

## 잣기름 성분분석 및 비만 예방효과 연구

김경곤<sup>1,†</sup> · 강운환<sup>2,†</sup> · 김대중<sup>2</sup> · 김태우<sup>2</sup> · 최 먼<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 생명건강공학과, <sup>2</sup>강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터

### Analysis of Pine Nut Oil Composition and Its Effects on Obesity

Kyoung Kon Kim<sup>1,†</sup>, Yun Hwan Kang<sup>2,†</sup>, Dae Jung Kim<sup>2</sup>, Tae Woo Kim<sup>2</sup>, and Myeon Choe<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University

<sup>2</sup>Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University

**Abstract** Pine nut oil (PNO) is well known to impart beneficial effects in overweight individuals, but the mechanisms underlying PNO-mediated weight loss remain unclear. To investigate how PNO promotes weight loss, its composition was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). In addition, the effects of PNO on cytotoxicity, lipid accumulation, expression of lipid metabolism-related biomarkers, and leptin secretion were assessed in 3T3-L1 cells. GC-MS analyses revealed that PNO contains several components, including linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, and stearic acid. Moreover, PNO did not have a cytotoxic effect on 3T3-L1 cells. However, it inhibited the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and adipocyte protein 2 (aP2). Finally, PNO significantly increased leptin secretion in a dose-dependent manner. Taken together, these results support the notion that PNO is useful for weight management in overweight individuals.

**Keywords:** pine nut oil, fatty acid synthesis, overweight, leptin, food material

## 서 론

잣나무(*Pinus koraiensis*)는 홍송(紅松)이라고도 하며 한국, 일본, 중국, 러시아의 해안지방에 분포한다(1). 높이 30 m, 지름 1 m에 달하는 커다란 나무로 열매는 구과(毬果)로 긴 달걀 모양이며 종자는 삼각형이나 난형으로 다음해 10월에 익으며 길이 12-18 mm, 지름 10 mm로서 식용 또는 약용으로 한다(1,2). 잣의 일반성분을 보면 지방질 70%, 단백질 15%, 탄수화물 5%가 들어 있으며 자양강장 효과가 있다(2). 잣의 지방유는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, eicosenoic acid, pinolenic acid 등의 성분이 함유된 것으로 알려져 있다(3). 대부분은 불포화 지방산인 oleic acid와 linoleic acid로 이루어져 있으며 oleic acid는 상처치료, 면역 및 염증 질환과 암에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 linoleic acid는 항염증작용이 잘 알려져 있다(4,5). 잣기름(pine nut oil, PNO)은 특이하게 pinolenic acid를 다량 함유하고 있는데 그 기능적 특징으로 low-density lipoprotein (LDL) receptor의 활성을 통한 LDL 감소와 항암효과가 보고되어있다(6,7).

최근 연구에서 PNO 섭취에 의한 항비만 효과가 보고되고 있지만(3,8) 아직 그 작용기전에 대한 자료는 부족한 상황이다(9,10).

비만억제를 위해 가장 먼저 진행되어야 할 부분은 음식의 섭취를 제어하는 것이며 그 다음단계는 소화된 탄수화물이 지방으로 축적되지 않도록 하는 것이다.

음식섭취를 제어하기 위해서는 공복감을 해소하는 다양한 호르몬의 분비를 촉진하는 것이 효과적인 것으로 보고되어있다. 그 중 leptin은 지방세포에서 분비되는 adipokine으로 leptin receptor와 결합하여 식욕억제하고 에너지소비를 증가시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(11). 또한, 지방축적 억제를 위해서는 지방합성 억제와 함께 생성된 지방의 지방세포 내 전달을 억제하거나 지방 세포내 축적된 지방을 에너지대사를 통해 소진하는 것이 효과적인 항비만 효과를 유도하는 방법으로 알려져 있다(12-14).

이에 본 연구는 PNO의 항비만 효능을 검증하기 위해 구성성분을 분석하고 지방세포로 분화가 가능한 3T3-L1 세포를 이용하여 PNO의 섭취가 유도할 수 있는 비만억제의 유익한 기능에 대한 기초자료를 확보하고자 실험을 진행하였으며, 이를 통해 확보된 기초자료들은 PNO의 기능을 이용한 다양한 제품의 생산 및 적용에 근거자료로 이용될 것이다.

