

고지방식이를 섭취한 마우스에서 나린진과 나린진-사이클로덱스트린 포접화합물의 지질대사에 대한 영향 비교

전 선 민[†] · 최 명 숙

경북대학교 식품영양학과 및 식품영양유전체연구센터

Comparison of the Effects of Cyclodextrin-Naringin Inclusion Complex with Naringin on Lipid Metabolism in Mice Fed a High-Fat Diet

Seon-Min Jeon[†] and Myung-Sook Choi

Dept. of Food Science and Nutrition and Center for Food and Nutritional Genomics, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Naringin has antioxidant and antihyperlipidemic properties, however, phenolic compounds including naringin are unstable in the presence of light, heat and oxygen. Beta-cyclodextrin (β -CD) is a cyclic heptamer composed of seven glucose units that enhances the stability and solubility of molecules through the formation of inclusion complexes. This study was conducted out to compare the effects of CD-naringin (CD-N) inclusion complexes with naringin on lipid metabolism in high fat-fed animals. Male C57BL/6 mice were fed either CD-N (0.048%, w/w) or naringin (N, 0.02%, w/w) in a 20% high-fat (HFC, 15% lard, 5% corn oil, w/w) diet for 10 weeks. Orlistat (Xenical, 0.01%, w/w) was used as a positive control (PC). There were no differences in body weight, food intake, liver and heart weights, plasma triglyceride(TG), leptin, adiponectin, resistin, IL-1 β and IL-6 concentrations, and hepatic β -oxidation, carnitine palmitoyl transferase(CPT), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and malic enzyme activities between the HFC and CD-N groups or between the HFC and N groups. However, both CD-naringin and naringin supplementation led to a significant reduction in the epididymal and perirenal white adipose tissue weights, plasma free fatty acid, insulin and blood glucose concentrations, hepatic cholesterol and TG contents and hepatic fatty acid synthase (FAS), phosphatidate phosphohydrolase (PAP) and HMG-CoA reductase activities compared to the HFC group. The plasma HDL-cholesterol concentration was significantly higher in CD-N and N groups than in HF and PC groups. These results indicate that both CD-naringin and naringin supplementation effectively improved plasma and hepatic lipid metabolism without differences between CD-N and naringin groups.

Key words : Cyclodextrin-naringin inclusion complex, naringin, high-fat diet, lipid metabolism.

서 론

최근 경제 성장과 식생활의 서구화, 생활환경의 편리화 등으로 인한 운동 부족, 유전적 인자 등 여러 가지 원인에 의해 비만 인구가 크게 증가하고 있고, 우리나라를 비롯하여 전세계적으로도 큰 사회적 문제가 되고 있다. 미국의 경우 인구의 33% 및 26%가 각각 과체중 및 비만으로 보고되고 있으며, 우리나라에서도 2007년 국민건강영양조사 결과 비만 인구가 1998년 26.3%에서 2005년 31.7%로 급증하고 있다. 현대의학의 급속한 발달에도 불구하고 비만 인구는 매우 빠른 증가 추세에 있는데, 비만은 허혈성 심질환, 뇌졸중, 당뇨병,

고혈압, 이상지혈증, 근골격계 질환, 각종 암 등의 중요한 위험 인자이므로 이제는 비만을 적극적인 예방과 치료를 필요로 하는 중요한 질병으로 인식하고 있다. 비만을 비롯한 관련 질환들은 대사증후군(metabolic syndrome)이라는 공통된 대사이상 상태와 연관되어 있으며, 열량 과잉 섭취 및 미량 영양소 결핍에 의한 영양 불균형, 운동 부족, 정신적 스트레스 등이 대사증후군의 발생 증가의 중요한 원인으로 대두되고 있다(Lakka *et al* 2002).

비만을 비롯한 여러 성인병 발병률이 증가함에 따라 질병 예방 및 개선을 위한 일환으로 천연물을 소재로 한 건강기능 식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 그중에서도 특히 천연 식물에 함유된 대표적인 생리활성 성분인 polyphenolic compounds 및 flavonoids의 기능성에 대한 연구가 활발하게 진행

[†] Corresponding author : Seon-Min Jeon, Tel : +82-53-950-7937, E-mail : smjeon@knu.ac.kr

되어 왔다. Flavonoid는 식물의 담황색 또는 노란색 색소화합물로서, 그 중 naringin은 감귤피, 포도 등에 많이 함유되어 있는데, 항균(Kim *et al* 1998), 항염증(Tsai *et al* 1999), 항혈소판(Higashimoto *et al* 1998) 및 항암 작용(Le Marchand *et al* 2000) 등이 잘 알려져 있다. 뿐만 아니라 기존의 여러 연구를 통해 탁월한 항고지혈증/항동맥경화(Jeon *et al* 2004) 및 항당뇨(Jung *et al* 2006) 효능이 밝혀져 왔으며, 독성이 거의 없는 안전한 생리활성 성분으로 알려져 있다(Jeon SM 2001). 그러나 이러한 우수한 기능성을 지니고 있음에도 불구하고 naringin 등의 flavonoid를 포함한 대부분의 페놀계 천연 항산화 물질은 빛, 열 및 산소에 의해 쉽게 산화되어 활성을 잃어버리기 때문에 장기 보존이 어려우며, 지속성이 떨어지는 단점이 있다. 따라서 이들 flavonoid를 안정화시킨다면 건강기능식품이나 기타 식품 보존제로서의 활용도가 크게 확대될 수 있다.

생물 신소재인 cyclodextrin(CD)은 6~8개의 포도당(glycopyranose) 분자가 α -1,4-결합에 의해 환상형 결합으로 연결된 도우넛 형태의 구조로서 분자내 공동이 형성되며, 이 분자내 공동은 소수성인 반면 분자 외부에는 친수성인 특성을 갖고 있다(Hara & Hashimoto 1986, Pszczola DE 1998). 따라서 CD는 분자내 소수성 공동에 불안정한 플라보노이드를 포접시켜 포접화합물(inclusion complex)을 형성함으로써 flavonoid를 안정화시킬 수 있다(Song *et al* 1993, Kamihira *et al* 1990).

