y.; Ko, H.C.; Ko, S.Y.; Hwang, J.H.; Park, J.G.; Kang, S.H.; Han, S.H.; Yun, S.H.; Kim, S.J. 2007. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol. Pharm. Bull.* 20(4), 772-778.
- Choi, Y.M.; Kim, Y.H.; Ham, H.M.; Park, Y.H.; Jeong, H.S.; Lee, J.S. 2011. Nobiletin suppresses adipogenesis by regulating the expression of adipogenic transcription factors and the activation of AMP-activated protein kinase(AMPK). *J. Agric. Food. Chem.* 59(24), 12843-12849.
- Clifford, G.M.; condos, C.; Kraemer, F.B.; Vernon, R.G.; Yeaman, S.J. 2000. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275(7), 5011-5015.
- Daval, M.; Fougelle, F.; Ferré, P. 2006. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J. Physiol.* 574(pt 1), 55-62.
- de Sá, P.M.; Richard, A.J.; Hang, H.H.; Stephens J.M. 2017. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Compr Physiol.* 7(2), 635-674.

- Egan, J.J.; Greenberg, A.S.; Chang, M.K.; Wek, S.A.; Moos Jr, M.C.; Londos, C. 1992. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(18), 8537-8541.
- Elks, M.L.; Manganiello, V.C. 1984. Selective effects of phosphodiesterase inhibitors on different phosphodiesterases, adenosine 3',5'-monophosphate metabolism, and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology.* 115(4), 1262-1268.
- Engin, A. 2017. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 960, 1-17.
- Feng, K.; Zhu, X.; Chen, T.; Peng, B.; Lu, M.; Zheng, H.; Guang, Q.; Ho, C.T.; Chen, Y. Cao, Y. 2019. Prevention of obesity and hyperlipidemia by heptamethoxyflavone in high-fat diet-induced rats. *J. Agric. Food Chem.* 67(9), 2476-2489.
- Gadde, K.M.; Martin, C.K.; Verthoud, H.R.; Heymsfield, S.B. 2018. Obesity: pathophysiology and management. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71(1), 69-84.
- Gao, Z.; Gao, W.; Zeng, S.L.; Li, P.; Liu, E.H. 2018. Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of citrus polymethoxyflavones. *Journal of functional foods.* 40, 498-809.
- GBD 2015 obesity collaborators. 2017. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N. Engl. J. Med.* 277(1), 13-27.

- Ghaben, A.L.; Scherer, P.E. 2019. Adipogenesis and metabolic health. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 20(4), 242–258.
- Gierach, M.; Gierach, J.; Ewertowska, M.; Arndt, A. Junik, R. 2014. Correlation between body mass index and waist circumference in patients with metabolic syndrome. *ISRN. Endocrinol.* 514589, doi : 10.1155/2014/514589.
- Gouni-Berthold, I.; Berthold, H.K. 2019. Current options for the pharmacotherapy of obesity. *Curr. Pharm.* 25(18), 2019–2032.
- Greenberg, A.S.; Shen, W.J.; Muliro, K.; Patel, S.; Souza, S.C.; Roth, R.A.; Kraemer, F.B. 2001. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276(48), 45456–45461.
- Gregoire, F.M.; Smas, C.M.; Sul, H.S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78(3), 783–809.
- Guru, A.; Issac, P.K.; Velayutham, M.V.; Sraswathi, N.T.; Arshan, A.; Arockiaraj, J.A. 2021. Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds. *Mol. Biol. Rep.* 48(1), 743–761.
- Heck, A.M.; Yanovski, J.A.; Calis, K.A. 2000. Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacotherapy.* 20(3), 270–279.
- Hsu, C.L.; Yen, G.C. 2006. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol. Nutr. Food. Res.* 50, 1072–1079.



