

Slim813의 지방산 분해 촉진을 통한 슬리밍 효능 연구

박 미 영[†] · 정 경 미 · 주 경 미* · 김 연 준 · 박 영 호 · 임 경 민

아모레퍼시픽기술연구원 메디컬뷰티연구소, *아모레퍼시픽기술연구원 피부과학연구소
(2012년 4월 19일 접수, 2012년 5월 25일 수정, 2012년 6월 10일 채택)

Reduction of Local Body Fat Thickness and Stimulation of Fat Cell Lipolysis by Slim813

Miyoung Park[†], Kyoung-Mi Jung, Kyoung-Mi Joo*, Yeon-Joon Kim,
Young-Ho Park, and Kyung-Min Lim

Medical Beauty Research Institute, Amorepacific Co. R&D Center, Amorepacific Co. R&D Center, Bora-dong,
Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 449-729, Korea

*Skin Research Institute, Amorepacific Co. R&D Center

(Received April 19, 2012; Revised May 25, 2012; Accepted June 10, 2012)

요약: Slim813은 2-사이클로펜텐-1-온 옥심 유도체로서 다양한 염증성 자극원에 대한 TNF 생성을 억제하는 항 자극 및 UV에 의한 MMP1 억제를 통한 항 노화 효능을 갖는 물질이다. 본 연구를 통하여 이와 같은 효능 외에도 완전히 분화된 지방 세포에서 cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 생성 촉진을 통한 HSL (hormone sensitive lipase) 활성을 증대시킴으로써 지방분해를 증가시킴을 확인하였다. 또한 Slim813을 사람의 팔과 허벅지 부위에 2주간 도포하였을 때 지방의 두께 감소를 유발하는 것으로 나타나 체내 피하 지방을 분해하는 효능을 갖는 것으로 사료된다.

Abstract: Slim813 is a 2-cyclopentene-1-one oxime derivative with potent anti-inflammatory and anti-photoaging effects. Slim813 inhibited LPS-induced TNF- α production and attenuated UVB-induced MMP1 expression. Here in an attempt to find an unrevealed efficacy of Slim813, we found that Slim813 stimulates lipolysis in a dose-dependent manner by increasing intracellular cAMP level through the elevation of HSL activity in fully differentiated adipocytes. Moreover, topical application of Slim813 for two weeks in human reduced the thickness of subcutaneous fat in arm and thigh regions, implying it could be effectively used in the reduction of unwanted local fat accumulation.

Keywords: Slim813, 3T3-L1 preadipocytes, hormone sensitive lipase, cyclic adenosine monophosphate, subcutaneous fat

1. 서 론

지방조직(adipose tissue)은 체내의 주된 지방 저장소로서, 과도한 에너지 섭취로 인한 여분의 칼로리를 저장하는 보관소일 뿐만 아니라, 장기를 보호하는 쿠션 역할, 체온유지 등의 다양한 기능을 가지고 있다[1]. 이와 같은 역할을 주로 담당하는 백색지방(WAT, white adipose tissue)은 과잉의 영양성분을 주로 혈관 벽에 있는 LPL

(lipoprotein lipase)을 통해 중성지방(Triglycerides) 형태로 합성하여 저장하고, 지방세포 내에 존재하는 HSL (Hormone sensitive lipase)을 통해 저장되어 있는 지방을 분해하여 에너지를 필요로 하는 다양한 기관으로 공급한다.

이러한 지방세포 분해 시, cAMP (cyclic adenosine monophosphate)가 지방 분해를 매개하는 주요 인자로 작용하는데, 이는 지방세포 내 신호전달과정의 중요한 2차 전달자(second messenger)로서 역할을 한다. 카테콜아민(catecholamine ; 에피네프린과 노르에피네프린)

[†] 주 저자 (e-mail: mypark@amorepacific.com)

과 같은 호르몬은 β -adrenoceptors에 결합함으로써 Gs (guanine nucleotide binding protein)을 촉진하여 AC (adenylyl cyclase)를 활성화 시키게 되고, 이는 지방세포 내의 cAMP 생성을 증가시킨다. 증가된 cAMP는 다시 PKA (c-AMP-dependent protein kinase)를 인산화하여, 이를 통한 HSL의 활성을 유도함으로써 궁극적으로 중성 지방 형태로 저장된 지방을 글리세롤(glycerol)과 유리 지방산(free fatty acid)으로 분해하게 된다[2-5].