본 연구에서 양성 대조 물질로 사용한 orlistat(Xenical, Roche, Swiss)는 1997년 미국 식약청의 승인을 받은 비만 치료제이다. 현재까지 처방되고 있는 비만 치료제의 대부분이 중추신경계의 시상하부에 작용하는 식욕 억제제임에 반해 orlistat은 장내 지방 분해 효소인 췌장 lipase 작용을 억제하는 약물로서, 섭취한 중성지방의 30% 정도의 흡수를 저해하여 변으로 지방을 배설시키는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 중추신경계 부작용이 없다는 장점 때문에 가장 널리 사용되고 있다. 음식에 지방 함량이 높을수록 음식이 부드럽고 연하며, 탄수화물이나 단백질에 비해 저작 횟수가 감소하여 식사 속도가 빨라지거나 식사량이 증가하므로 고지방 식사는 비만으로 이어지기 쉽다. 양식이나 중식에 비해 한식의 지방 함량이 상대적으로 적지만, 청장년층의 지방 섭취 비율이 상대적으로 높고 인스턴트 식품 섭취 비율이 높기 때문에 우리나라에서도 orlistat 처방이 늘고 있다. 최근에는 orlistat가 체중 감량 효과뿐만 아니라 감량 체중의 유지, 이상지질혈증 개선, 인슐린 저항성 및 제2형 당뇨병 예방 및 개선에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Dimitrov *et al* 2005, Aylwin & Al-Zaman 2008, Fonseca VA 2008).

따라서 본 연구에서는 CD-naringin inclusion complex를 제조한 후 동물 실험을 통해 naringin과 CD-naringin inclusion

complex의 지질대사 개선 효능을 비교·평가함으로써 새로운 개념의 건강기능식품 개발을 위한 기초 자료를 마련하고자 하였다. 본 연구에서 이용된 cyclodextrin은 β -CD로서, Kim *et al*(2003)의 연구에서 α -CD, β -CD 및 γ -CD를 이용하여 폴리페놀 화합물과 포접 화합물을 형성시킨 결과, 포접능이 가장 우수한 γ -CD(46.9%)와 비교하여 포접능이 크게 낮지 않으면서도 가격이 저렴하고 가장 많이 이용되는 β -CD를 사용하였다.

재료 및 방법

1. Cyclodextrin-Naringin(CD-N) Inclusion Complex 제조

본 연구에 이용된 flavonoid인 naringin은 Sigma사의 제품(Sigma Co., USA)을 사용하였으며, inclusion complex 형성에 사용된 CD는 Hungary Cyclolab사의 β -CD(Cyclolab., Hungary)를 사용하였다. Cyclodextrin inclusion complex는 30 mM CD과 30 mM naringin 용액을 혼합하여 상온에서 6시간 동안 교반하여 형성시켰다. 형성된 inclusion complex는 4°C에서 6시간 방치한 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 얻어진 침전물을 50% ethanol로 처리하여 비포접 잔여물을 제

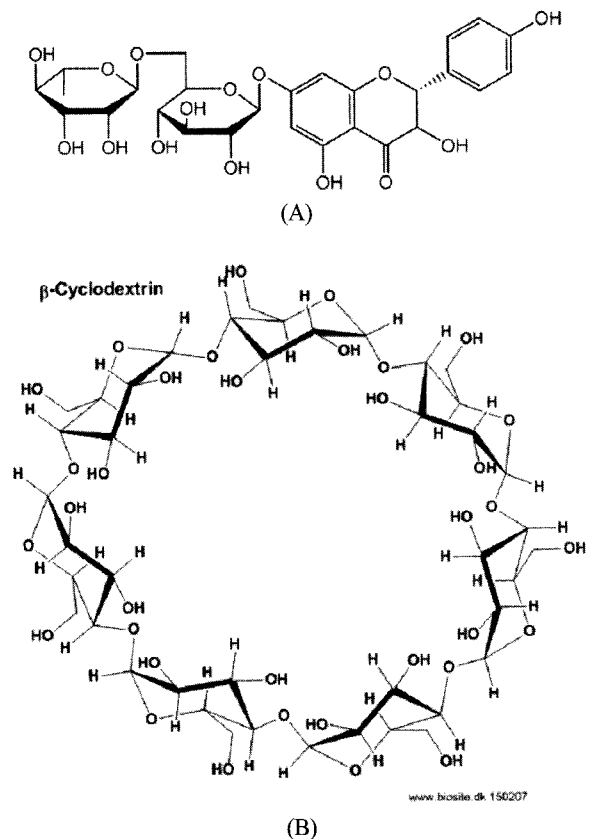


Fig. 1. Molecular structures of naringin(A) and β -cyclodextrin(B).

거하고 진공 건조시켜 분석용 시료로 사용하였다.

2. Flavonoids 및 CD 분석

Naringin 및 β -CD는 high performance liquid chromatography(HPLC, Gilson Medical Electronics Inc., France)를 이용하여 분석하였으며, 분석 조건은 다음과 같다. 분석 column은 Purospher[®] RP18(Merck KGaA, Germany), 이동상으로 70% ethanol, 유속은 0.5 mL/min였으며, UV detector를 이용하여 375 nm에서 검출하였다. β -CD는 HPLC 및 비색법을 병용하여 분석하였으며, HPLC 분석 조건은 Cosmosil 5NH₂ column(Nacalai Co. Japan), acetonitrile/water(65:35), 1 mL/min, 그리고 RI detector로 분석하였고, β -CD 분석의 비색법으로는 phenolphthalein 정색법(Kaneko *et al* 1987)을 이용하였다.