- He, Y.F.; Liu, F.Y.; Zhang, W.X. 2015. Tangeritin inhibits adipogenesis by down-regulating C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , and PPAR $\gamma$  expression in 3T3-L1 fat cells. *Genet. Mol. Res.* 14(4), 13642–13648.
- Iglesias, J.; Lamontagne, J.; Erb, H.; Gezzar, S.; Zhao, S.; Joly, E.; Truong, V.L.; Skorey, K.; Crane, S.; Madiraju, S.R.M; Prentki, M. 2016. Simplified assays of lipolysis enzymes for drug discovery and specificity assessment of known inhibitors. *J. Lipid. Res.* 57(1), 131–141.
- Jio, X.; Wang, Y.; Lin, Y.; Lang, Y.; Li, E.; Zhang, X.; Zhang, Q.; Feng, Y.; Meng, X. 2019. Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6J mice by modulating the gut microbiota. *J. Nutr. Biochem.* 64, 88–100.
- Kanda, K.; Nish, K.; Kadota, A.; Nishimoto, S.; Liu, M.C.; Sugahara, T. 2012. Nobiletin suppresses adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by an insulin and IBMX mixture induction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820(4), 461–468.
- Kang, S.H.; Lee, Y.J, L, C.H.; Kim, S.J.; Lee, D.H.; Lee, Y.K.; Park, D.B. 2005. Physiological activities of peel of Jeju-indigenous *Citrus sunki* Hort. Tanaka. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37(6), 983– 988.
- Kang, S.I.; Shin, H.S.; Kim, H.M.; Hong, Y.S.; Yoon, S.A.; Kang, S.W.; Kim, J.H.; Kim, M.H.; Ko, H.C.; Kim, S.J. 2012. Immature citrus sunki peel extract exhibits antiobesity effects by  $\beta$ -oxidation and lipolysis in high-fat diet-induced obese mice. *Biol. Pharm. Bull.* 35(2), 223–230.

- Kang, S.I.; Shin, H.S.; Kim, S.J. 2015. Sinensetin enhances adipogenesis and lipolysis by increasing cyclic adenosine monophosphate levels in 3T3-L1 adipocytes. *Bio. Pharm. Bull.* 38(4), 552-558.
- Kim, Y.; Park, C.W. 2016. Adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy. *Kidney. Res. Clin. Pract.* 35(2), 69-77.
- Ko, H.C.; Jang, M.G.; Kang, C.H.; Lee, N.H.; Kang, S.I.; Lee, S.R.; Park, D.B.; Kim, S.J. 2010. Preparation of a polymethoxyflavone-rich fraction(PRF) of *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka and its antiproliferative effects. *Food Chemistry.* 123, 484-488.
- Laurencikiene, J.; Skurk, T.; Kulyté, A.; Hedén, P.; Aström, G.; Sjölin, E. 2011. Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96(12), E2045-2049.
- Li, R.W.; Theriault, A.G.; Au, K.; Douglas, T.D.; Casaschi, A.; Kurowska, E.M.; Mukherjee, R. 2006. Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. *Life. Sci.* 79(4), 365-373.
- Li, Z.; Li, J.; Miao, X.; Gui, W.; Miao, L.; Cai, L. 2021. A minireview: Role of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in Obesity-related renal injury. *Life Sci.* Jan 15;265: 118828.
- Lipovka, Y.; Konhilas, J.P. 2015. AMP-activated protein kinase signalling in cancer and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Pharm. Open. Access.* 4(3), 154. doi: 10.4172/2329-6607.1000154.

- Mahmoud, A.M.; Hernández Butista, R.J.; Sandhu, M.A.; Hussein, O.E. 2019. Beneficial effects of citrus flavonoids on cardiovascular and metabolic health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 10, 2019:5484138 doi: 10.1155/2019/5484138
- Mattews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28(7), 412-419.
- Raman, G.; Jayaprakasha, G.K.; Cho, M.; Brodbelt, J.; Patil, B.S. 2005. Rapid adsorptive separation of citrus polymethoxylated flavones in non-aqueous conditions. *Separation and purification technology.* 45(2), 147-152.
- Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 31, 659-661.
- Ren, D.; Collingwood, T.N.; Rebar, E.J.; Wolffe, A.P.; Camp, H.S. 2002. PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes. Dev.* 16(1), 27-32.
- Rosen, E.D.; MacDougald, O.A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7(12), 885-896.
- Rui, L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 4(1), 177-197.