그러나 cAMP는 매우 불안정하며, 세포에 존재하는 phosphodiesterases (PDEs)라는 효소에 의해 AMP로 전환되고, 이로 인한 cAMP 농도 감소는 지방분해 활성화가 차단된다. PDEs는 11개의 아류효소로 이루어져 있으며, 지방세포에서는 세포막에 결합된 형태의 PDE3B와 세포막 결합된 형태뿐만 아니라 주로 세포질 내에 존재하는 PDE4s가 발현되어 지방산 분해에 관여하는 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 이와 같은 지방세포 내의 PDEs 효소를 저해하거나, 다양한 자극을 통하여 지방세포 내의 cAMP 농도를 증가시키는 등의 기전은 지방분해를 촉진하는 역할을 하게 된다[7,8].

현재 주로 미용 목적으로 사용되고 있는 지방 분해 촉진제로는 카테콜아민 의 유도체인 이소프로테레놀(isoproterenol)과 카페인(cafeine)이나 테오필린(theophylline)과 같은 젠틴류(xanthine), 갑상선 호르몬(thyroid hormone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 성장호르몬(growth hormone) 등이 있다. 그러나 이와 같은 물질들은 호르몬이거나 혹은 호르몬 유도체들로서 그에 따른 부작용으로 인해 사용량이 제한되어 있고, 효과에 있어서도 의견이 분분한 상황이다[9,10].

따라서 본 연구를 통하여, 지방 분해를 통한 지방 세포의 크기 및 양적인 변화를 유도하여 특정부위에 과도하게 축적된 피하 지방을 감소시키는 슬리밍 화장품의 유효 성분으로써 Slim813의 기전 및 효능을 연구해 보고자 하였으며, 이를 통해 안전하고, 효능 있는 신개념의 슬리밍 화장품 소재를 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

실험에 사용된 시약 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 triglyceride detection kit, 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone crystalline, insulin, isoproterenol hydrochloride, DMSO (Sigma, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포주들

은 미국 세포 주 은행(American Type Culture Collection : ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 각 세포 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), calf serum (CS), fetal bovine serum (FBS), anti-biotics (penicillin 100 units/mL, streptomycin 100 units/mL)은 Gibco BRL (Carlsbad, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. TNF, MMP1, cAMP ELISA는 Amersham (GE Healthcare, UK)의 각 Kits를 구입하여 실험을 진행하였고, lipolysis와 ELISA 결과 확인을 위해 ELISA reader (PerkinElmer, Victor3, USA)와 피하지방 내 두께 측정은 Lipometer (Graz, Austria)를 사용하였다.

2.2. 세포배양 및 지방세포 분화

RAW264.7와 Human fibroblast 세포주는 10 % FBS와 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 5 % CO₂ 항온조에서 배양되었고, 생쥐 유래 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 96-well 세포배양 플레이트에 5×10^4 /well이 되도록 하여, 10 % CS 및 페니실린/스트렙토마이신 항생제를 함유한 DMEM 배지 상에서, 37 °C, 10 % CO₂세포 배양기에 넣고 배양하였다. 다음날 상기 세포를 지방세포로 분화시키기 위해 10 % FBS, 0.5 mM 3-아이소부틸-1-메틸잔틴(IBMx), 1 μ M 텍사메타손(Dexamethasone), 및 167 nM 인슐린(Bovine Insulin)을 포함한 배지에서 48 h 배양한 후에, 그 배지를 10 % FBS 및 167 nM 인슐린을 포함하는 인슐린 DMEM 배지로 교환하여 다시 72 h 배양하였다. 이후 10 % FBS 혈청만을 포함한 DMEM 배지에서 48 h을 더 배양함으로써 완전하게 분화된 지방세포를 얻었다. 각 세포주에서 세포 생존율 평가는 각 96 well 세포 배양 플레이트에 Slim813을 최종 0.5 % DMSO 내 각 농도별로 투여하여 24 h 배양한 후 MTT 용액을 첨가하고 4 h 후 배양액을 제거하고 100 μ M acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 흡광을 측정하였다.