3. 고지혈증 유도 및 CD-Flavonoid Inclusion Complex 보충을 위한 실험 동물 사육 및 실험군 디자인

5주령의 C57BL/6 수컷 mice 40마리를 이용하여 처음 1주일간 기본 식이(AIN-76 semi-purified diet)로 적응시킨 후 난과법에 의해 4개군으로 나누었다. 즉, 4개 식이군은 고지방식이 대조군(high-fat control, HFC), 양성 대조군(positive control, PC; 고지방식이+0.01% Orlistat)(Kalivianakis *et al* 1999), CD-naringin군(고지방식이+0.048% CD-naringin, CD-N) 및 naringin군(고지방식이+0.02% naringin, N)으로 나누었다(Table 1). 고지혈증 유도용 고지방식은 AIN-76 기본식이에 15% lard(w/w) 및 5% corn oil(w/w)을 첨가한 20% 고지방식이로 제조하였다. CD-naringin inclusion complex의 식이 첨가량은 naringin 0.02%를 기준으로 inclusion complex에 동일한 양의 naringin이 포함되는 %로 환산하였다.

동물들은 항온(20°C)과 항습(50%) 및 7:00시부터 19:00시 까지의 light cycle을 유지하는 동물 실험실에 설치된 개개의 stainless cage에서 사육하였으며, 모든 식이와 식수들은 자유식(ad libitum)으로 섭취하게 하였다. 체중은 1주일마다, 그리고 식이 섭취량은 사육 기간 중 매일 측정하여 기록하였다. 10주간 실험식이 후 마지막 12시간 동안 절식시킨 후 희생하여 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하고 간, 지방 조직 등 장기조직들을 수집하였다. 혈액은 1,000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 혈장을 수집한 후 적당량으로 나누어 -70°C에 보관하였고, 혈장 지질 농도 및 호르몬/adipokine 측정에 이용하였다. 간 조직은 효소 활성도 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

4. 혈장, 간 조직 지질 분석

혈장 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤은 enzymatic colorimetry법을 이용한 kit(아산제약(주), 서울)를 사용하

Table 1. The composition of experimental diets

	HFC ¹⁾	PC ²⁾	CD-N ³⁾	N ⁴⁾
Casein	20	20	20	20
D,L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	5	4.99	4.952	4.98
Sucrose	45	45	45	45
Cellulose	5	5	5	5
Mineral	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	5	5	5	5
Lard	15	15	15	15
Orlistat	-	0.01	-	-
CD-naringin	-	-	0.048	-
Naringin	-	-	-	0.02
Total	100	100	100	100

¹⁾ HFC: high-fat control.

²⁾ PC: positive control.

³⁾ CD-N: cyclodextrin-naringin.

⁴⁾ N: naringin.

여 측정하였고, 혈장 유리지방산은 non-esterified fatty acid (NEFA) kit(Wako, Osaka, Japan)를 사용하여 측정하였다. 동맥경화지수(atherogenic index, AI)는 Yamajaki *et al*(1990)의 공식($\{[\text{총콜레스테롤}] - [\text{HDL-콜레스테롤}]\} / [\text{HDL-콜레스테롤}]$)에 따라 계산하였다. 공복 혈당은 혈당계(Arkray, Japan)를 이용하여 측정하였다.

간 조직 지질은 Folch *et al*(1957)의 방법에 따라 지질을 추출하여 간 조직 콜레스테롤과 중성지방 함량을 혈장과 같은 방법으로 정량하였다. 단, 간 조직지질 정량에서는 효소시액에 유화제로서 0.5% Triton X-100과 3 mM sodium cholate를 혼합하여 발색시 일어나는 탁도(turbidity)를 제거하였다.

5. 간 조직 지질대사 관련 효소 활성도 측정

간 조직 1 g으로 미토콘드리아, 세포질, 마이크로솜 분획을 분리하여 각 효소 활성도 분석에 이용하였으며, 각 분획의 단백질 농도는 Bradford MM(1976)의 방법을 이용하여 측정하였다.

지방산 합성에 관련된 효소인 FAS(fatty acid synthase) 활성도는 Carl *et al*(1975)의 방법을 수정, 보완하여 세포질 분획에서 산화된 NADPH의 nmol로 나타내었다. G6PD(glucose-

6-phosphate dehydrogenase) 활성도는 Glock & McLean(1953)의 방법에 따라 NADP⁺가 NADPH로 환원되는 정도를 측정하였고, ME(malic enzyme) 활성도는 Ochoa S(1995)의 방법에 준하여 1분간 생성된 NADPH량으로 나타내었으며, 중성 지방 합성효소인 PAP(phosphatidate phosphohydrolase) 활성도는 Walton & Possmayer(1985)의 방법에 준하여 측정하였다.

지방산 산화에 관련된 효소인 CPT(carnitine palmitoyl transferase) 활성도 측정은 Bieber *et al*(1972)의 방법에 준하여 미토콘드리아 분획에서 palmitoyl-CoA로부터 생성되는 CoASH량을 측정하였다. β -oxidation 활성도 또한 미토콘드리아 분획에서 palmitoyl-CoA를 기질로 하여 NAD⁺가 NADH로 환원되는 정도를 측정하였다(Lazarow PB 1981).

콜레스테롤 생합성 과정의 율속 효소인 HMG-CoA reductase 활성도는 Shapiro *et al*(1974)이 실시한 방법을 수정 보완하여 측정하였으며, 활성도는 마이크로솜 분획에서 생성된 mevalonate의 양을 pmole로 나타내었다.

6. 혈장 지질대사 관련 호르몬 및 Cytokine 정량

혈장 insulin 농도는 mouse insulin ELISA kit(Crystal Chem, USA)를, 그리고 혈장 adiponectin, leptin, resistin, IL-1 β 및 IL-6 농도는 ELISA kit(R&D Systems, Abingdon, UK)를 사용하여 측정하였다.