- Saito, T.; Abe, D.; Sekiya, K. 2007. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis 3T3-L1 adipocytes. *Bilchem. Biophys. Res. commun.* 357(2), 371-376.
- Saklayen, M.G. 2018. The global epidemic of the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 20(2), 12. doi: 10.1007/s110-6-018-0812-z.
- Saponaro, C.; Gaggini, M.; Carli, F.; Gastaldelli, A. 2015. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients.* 7(11), 9453-9474.
- Shin, H.S.; Kang, S.I.; Ko, H.C.; Kim, H.M.; Hong, Y.S.; Yoon, S.A.; Kim, S.J. 2011. Anti-inflammatory effect of the immature peel extract of *Jinkyool*(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka). *Food Science and Biotechnology.* 20(5), 1235-1241.
- Song, M.Y. 2016. The study of the changes of obesity-relating biomarkers in high fat fed-induced C57BL/6 mice. *J. korean. Med. Obes. Res.* 16(1), 19-26.
- Su, C.L.; Sztalryd, C.S.; Contreras, J.A.; Holm, C. Kimmel, A.R.; Londos, C. 2003. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278(44), 43615- 43619.
- Tamori, Y.; Masugi, J. Nishino, N.; Kasuga, M. 2002. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 51(7), 2045-2055.

- Tang, Q.Q.; Zhang, J.W.; Lane, M.D. 2004. Sequential gene promoter interactions by C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318(1), 213-218.
- Ting, Y.; Li, C.C.; Pan, M.H.; Ho, C.T.; Huang, Q. 2013. Effect of a labile methyl donor on the transformation of 5-demethyltangeretin and the related implication on bioactivity. *J. Agric. Food. Chem.* 61(24), 8090-8097.
- Tenenbaum, A.; Motro, M.; Schwannenthal, E. Fisman, E.Z. 2004. Macrovascular complications of metabolic syndrome: an early intervention is imperative. *Int. J. Cardiol.* 97(2), 167-172.
- Tung, Y.C.; Chang, W.T.; Ching, J.C.; Badmeav, V.; Ho, C.T.; Pan, M.H. 2018. Citrus peel extracts attenuated obesity and modulated gut microbiota in mice with high-fat diet-induced obesity. *Food. Funct.* 20;9(6), 3363-3373.
- Tung, Y.C.; Hsieh, P.H.; Pan, M.H. 2017. Cellular model for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *J. Food. Drug. Anal.* 25(1), 100-110.
- Wang, C.Y.; Liao, J.K. 2012. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods. Mol. Biol.* 821, 421-433.
- Wang, Q.; Liu, S.; Zhai, A.; Zhang B.; Tian, G. 2018. AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation. *Bio. Pharm. Bull.* 41(7), 985-993.

World Health Organization. 2020. Obesity and overweight. online at:  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

Zeng, S.L.; Zhen, S.; Xiao, P.T.; Cai, Y.Y.; Chu, C.; Chen, B.Z.; Li, P.; Li, J.; Liu, E.H. 2020. Citrus polymethoxyflavones attenuate metabolic syndrome by regulating gut microbiome and amino acid metabolism. *Sci. Adv.* 6(1): eaax6208. doi: 10.1126/sciadv.aax6208.

Zhang, M.; Zhe, J.; Zhang, X.; Zhao, D.G.; Ma, Y.Y.; Li, D.; Ho, C.T.; Huang, Q. 2020. Aged citrus peel(chenpi)extract causes dynamic alteration of colonic microbiota in high-fat diet induced obese mice. *Food. Funct.* 11(3), 2667-2678.