2.3. ELISA

TNF- α 를 위해서 RAW264.7 cell을, MMP-1을 위해서 human fibroblast cell을, cAMP 측정을 위해서 분화된 3T3-L1 세포주를 이용하였으며 각 자극원으로는 1 μ g/mL LPS, 20 mJ UVB, 10 μ M forskolin을 처리하였다.

Slim813은 자극원 처리 전 1 h 전처리하였고, TNF- α , MMP-1, cAMP ELISA는 Amersham Kit의 프로토콜에 따라 세포 배양액으로부터 측정되었고, 각 standard value로부터 값을 구하여 자극원을 처리하지 않은 음성

대조군과 자극원을 처리한 양성 대조군 값을 이용하여 Slim813의 효능을 계산하여 도식화하였다.

2.4. PDE4A, 4D 활성 평가

인간 PDE4A 및 4D 단백질을 이용하여 5'-AMP의 생성량은 Amersham Bioscience의 [³H]cAMP 섬광근접분석법(scintillation proximity assay)으로 분석하였다. 시험은 96 well 형태의 멀티플레이트에서 분석되었으며, 최종 분석액 100 μ L에는 최종 농도 기준으로 20 mM Tris 완충액(pH 7.4), 0.1 mg/mL BSA, 5 mM Mg²⁺, 5 μ Ci/ μ L [³H]cAMP, 0.05 mg/mL PDE4 단백질, 그리고 0.1 mg/ml 시험 물질이 포함되어 있다. PDE4 단백질 10 mL, 시험화합물 2 mL와 완충용액 78 mL를 멀티플레이트에 넣어주었다. 멀티플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 5 min 간 진탕한 후, [³H]cAMP 10 mL를 넣어주어 반응을 시작하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 30 min 간 방치한 후, SPA 비드(bead) 50 mL를 넣어주어 반응을 종료시켰다. SPA 비드가 플레이트의 바닥에 가라앉도록 30 min 간 방치한 후에 효소에 의해 분해된 cAMP의 양을 베타카운터(Wallac 1450 MicroBeta)를 사용하여 측정하였다. 시험 화합물이 포함된 상태에서의 cAMP의 분해 양과 DMSO만 포함된 상태에서의 cAMP의 분해 양을 비교하여 PDE4 억제율을 확인하였다.

2.5. 지방분해 산물인 유리 글리세롤(Glycerol) 농도 평가

완전히 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 버리고, PBS (-)로 세정한 후, 2 % BSA (Free fatty acid : Bovogen #BSAS 0.025)를 함유하는 DMEM (Low glucose, Without phenol red : WelGene #LM001-04) 200 μ L/well에 화합물 1 내지 24를 각각 10 μ M, 최종 0.5 % DMSO가 되도록 처리하여 5 h 배양하였다. 이후 세포배양 상층액만 취하여 유리 글리세롤 시약(Free Glycerol Reagent : Sigma)을 이용하여 지방 분해 산물인 글리세롤 생성량을 측정하였다. 이때 글리세롤 함량은 아래 식 1과 같이 표시된 방법으로 계산한 후, 식 2에 따라 대조군(상기 화합물을 첨가하지 않은 well, 0.5 % DMSO)의 수치를 100 %로 한 경우에 대한 상대수치로서 지방분해 촉진을 구하였다.

2.6. 박테리아 균주를 이용한 복귀 돌연변이 시험

Slim813에 대한 복귀 돌연변이 시험은 독성 시험 기준 및 GLP 규정에 따라 진행되었으며, 본 시험에서는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537

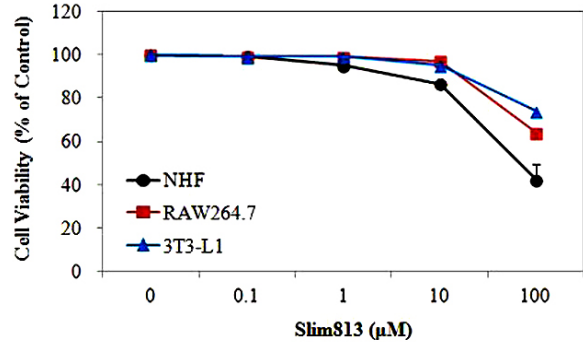
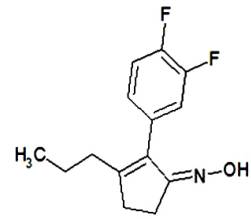


Figure 1. Structure of slim813 and cell viability.