7. 통계 분석

본 실험의 모든 결과는 SPSS package program을 이용하여 분석하였고, 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정을 위해 ANOVA를 실시하였다. 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 이상의 수준에서 검정하였으며, 그 결과를 standard error(SE)와 함께 표시하여 나타내었다.

Table 3. Effects of CD-naringin inclusion complex supplementation for 10 weeks on body weight gain, food intake and organ weights in mice-fed high fat diet

	HFC ¹⁾	PC ²⁾	CD-N ³⁾	N ⁴⁾
Body weight gain(g/week)	2.13±0.05 ^b	1.85±0.08 ^a	2.01±0.06 ^{ab}	1.98±0.08 ^{ab}
Food intake(g/day)	4.21±0.05	4.14±0.11	4.23±0.07	4.17±0.10
Liver(g)	1.55±0.81	1.34±0.67	1.42±0.70	1.38±0.72
Heart(g)	0.14±0.001	0.14±0.001	0.13±0.003	0.13±0.004
Epi-WAT ⁵⁾ (g)	2.41±0.09 ^c	1.77±0.07 ^a	2.11±0.08 ^b	2.03±0.06 ^b
Peri-WAT ⁶⁾ (g)	1.18±0.02 ^c	0.68±0.04 ^a	0.94±0.04 ^b	0.86±0.04 ^b

¹⁾ HFC : high-fat control, ²⁾ PC : positive control, ³⁾ CD-N: cyclodextrin-naringin, ⁴⁾ N : naringin, ⁵⁾ Epi-WAT : epididymal white adipose tissue, ⁶⁾ Peri-WAT : perirenal white adipose tissue.

Mean±S.E.

^{a-c} Values not sharing a common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$.

결과 및 고찰

1. CD-Naringin 포접화합물 형성능

항고지혈증 효과가 밝혀진 flavonoid인 naringin과 β CD-naringin inclusion complex 형성능의 결과는 Table 2와 같이 40%로 나타났다. Kim *et al*(2003)의 연구에서는 flavonoid인 quercetin과 catechin을 β -CD와 물 혼합비 1:1로 혼합하였을 때 포접화합물 형성능이 각각 23.5% 및 43.8%로 나타났는데, 이는 flavonoids마다 포접화합물 형성능이 다름을 보여주고 있다. 본 연구에서는 포접화합물에 포접된 naringin 량에 따라 식이 첨가 비율을 계산하였다.

2. 체중, 식이 섭취량 및 장기 무게 변화에 미치는 영향

10주간 고지방식이와 함께 CD-naringin inclusion complex 및 naringin을 급여한 결과, 식이 섭취량에서는 군간 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 체중 증가량은 고지방대조군인 HFC군에 비해 orlistat를 보충한 PC군에서 유의적으로 감소하였고, CD-N군 및 N군은 HFC군과 유의적인 차이가 없었다(Table 3). 이 결과는 고지방식이와 함께 naringin 1%를 보충한 Kim *et al*(2009)의 연구에서 고지방식이군과 체중 증가량 및 식이 섭취량에서 유의적인 차이가 없었던 연구 결과

Table 2. Capacity of inclusion complex formation of β -CD and naringin (unit: %¹⁾)

	Naringin
Capacity	40

¹⁾ Mole percent of naringin that form inclusion complex equal mole concentration of naringin and β -CD.

와 일치하였다.

한편, 간, 심장 무게는 군간 유의적인 차이가 없었으나, 부고환백색지방(epididymal) 및 신주위백색지방(perirenal) 무게는 PC군이 가장 낮았고, CD-N군 및 N군 또한 HFC군에 비해 유의적으로 감소되어 orlistat의 체지방 감량 효과가 가장 뛰어난 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과, 고지방식이에 CD-naringin inclusion complex 및 naringin을 보충한 결과, 간 무게 감소에는 유의적인 효과가 없었으나, 부고환 및 신주위백색지방 무게 감소에는 효과적인 것으로 나타났다(Table 3).

3. 혈장, 간 조직 지질농도 및 혈당 변화

혈장 중성지방 농도는 군간 유의성이 나타나지 않았으나 혈장 총콜레스테롤 및 유리지방산 농도는 PC군과 CD-N군 및 N군이 HFC군에 비해 유의적으로 감소하였고, HDL-콜레스테롤 농도는 HFC군과 PC군에 비해 CD-N군 및 N군이 유의적으로 증가하였다(Table 4). 이전의 연구(Jeon *et al* 2004)에서도 나린진 보충은 HDL-콜레스테롤을 증가시켰으며, 본 연구에서도 동일한 결과를 보여주었다. 0.01% orlistat 보충 또한 혈장 유리지방산 농도 감소에는 효과적이었으며, 기존의 연구(Kelley *et al* 2004)에서도 2형 당뇨병에서 공복 유리지방산이 orlistat 보충에 의해 유의적으로 감소함을 보여주었다. 반면, orlistat 보충에 의한 HDL-콜레스테롤 증가 효과는 없었으며, 이는 orlistat 보충시 혈장 총콜레스테롤, 중성지방은 물론 HDL-콜레스테롤 농도 또한 함께 감소한 Czerwieńska *et al*(2004)의 연구 결과와 일부 일치하였다. 동맥경화지수는 순

환기계 발병의 지표로서 이용되며, 본 연구 결과 CD-N군 및 N군이 HFC군에 비해 유의적으로 감소하였으나, PC군은 HDL-콜레스테롤 농도가 증가하지 않았음에도 불구하고 총 콜레스테롤 농도가 HFC군에 비해 유의적으로 감소함으로써 동맥경화지수의 유의적인 감소를 나타내었다.