## VI. 요약

Polymethoxyflavones (PMFs)는 감귤류에서만 발견되는 플라보노이드로 제주 재래귤 중에서는 진귤에서 PMFs 함량이 가장 높다고 보고된 바 있다. PMFs는 건강에 유익한 다양한 생리활성을 나타내기 때문에 PMFs를 다량 함유하는 분획물(PMFs-rich fraction, PRF)을 획득하기 위한 방법 개발이 필요하다. 본 연구에서는 진귤 과실과 잎에 함유된 PMFs 함량을 비교하여 잎이 과실보다 PMFs 함량이 3배 정도 높음을 확인하여 잎으로부터 PMFs를 다량 함유하는 분획물 PRF를 획득하였다. 또한 진귤 잎 유래 PRF의 비만 개선 효과를 *in vitro*와 *in vivo*에서 분석하였다.

본 연구의 *in vitro* 모델로는 3T3-L1 전구지방세포를 사용하였다. PRF를 분화 유도물질과 공동 처리하였을 때 PRF는 지방세포로의 분화를 농도 의존적으로 억제하였다. PRF는 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )와 CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBP $\alpha$ ) 발현을 억제함으로써 sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), fatty acid synthase (FAS), adipocyte fatty-acid-binding protein 2 (aP2)의 발현을 억제함을 확인할 수 있었다. 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에 PRF를 처리하면, 지방세포의 항상성 유지에 필요한 PPAR $\gamma$ 와 CEBP $\alpha$ , SREBP1, FAS의 발현은 감소했지만, protein kinase A/sterol regulatory element-binding protein 1(HSL)의 활성화가 일어나 지방분해는 촉진됨을 확인할 수 있었다. 또한, 완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에서 PRF는 AMP-activated protein kinase (AMPK)/acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 인산화를 증가시켜 지방산화를 촉진할 수 있음을 확인하였다.

*In vitro*에서 얻은 실험결과를 바탕으로 고지방 식이로 유도된 비만 생쥐에서 PRF의 항비만 효능을 평가하였다. 5 주령 C57BL/6 수컷 생쥐에 고지방식이를 5 주 동안 공급하여 비만을 유도하였다. 고지방 식이로 유도된 생쥐는 고지방식이 군(고지방식이 + 0.1% carboxymethyl cellulose), orlistat 투여군 (고지방식이 +

15.6 mg orlistat/kg of BW), PRF 투여군 (고지방식이 + 50, 100, 200 mg of PRF/kg of BW)으로 나누어 5주간 경구 투여하였다. PRF 및 orlistat 투여군의 체중 증가량, 지방조직, 비장, 신장 무게는 고지방식이군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. PRF 투여군은 고지방식이군에 비해 혈장 내 triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL) 함량은 낮고 high-density lipoprotein (HDL) 함량은 높았다. 이 결과는 PRF 투여로 고지방식이로 유도된 지방이상혈증이 개선되었음을 나타낸다. 또한, PRF 및 orlistat 투여군은 고지방식이군에 비해 내당능이 개선된 것을 확인할 수 있었다. PRF 투여군은 공복 시 인슐린 분비량이 농도 의존적으로 감소하였고, homeostasis model assessment - insulin resistance (HOMA-IR) 분석으로 산출한 인슐린 저항성도 개선되었다.

각 실험군의 지방조직을 hematoxylin and eosin (H&E) 염색하여 비교한 결과, PRF 투여군의 지방구의 크기는 고지방식이군의 지방구 크기보다 작았다. PRF에 의한 항비만 효과의 분자적 기전을 알아보기 위해서 각 실험군의 지방조직에서 지방 대사와 관련된 단백질들의 발현 양상을 분석하였다. PRF 투여는 지방조직에 유지에 필요한 인자인 PPAR $\gamma$ 의 발현을 감소시켰고, 지방분해를 촉진하는 HSL의 인산화를 증가시켰다. 또한 PRF 투여는 AMPK/ACC 경로를 활성화하여 지방산화를 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 각 실험군의 간 조직을 분석한 결과, PRF는 고지방식이로 유도되는 지방간 생성을 저해하여 간 기능을 개선하는 작용을 할 것으로 사료되었다. 요약하면, 본 연구는 진굴 잎을 사용하여 효율적으로 PRF 획득하는 방법을 확립하였고, PRF는 *in vitro* 및 *in vivo* 에서 지방분해 및 지방산 산화를 촉진함으로써 항비만 효능을 나타냄을 보여주었다.