및 *Escherichia coli* WP2uvrA의 5 균주에 Slim813을 각 농도 별로 처리하여 S9 혼합물의 처리 조건 및 비 처리 조건에서 Plate를 3개씩 사용하여 평판법으로 수행하였다.

2.7. 슬리밍 효능 시험

건강한 남성 희망자를 대상으로 12명에 대해 팔 상박의 팔꿈치로부터 10 cm에 해당되는 이두박근과 삼두박근, 허벅지 상박의 무릎으로부터 15 cm에 해당하는 앞, 뒤, 옆 부위를 시험 시작 전 각 제모 후 매일 오전, 오후 2번 vehicle과 Slim813 0.3 %제형을 각 오른쪽과 왼쪽 부위에 도포하도록 하였다. 도포 전, 도포 후 2주차에 각 해당 부위에 대해 항온, 항습 조건에서 Lipometer 계측을 통하여 피하 지방 양을 측정하였으며, 시험에 참여한 희망자 및 계측자 모두 vehicle과 Slim813 시료에 대한 double blind test를 시행하였다. 각 제형에 대한 제형내 안정성, 인체 일차 자극 및 누적 자극에 대한 안전성 시험 후, 간이 임상이 실시되었으며, 실제로 2주 도포 기간 동안 도포부위의 가려움증, 홍반 등 특별한 피부 이상이 나타난 피험자는 없었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Slim813 구조 및 세포 독성, 항염, 광노화 효능

Slim813은 2-사이클로펜텐-1-온 옥심 유도체로서 INCI name은 Difluorophenyl Propylcyclopentene Oxime이다.

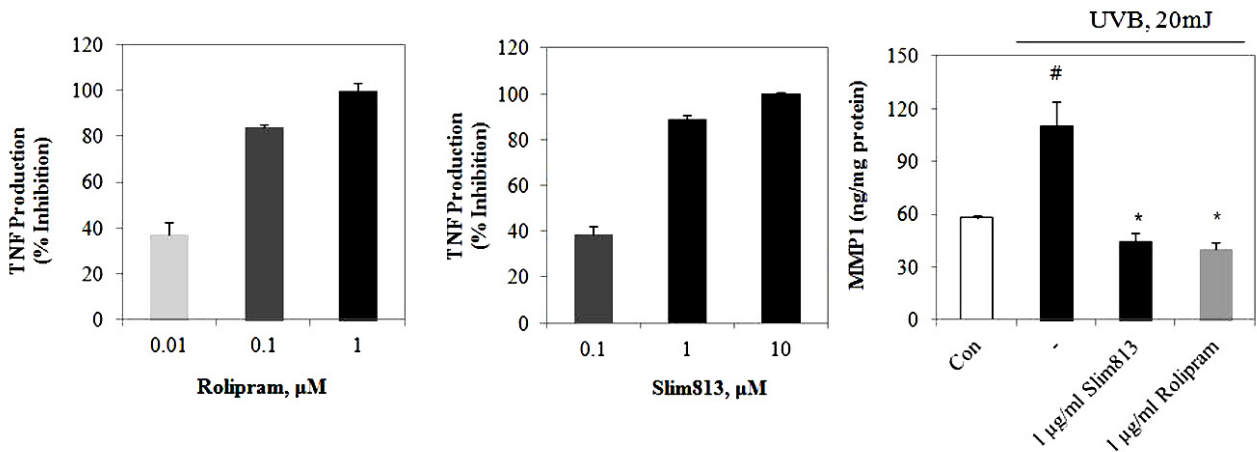


Figure 2. Inhibitory effects of slim813 on LPS-induced TNF and UVB-induced MMP1 production.