공복 혈당 농도는 HFC군에 비해 나머지 모든 군에서 유의적인 감소를 나타내었다. 이 결과는 naringin 및 orlistat의 혈당 강하 효과에 대한 기존의 연구 결과들(Jung *et al* 2006, Jung *et al* 2004, Fonseca VA 2008)과 일치하는 것으로 나타났으나, 본 연구에서 혈장 지질 및 혈당 농도에 대한 영향은 CD-N군과 N군간에 큰 차이가 없었다.

일반적으로 간 조직 중성지방 및 콜레스테롤 수준은 고지방 식이에 의해 증가되는데(Choi *et al* 2009), 본 실험에서는 간 조직 중성지방 및 콜레스테롤 함량 모두 HFC군에 비해 PC군, CD-N군 및 N군이 HFC군에 비해 유의적으로 감소되어 중성지방을 제외하면 혈장 지질과 동일한 패턴을 보여주었다.

4. 지질대사 관련 효소 활성도 변화

간 조직 지방산 합성 관련 효소인 FAS, G6PD 및 ME 활성도를 측정된 결과, FAS 활성도는 HFC군에 비해 나머지 모든 군에서 유의적으로 감소된 반면, G6PD 및 ME 활성도는 군간 유의적인 차이가 없었다. 간 조직 중성지방 생합성 과정 중 율속효소인 PAP 활성도는 HFC군 및 PC군에 비해 CD-N군 및 N군이 유의적으로 낮은 활성도를 나타내어 간 조

Table 4. Effects of CD-naringin inclusion complex supplementation for 10 weeks on plasma and hepatic lipids and blood glucose concentrations in mice-fed high fat diet

	HFC ¹⁾	PC ²⁾	CD-N ³⁾	N ⁴⁾
Plasma				
TG(mmol/L)	1.46±0.08	1.40±0.05	1.39±0.04	1.41±0.03
Total-cholesterol(mmol/L)	5.49±0.45 ^b	4.35±0.39 ^a	4.39±0.30 ^a	4.33±0.25 ^a
HDL-cholesterol(mmol/L)	0.59±0.04 ^a	0.64±0.03 ^a	0.77±0.06 ^b	0.77±0.08 ^b
FFA(mmol/L) ⁵⁾	3.43±0.15 ^b	3.04±0.19 ^a	2.89±0.11 ^a	2.53±0.09 ^a
AI ⁶⁾	8.30±1.45 ^b	5.80±0.65 ^a	4.70±0.96 ^a	4.62±0.71 ^a
Blood glucose(mmol/L)	39.30±1.86 ^b	26.81±1.27 ^a	27.01±1.31 ^a	24.32±1.16 ^a
Liver				
TG(mmol/g)	3.92±0.23 ^b	2.39±0.28 ^a	2.58±0.44 ^a	2.12±0.36 ^a
Cholesterol(mmol/g)	4.01±0.31 ^b	3.52±0.14 ^a	3.46±0.89 ^a	3.30±0.15 ^a

¹⁾ HFC: high-fat control, ²⁾ PC: positive control, ³⁾ CD-N: cyclodextrin-naringin, ⁴⁾ N: naringin, ⁵⁾ FFA: free fatty acid, ⁶⁾ AI: atherogenic index = $([Total-C]-[HDL-C])/[HDL-C]$.

Mean±S.E.

^{a,b} Values not sharing a common letter are significantly different among groups at $p<0.05$.

직 중성지방 함량 분석 결과와 일치하였으나, orlistat를 보충한 PC군에서는 간 조직 중성지방 함량이 HFC군에 비해 유의적으로 감소되었음에도 불구하고 중성지방 합성 효소의 활성도가 감소되지 않은 것으로 나타났다(Table 5). 한편, 지방산 산화 관련 효소인 β -oxidation 및 CPT 활성도를 측정된 결과, 군간 유의적인 차이가 없었다. Jung *et al*(2006)은 일반 식이를 섭취한 2형 당뇨 마우스에서 나린진 보충에 의해 간 조직 FAS 활성도뿐만 아니라 G6PD, PAP, CPT, β -oxidation 활성도 모두 당뇨 대조군에 비해 감소함을 보여주었는데, 본 연구 결과에서 FAS, PAP 활성도 등 지질 합성 관련 효소 활성도에 대한 naringin의 효과가 부분적으로 일치하였다. Orlistat 또한 FAS 저해제로 작용할 수 있음이 Browne *et al*(2006)의 연구에서 제시되어 본 연구 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

일반적으로 고지방식은 체내로 흡수된 후 간 조직 콜레스테롤 생합성을 증가시키는데, 본 연구에서 간 조직 콜레스테롤 생합성 유효효소인 HMG-CoA reductase 활성도를 측정된 결과 CD-N군 및 N군이 HFC군 및 PC군에 비해 유의적으로 활성도 감소를 보였다. 나린진을 이용한 기존의 여러 연구(Shin *et al* 1999, Kim *et al* 2004, Kim *et al* 2006, Jung *et al* 2006)에서 고지방-고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐에게 naringin을 보충한 결과 HMG-CoA reductase 활성도가 유의적으로 감소하였음을 보고하였으나, Jeon *et al*(2004)의 연구

에서는 고콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼에서 오히려 간 조직 HMG-CoA reductase 활성도가 증가하였음을 제시하였다. 이러한 결과의 차이는 동물 종간의 차이일 수도 있으나, Jeon *et al*(2004)의 연구에서는 콜레스테롤 항상성 기전에 따라 혈장 콜레스테롤이 현저하게 저하될 때 간 조직 콜레스테롤 생합성은 오히려 증가하는 것으로 파악되며, rat 및 mice를 이용한 연구에서는 일관성있게 naringin 보충에 의해 HMG-CoA reductase 활성도가 감소함을 알 수 있었다. 따라서 고지방식에 CD-naringin 및 naringin 보충은 지방산 합성, 중성지방 합성 및 콜레스테롤 생합성 억제에는 효과적이었으나, 지방산 산화 증가에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 CD-naringin 포접화합물과 naringin 단독 투여군간 효능 차이가 나타나지 않아 cyclodextrin 포접 형성이 나린진 단독 투여에 비해 지질대사에서 차별적인 개선 효과를 나타내지는 않는 것으로 사료된다.