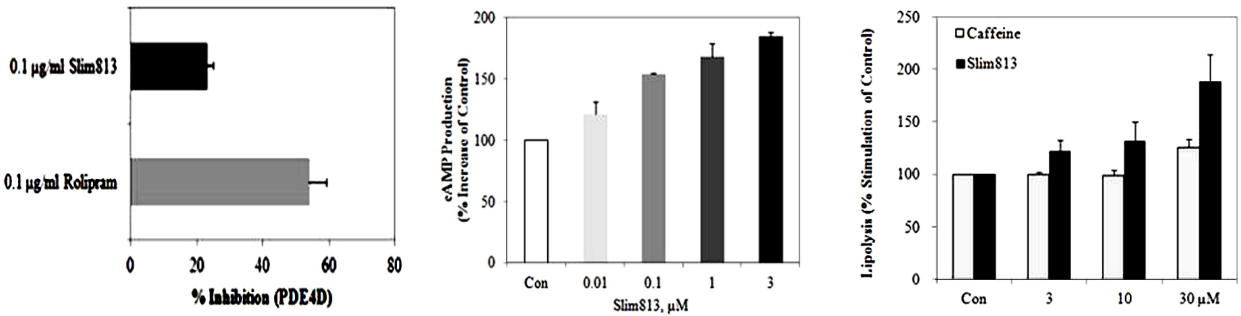


Figure 3. Inhibitory effect on PDE4D activity and Stimulatory effect on cAMP production and lipolysis by Slim813.

Neonatal human fibroblast (NHF), RAW 264.7, 3T3-L1 세포에 농도별 Slim813을 처리했을 때 100 μM의 고 농도를 제외하고는 특별히 각 세포 주에 대한 세포 생존 율에 미치는 영향은 없었다(Figure 1).

또한 Slim813의 항염 및 UVB에 대한 광노화에 미치는 영향을 평가해보고자 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 TNF 생성과 UVB 20 mJ을 NHF에 조사한 후 세포 배지에 생성된 MMP-1 생성 정도를 각 측정하였으며, 대조 물질로는 PDE4 생성을 저해함으로써 항염, 항노화 작용을 보이는 rolipram을 사용하였다. 그 결과 Slim813의 경우 TNF 생성에 대한 저해농도는 IC₅₀, 0.81 μM (0.18 μg/mL) 의 값을, UVB에 의한 MMP1 생성에 대해서는 4.5 μM (1 μg/mL)의 농도에서 약 41 % 정도의 유의적인 저해 효능을 나타내는 것을 확인하였다(Figure 2).

3.2. Slim813의 지방 분해 촉진 효능

Slim813의 LPS 자극에 의한 항염 효능과 UVB 조사에 의한 항노화 효능을 토대로 이들 작용을 나타내는 공

통의 기전을 조사한 결과 PDE4에 대한 작용을 가지고 있는 것을 알아내었으며, 항염, 항노화 관련 염증 세포나 피부세포뿐만 아니라, 분화된 지방세포에서 지방 분해 촉진에 영향을 미칠 것으로 생각되는 PDE4A 및 4D iso-type에 대한 활성을 실험하였다. 그 결과 인간 PDE4A 효소에 대해 Slim813은 특별히 저해 효능은 없었으나, PDE4에 대한 저해 작용은 0.45 μM (0.1 μg/mL)의 농도 처리 시 20 % 이상의 저해 활성을 갖는 것을 확인하였다(Figure 2). 지방세포에서 PDE4는 특별히 basal 측면에서 혹은 catecholamine-유도된 지방분해를 촉진하는 작용을 하며, 이들 각 isoforms은 모두 발현되어지고 있으나 특별히 세포질 내의 PDE4D 단백질이 보다 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이와 같은 Slim813의 PDE4D 저해 기전을 바탕으로 완전히 분화된 3T3-L1 지방 세포에 Slim813을 처리하여 cAMP 분해 억제 효능과 이를 통한 일련의 signal pathway를 통한 지방산 분해능 평가를 하였다. 완전히 분화된 지방 세포에서 Slim813은 농도 의존적으로 cAMP 생성 및

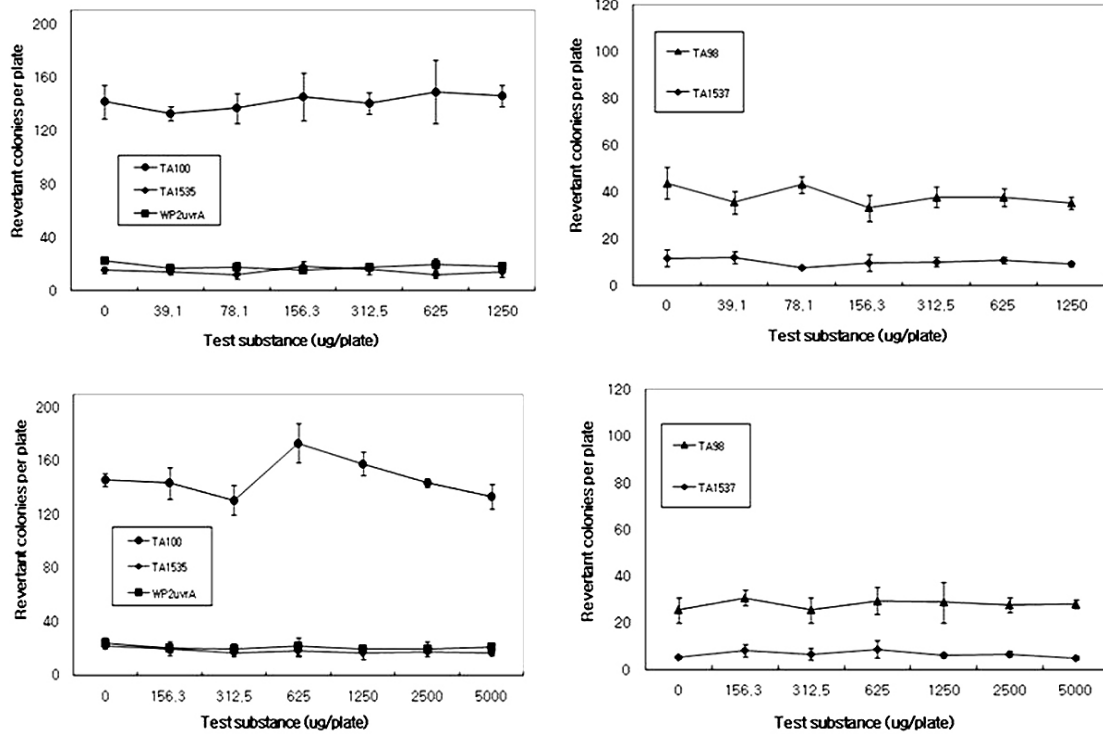


Figure 4. Bacterial reverse mutation test of Slim813.

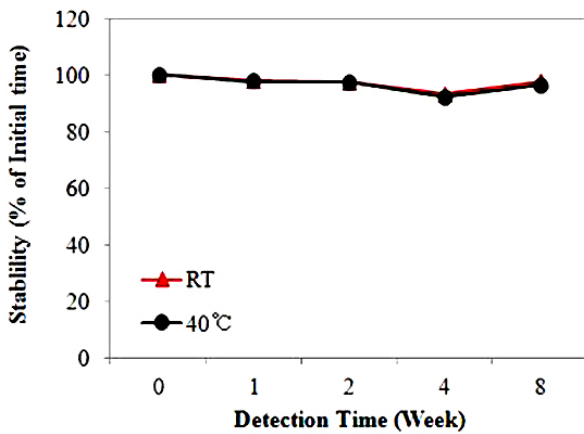


Figure 5. Emulsion stability test of Slim813.

지방산 분해를 유의적으로 촉진하였으며, 이는 양성 대조군인 카페인보다 효능이 뛰어난 것으로 나타났다 (Figure 3).