5. 지방조직 방출 호르몬 및 Adipokine 농도 변화

고지방식에 의한 체지방량 증가는 지방조직 호르몬 및 지방조직 분비 cytokine(adipokine) 분비를 변화시키는 것으로 알려져 있다(Borst & Conover 2005, Maeda *et al* 2002). 일반적으로 지속적인 고지방식사와 체지방량 증가로 인해 인슐린 저항성이 초래되어 혈중 인슐린 농도가 상승하게 되는데(Lu *et al* 2009), 지방조직에서 분비되는 호르몬 중 adipo-

Table 5. Effects of CD-naringin inclusion complex supplementation for 10 weeks on hepatic lipid metabolism-related enzyme activities in mice-fed high fat diet

	HFC ¹⁾	PC ²⁾	CD-N ³⁾	N ⁴⁾
Fatty acid synthesis				
FAS ⁵⁾ (nmol/min/mg protein)	13.41± 0.37 ^b	9.35± 0.44 ^a	10.06±0.24 ^a	9.54± 0.41 ^a
G6PD ⁶⁾ (nmol/min/mg protein)	6.98± 0.25	7.63± 0.34	6.85±0.21	7.15± 0.59
ME ⁷⁾ (nmol/min/mg protein)	39.98± 3.15	42.07± 4.21	38.52±1.58	42.11± 2.77
TG synthesis				
PAP ⁸⁾ (nmol/min/mg protein)	11.26± 0.45 ^b	11.22± 0.54 ^b	9.00±0.38 ^a	9.63± 0.29 ^a
Fatty acid oxidation				
CPT ⁹⁾ (nmol/min/mg protein)	6.89± 0.75	8.01± 0.44	7.18±0.88	7.09± 1.05
β -oxidation(nmol/min/mg protein)	30.39± 2.38	26.41± 3.13	29.56±4.95	28.89± 3.84
Cholesterol biosynthesis				
HMGR ¹⁰⁾ (pmol/min/mg protein)	213.31±20.14 ^b	242.26±17.82 ^b	114.25±8.98 ^a	145.54±11.02 ^a

¹⁾ HFC: high-fat control, ²⁾ PC: positive control, ³⁾ CD-N: cyclodextrin-naringin, ⁴⁾ N: naringin, ⁵⁾ FAS: fatty acid synthase,

⁶⁾ G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase, ⁷⁾ ME: malic enzyme, ⁸⁾ PAP: phosphatidate phosphohydrolase,

⁹⁾ CPT: carnitine palmitoyl transferase, ¹⁰⁾ HMGR: HMG-CoA reductase.

Mean±S.E.

^{a,b} Values not sharing a common letter are significantly different among groups at $p<0.05$.

nectin은 당뇨병 및 비만 상태에서 혈중 분비가 현저하게 감소되며(Annuzzi *et al* 2009), leptin의 경우 고지혈증 또는 당뇨병 환자에서 혈중 분비가 증가한다(Luc *et al* 2009). 또한 지방조직에서 분비되는 cytokine 중 resistin 및 IL-1 β 또한 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 환자에서 혈중 농도가 상승하는 염증성 cytokine으로서 심혈관계 질환으로의 이환을 증가에 기여할 수 있다(Luc *et al* 2009). 반면, IL-6는 항염증성 사이토카인으로서 당뇨병, 비만, 고지혈증 환자의 경우 혈중 농도가 감소되는 경향을 나타낸다(Luc *et al* 2009). 본 연구 결과에서 혈장 인슐린 농도는 HFC군에 비해 모든 실험군이 유의적으로 낮았으나, leptin 농도는 PC군만이 HFC군에 비해 유의적으로 감소되었고, CD-N군 및 N군은 HFC군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 일반적으로 인슐린 저항성이 개선되면 당대사 또한 개선되는데, naringin과 CD-N 보충은 HFC군에 비해 혈당 저하 효과와 함께 인슐린 농도를 감소시켜 인슐린 저항성 개선 효과를 나타낸 것으로 보인다. 이 결과는 나린진 보충이 혈당을 저하시키고 당대사를 개선시킨다는 기존의 연구 결과(Jung *et al* 2004, 2006)와도 일치하였다. 양성 대조 물질로 사용한 orlistat는 체중 조절 이외에도 leptin 농도 감소 및 인슐린 저항성 개선(Dimitrov *et al* 2005), 그리고 제2형 당뇨병의 예방 및 개선(Aylwin & Al-Zaman 2008, Fonseca VA 2008)에도 효과적이라는 결과가 보고되어 왔으며, 본 연구 결과와도 일치하는 것으로 나타났다. 한편, 본 연구 결과 혈장 adiponectin, resistin, IL-1 β 및 IL-6 농도는 군간 유의적인 차이가 없었다. 이 결과는 orlistat 투여시 심혈관질환자에서 항염증 및 인슐린 민감성 아디포카인인 adiponectin을 증가시키는 반면, 염증성 아디포카인인 leptin, resistin, TNF- α 등을 증가시킨다는 결과(Iglesias-Osma *et al* 2008)와 상반된 결과를 보여주었다. 따라서 CD-naringin in-