3.3. Slim813의 유전독성 평가 및 제형내 안정성

Slim813의 유전독성에 대한 영향을 평가하기 위해 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호 '의약품등의 독성시

험기준'에 따라 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이 시험을 수행하였다. 그 결과 Slim813을 39.1 ~ 1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도로 처리한 S9 혼합물의 비처리 조건에서 다섯 균주에 대해 유전 독성을 나타내는 복귀변이 콜로니 수의 용량 의존적 증가가 관찰되지 않았다. 또한 156.3 ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도로 처리한 S9 혼합물의 처리 조건에서 또한 다섯 균주에 대하여 유전 독성을 나타내는 복귀변이 콜로니 수의 용량 의존적인 증가가 관찰되지 않았다(Figure 4). 따라서 Slim813은 박테리아 균주의 복귀 돌연변이를 유발시키지 않는 안전한 원료임을 확인하였다. 결과에는 나타내지 않았으나 우리는 Slim813에 대한 인체 피부 일차자극과 누적 자극 시험을 시행하여 0.6 %까지 무 자극임을 확인하였다. Slim813의 임상 시험을 위한 0.3 % 제형을 제조하였으며 제형내 안정성을 상온과 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 8주간 평가한 결과 처음 baseline stability을 유지하는 매우 안정적인 물질임을 확인하였다(Figure 5).

3.4. 인체 피하지방 분해 효능

완전히 분화된 3T3-L1 지방세포에서 cAMP 생성 및 지방산 분해 효능 평가 결과를 갖는 Slim813이 실제로

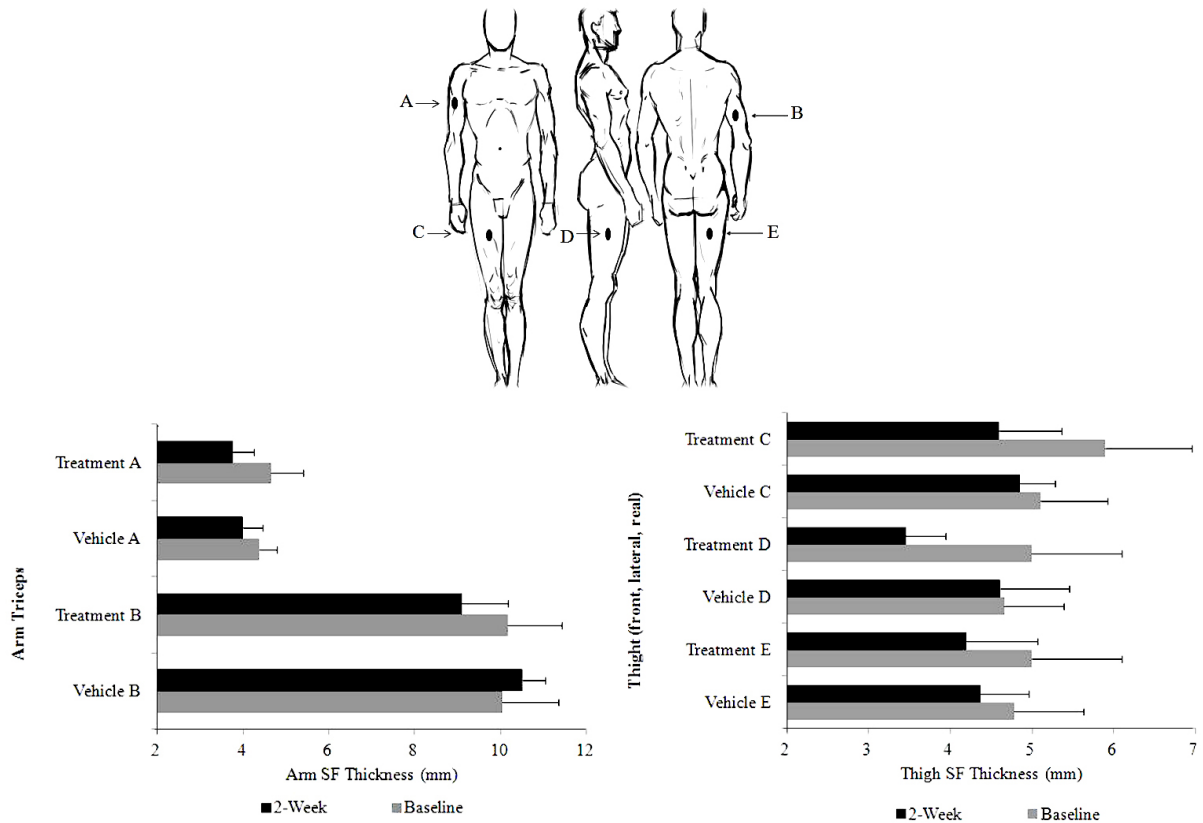


Figure 6. Effect of Slim813 on subcutaneous fat thickness.