clusion complex 및 naringin 단독 보충은 장기간의 고지방식이에 의한 인슐린 저항성을 개선시키는 효능을 기대해볼 수 있으나, 혈장 leptin, resistin, IL-1 β 등의 염증성, 인슐린 저항성을 증가시키는 호르몬/adipokine 농도 감소 및 인슐린 저항성 개선 또는 항염증성 adipokine인 혈장 adiponectin 및 IL-6 농도 증가에 대한 효과는 나타나지 않는 것으로 판단되며, 두 물질의 효능 차이 또한 없는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 항고지혈, 항당뇨, 항동맥경화 등의 기능성이 잘 알려진 naringin을 이용하여 빛, 열, 산소 등의 산화환경을 개선시킴으로써 지질대사 개선에 대한 유용성이 증가되는지를 알아보고자 하였다. 즉, 불안정한 naringin 등의 flavonoid를 cyclodextrin 분자의 소수성 공동에 포접시켜 안정성을 증가시킴으로써 지질대사가 naringin 단독 보충에 비해 개선되는지를 분석하고, 이 연구 결과를 토대로 건강 기능식품에 적용 가능한지에 대한 여부를 검토하고자 하였다. 이에 20% 고지방식이에 0.02% naringin 및 naringin이 0.02% 첨가되도록 CD-naringin량을 조절하여 10주간 C57BL/6 mice에 보충한 결과, 체중 및 식이 섭취량에는 차이가 없었으나, HFC군에 비해 CD-N군 및 N군에서 백색지방 무게가 유의적으로 감소되었다. 뿐만 아니라, CD-N군 및 N군에서 혈장 총콜레스테롤, 유리지방산, 혈당 및 간 조직 콜레스테롤과 중성지방 농도가 HFC군에 비해 유의적으로 감소하였고, 혈장 HDL-콜레스테롤 농도는 유의적으로 증가하였다. 혈장 및 간 조직 지질 농도는 간 조직 지질대사 관련 효소 활성도와 일치하는 경향을 보여주었는데, CD-naringin 및 naringin 보충은 지방산 산화 증가에는 효과가 없었으나, 간 조직 지방산,

Table 6. Effects of CD-naringin inclusion complex supplementation for 10 weeks on plasma hormone and adipokine concentrations in mice-fed high fat diet

	HFC ¹⁾	PC ²⁾	CD-N ³⁾	N ⁴⁾
Insulin(ng/mL)	8.13±0.24 ^b	5.75±0.15 ^a	6.98±0.39 ^a	6.90±0.27 ^a
Leptin(ng/mL)	11.01±0.31 ^b	9.64±0.27 ^a	11.44±0.38 ^{ab}	10.89±0.16 ^{ab}
Adiponectin(pg/mL)	0.93±0.06	0.86±0.08	0.93±0.07	0.94±0.05
Resistin(pg/mL)	7.88±0.47	7.01±0.36	7.24±0.53	7.60±0.42
IL-1 β ⁵⁾ (pg/mL)	2.52±0.01	2.52±0.01	2.51±0.01	2.53±0.01
IL-6 ⁶⁾ (pg/mL)	2.97±0.01	2.91±0.01	2.92±0.02	2.94±0.01

¹⁾ HFC: high-fat control, ²⁾ PC: positive control, ³⁾ CD-N: cyclodextrin-naringin, ⁴⁾ N: naringin, ⁵⁾ IL-1 β : interleukin-1beta, ⁶⁾ IL-6: interleukin-6.

Mean±S.E.

^{ab} Values not sharing a common letter are significantly different among groups at $p < 0.05$.

중성지방 및 콜레스테롤 합성 억제에는 매우 효과적인 것으로 나타났다. 또한 지질대사 관련 호르몬 및 adipokine 농도 비교결과, 혈장 인슐린 농도는 CD-naringin 및 naringin 보충에 의해 유의적으로 감소되었으나, leptin, adiponectin, resistin, IL-1 β , IL-6 등은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 췌장 lipase 억제제로서 비만 치료제로 이용되고 있는 orlistat에 비해 지질대사 개선 효과가 비슷하게 나타났으나, orlistat와는 다른 기전에 의한 지질대사 개선 효과로 보인다. 결론적으로, CD-naringin inclusion complex 및 naringin 단독 보충은 장기간의 고지방식이에 의한 지질대사 이상 및 인슐린 저항성 개선 효능을 기대해 볼 수 있으나, 혈장 leptin, resistin, IL-1 β 등의 염증성, 인슐린 저항성을 증가시키는 호르몬/adipokine 농도 감소 및 인슐린 저항성 개선 또는 항염증성 adipokine인 혈장 adiponectin 및 IL-6 농도 증가에 대한 효과는 나타나지 않는 것으로 판단되며, 두 물질의 효능 차이 또한 나타나지 않아 건강기능식품에 적용하기 위해서는 항산화 효과에 대한 CD-naringin의 유용성 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구과제는 2006년도 한국학술진흥재단(C00515)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 교육과학기술부 지정 경북대학교 SRC (2009-0063409)의 도움으로 출판된 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

- Annuzzi G, Bozzetto L, Patti L, Santangelo C, Giacco R, Di Marino L, De Natale C, Masella R, Riccardi G, Rivellese AA (2009) Type 2 diabetes mellitus is characterized by reduced postprandial adiponectin response: a possible link with diabetic postprandial dyslipidemia. *Metabolism* Nov 17.
- Aylwin S, Al-Zaman Y (2008) Emerging concepts in the medical and surgical treatment of obesity. *Front Horm Res* 36: 229-259.
- Bieber LL, Abraham T, Helmrath T (1972) A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyl transferase. *Anal Biochem* 50: 509-518.
- Borst SE, Conover CF (2005) High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha. *Life Sci* 77: 2156-2165.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7: 248-254.
- Browne CD, Hindmarsh EJ, Smith JW (2006) Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *FASEB J* 20: 2027-2035.
- Carl MN, Lakshmanan MR, Porter JW (1975) Fatty acid synthase from rat liver. *Methods Enzymol* 35: 37-44.
- Choi MS, Lee MK, Jung UJ, Kim HJ, Do GM, Park YB, Jeon SM (2009) Metabolic response of soy pinitol on lipid-lowering, antioxidant and hepatoprotective action in hamsters fed-high fat and high cholesterol diet. *Mol Nutr Food Res* 53: 751-759.
- Czerwieska B, Kokot F, Franek E, Irzyniec T, Wiecek A (2004) Effect of orlistat therapy on carbohydrate, lipid, vitamin and hormone plasma levels in obese subjects. *Pol Arch Med Wewn* 112: 1415-1423.
- Dimitrov D, Bohchelien H, Koeva L (2005) Effect of orlistat on plasma leptin levels and risk factors for the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 3: 122-129.
- Folch J, Lees M, Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Fonseca VA (2008) Identification and treatment of prediabetes to prevent progression to type 2 diabetes. *Clin Cornerstone* 9: 51-59.
- Glock GE, McLean P (1953) Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem J* 55: 400-408.
- Hara K, Hashimoto H (1986) Application of cyclodextrin. *J Jpn Soc Starch Sci* 3: 151-161.
- Higashimoto M, Yamato H, Kinouchi T, Ohnishi Y (1998) Inhibitory effects of citrus fruits on the mutagenicity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid treated with nitrite in the presence of ethanol. *Mutat Res* 415: 219-226.
- Iglesias-Osma MC, Torres MA, Garcia-Barrado MJ, Moratinos J (2008) Adipocytokines: implications in the prognosis and drug treatment of cardiovascular diseases. *Rev Clin Esp* 208: 239-246.
- Jeon SM (2001) Effects of naringin, vitamin E and cholesterol-lowering drugs on cholesterol and antioxidant metabolism and related gene expression in rabbits fed high cholesterol diet. *Ph D Dissertation* Kyungpook National University. Daegu. pp 131-133.
- Jeon SM, Park YB, Choi MS (2004) Antihypercholesterolemic

- property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits. *Clin Nutr* 23: 1025-1034.
- Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Choi MS (2004) The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Nutr* 134: 2499-2503.
- Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS (2006) Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1134-1145.
- Kamihira M, Asai T, Yamagata Y, Taniguchi M, Kobayasi T (1990) Formation of inclusion complexes between cyclodextrins and aromatic compounds under pressurized carbon dioxide. *J Ferment Bioeng* 69: 350-353.
- Kaneko T, Nakamura T, Horikoshi K (1987) Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin forming cyclodextrin glucanotransferase. *J Jpn Soc Starch Sci* 24: 45-48.
- Kelley DE, Kuller LH, McKolanis TM, Harper P, Mancino J, Kalhan S (2004) Effects of moderate weight loss and orlistat on insulin resistance, regional adiposity, and fatty acids in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 33-40.
- Kim DH, Jung EA, Shong IS, Han JA, Kim TH, Han MJ (1998) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res* 21: 17-23.
- Kim HJ, Oh GT, Park YB, Lee MK, Seo HJ, Choi MS (2004) Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. *Life Sci* 74: 1621-1634.
- Kim IS, Chae SC, Kim DW (2009) Effects of onion and naringin extract mixed products on antihyperlipidemic levels of bio FIB hamster. *Korean J Microscopy* 39: 191-197.
- Kim SY, Kim HJ, Lee MK, Jeon SM, Do GM, Kwon EY, Cho YY, Kim DJ, Jeong KS, Park YB, Ha TY, Choi MS (2006) Naringin time-dependently lowers hepatic cholesterol biosynthesis and plasma cholesterol in rats fed high-fat and high-cholesterol diet. *J Med Food* 9: 582-586.
- Kim TK, Shin HD, Lee YH (2003) Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J Food Sci Technol* 35: 266-271.
- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT (2002) The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288: 2709-2716.
- Lazarow PB (1981) Assay of peroxisomal beta-oxidation of fatty acids. *Methods Enzymol* 72: 315-319.
- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 92: 154-160.
- Lu Z, Wang Z, Wang X, Diao B, Feng X, He F, Zou Q, Gan L (2009) Protection from high-fat-diet-induced impaired glucose tolerance in female Sprague-Dawley rats. *Gynecol Endocrinol* 25: 464-471.
- Luc G, Empana JP, Morange P, Juhan-Vague I, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Kee F, Bingham A, Machec E, Ducimetiere P (2009) Adipocytokines and the risk of coronary heart disease in healthy middle aged men: the PRIME study. *Int J Obes (Lond)* Oct 13 [Epub ahead of print]
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8: 731-737.
- Ochoa S (1995) Malic enzyme L malic enzymes from pigeon and wheat germ. In *Methods in Enzymology* (SP Colowick and NO Kaplan eds). Academic Press, New York, USA. pp 323-326.
- Pszczola DE (1998) Production and potential food application of cyclodextrins. *Food Tech* 42: 96-100.
- Shapiro DJ, Nordstrom JL, Mitschelen JJ, Rodwell VW, Schimke RT (1974) Micro assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 370: 369-377.
- Shin YW, Bok SH, Jeong TS, Bae KH, Jeoung NH, Choi MS, Lee SH, Park YB (1999) Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 69: 341-347.
- Song SH, Lee HJ, Chang SJ, Woo GJ (1993) Microencapsulation of garlic oil with β -cyclodextrin. *Foods and Biotechnol* 2: 132-135.
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999) Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 125: 673-680.
- Walton PA, Possmayer F (1985) Mg₂-dependent phosphatidate

phosphohydrolase of rat lung: development of an assay employing a defined chemical substrate which reflects the phosphohydrolase activity measured using membrane-bound substrate. *Anal Biochem* 151: 479-486.

Yamajaki K, Murat M (1990) Frequency of atherogenic risk factors in Japanese obese children. *Diabetes Res Clin Pract* 10: S211-S219.

(2009년 12월 2일 접수, 2010년 1월 27일 채택)