사람피부에 도포했을 때 피하지방 분해 효과를 나타내는지 확인해 보고자 하였다. 안전성과 제형내 안정성이 확인된 Slim813 제형을 BMI 25 수준의 건강한 남성 12명의 팔과 다리에 각 2주간 Slim813이 들어 있지 않은 vehicle 제형과 0.3 % Slim813이 들어있는 제형을 피험자 및 계측자 double blind로 실험하였다. 각 피험자의 체중은 시험 전 72.99 ± 7.29 (체중 평균 \pm 표준 편차), 그리고 도포 2주후 72.99 ± 6.83 이었으며, 체중을 키의 제곱값으로 나눈 체질량 지수(BMI)는 시험 전 25.18 ± 1.89 , 도포 2주후 25.19 ± 1.79 로 시험에 따른 체중 변화는 없었다. Vehicle 제형을 바른 오른쪽 부위의 baseline value 대비 Slim813 제형 도포 시 2주 후, 도포 동일부위 왼편의 경우 10 ~ 20 % 피하 두께 감량 형태를 보였고, 허벅지의 경우는 vehicle 제형만 바른 오른쪽 부위에 비해 왼편 동일부위의 Slim813 제형을 도포한 부위의 피하 지방 두께 역시 15 ~ 30 % 정도의 감량 효능을 보이는 것으로 나타나 세포주 실험에서 뿐만 아니라 실제 사람 임상 시험에서도 피하지방 감소와 같은 부분 비만을 개선하는 효능을 가질 수 있음을 확인하였다(Figure 6).

4. 결 론

위와 같은 결과에서 Slim813은 안전하고 안정적이며, PDE4D 효소 저해를 통한 항염과 광노화 효능 이외에도 분화된 지방세포에서 cAMP 생성 촉진 및 분해 억제제를 통한 일련의 세포신호 전달 과정을 통하여 지방세포 분화에 탁월한 효능을 갖는 것을 확인하였다. 세포 실험 결과와 더불어 인체 지방이 밀집된 부분에 도포했을 시 실제로 지방 분해 효능을 나타냄으로써 피하 지방 두께 감량에 유의한 효능이 있음을 밝혀지게 되어 새로운 슬리밍 소재로서의 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. C. Saverio, The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **16**(8), 569 (2006).
2. G. Y. Carmen and S. M. Victor, Signalling mechanism regulating lipolysis, *Cell Signal*, **18**, 401 (2006).

3. A. J. Garton, D. G. Campbell, D. Carling, D. G. Hardie, R. J. Colbran, and S. J. Yeaman, Hormone-sensitive lipase is responsible for the neutral cholesterol ester hydrolase activity in macrophages, *Eur. J. Biochem.*, **179**, 249 (1989).
4. P. M. McDonough, R. S. Ingermanson, P. A. Loy, E. D. Koon, R. Whittaker, C. A. Laris, J. M. Hilton, J. B. Nicoll, B. M. Buehrer, and J. H. Price, Quantification of hormone sensitive lipase phosphorylation and colocalization with lipid droplets in murine 3T3L1 and human subcutaneous adipocytes via automated digital microscopy and high-content analysis. *Assay, Drug Dev. Technol.*, **9**, 262 (2011).
5. C. Berggreen, A. Gormand, B. Omar, E. Degerman, and O. Gransson. Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, 635 (2009).
6. C. Schmitz-Peiffer, M. L. Reeves, and R. M. Denton. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes present in rat epididymal fat cells. *Cell. Signal.*, **4**, 37 (1992).
7. M. D. Houslay. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem. Sci.*, **35**(2), 91 (2009).
8. C. P. Page and D. Spina. Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **204**, 391 (2011).
9. F. L. Greenway and G. A. Bray. Regional fat loss from the thigh in obese women after adrenergic modulation. *Clin. Therapy.*, **9**(6), 663 (1987).
10. R. Hursel and M. S. Westerterp-Plantenga. Thermogenic ingredients and body weight regulation. *Int. J. Obes.*, **34**(4), 659 (2010).