## 재료 및 방법

### 잣기름(PNO) 제조

PNO는 잣 550 g에 *n*-hexane 700 mL을 혼합 후 30분 동안 초음파 추출한 후 그대로 24시간 침지 시킨 후 0.45 µm filter로 여과하여 감압농축 후 분석시료로 사용하였다.

### GC 분석용 시료 준비

GC 분석을 위한 PNO 샘플의 fatty acid methyl ester화는 Watkins 등(15)의 방법을 이용하였다. PNO 25 mg을 cap tube에 칭량

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Myeon Choe, Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea

Tel: 82-33-8645

Fax: 82-33-342-7368

E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

Received May 14, 2014; revised June 29, 2014;

accepted July 1, 2014

하고 0.5 N methanolic NaOH 1.5 mL을 가한 뒤 약 100°C의 heating block에 5분간 가열하였다. 식물성 유지에는 트리글리세라이드의 양이 적어 비누화로 메틸레이션을 촉진시켰다. 가열된 시료를 30-40°C의 수욕상에서 1-2분간 냉각된 시료에 촉매역할을 위해 14% BF<sub>3</sub>-methanol (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) 2 mL을 가한 후 vortex하여 충분히 혼합하고 약 100°C heating block에서 약 2분간 가열하였다. 이후 30-40°C 수욕상에서 1-2분 방치하여 완전히 냉각시켰다. 냉각된 PNO에 isoocane 2 mL와 층분리를 잘 되게 하기 위하여 saturated NaCl 1 mL를 가하고, 이후 충분히 vortex하여 1-2분간 방치한 뒤 상층액을 회수하고 sodium sulfate를 이용하여 여과, 탈수 한 뒤 gas chromatography (Agilent 6890N GC/FID, Agilent Technologies, Beijing, China)로 분석 하였다.

**PNO 성분 분석방법**

시료 중 지방산의 분석은 식품공전의 일반분석법 중 “1.1.5.4 지방산”(16)에 기초하여 gas chromatography를 이용하여 지방산을 분석하였다. 지방산 표준용액은 지방산메틸에스터 혼합(37종) 표준품 FAME Mix C4-C24 (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) 100 mg을 isoocane 1 mL에 녹여 조제하였다. 지방산의 정량을 위해 gas chromatography (Agilent 6890N GC/FID, Agilent Technologies, Beijing, China)를 이용하였으며 지방산 37종의 머무름 순서를 확인하기 위해 GC/MSD (Agilent 5975C, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

**3T3-L1 세포배양 및 지방적 측정**

3T3-L1세포는 10% calf serum을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)에 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양, 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 지방 세포로의 분화를 위해 6 well plate에 5×10<sup>5</sup> cell/well의 세포를 분주하여 세포가 충분히 밀집되게 배양하였다. 2일 후 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 1 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin (MDI solution), 및 10% FBS 을 포함하는 DMEM에서 2 일 동안 배양함으로써 분화를 개시한 다음, 10 µg/mL insulin 및 10% FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM으로 교환하여 3일 동안 분화를 진행시켰다. 그 이후로는 10% FBS만을 포함하는 DMEM에서 배양함으로써 세포 내 지방적(lipid droplet)을 형성하는 지방세포로 분화시켰으며(17,18), 지방적의 양은 Oil Red O를 사용하여 확인하였다(19).

**PNO의 3T3-L1 세포에 대한 독성**

PNO의 세포독성은 Cell Counting Kit (CCK)-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)을 이용하여 Lee 등(20)의 방법을 응용하여 확인하였다. 3T3-L1 세포를 96 well에 1.5×10<sup>5</sup> cell/well로 분주한 후 24시간 부착시킨다. FBS가 첨가되지 않은 배지에서 PNO를 0.01-0.4 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 37°C에서 배양 하였다. 24시간 후 배양중인 배지(200 µL)에 CCK-8 reagent를 20 µL 씩 가해주고 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)의 흡광도 값을 기준으로 세포독성을 비교하였다.

**mRNA 추출 및 RT-PCR**

mRNA 추출과 RT-PCR은 Baek 등(21)의 실험방법을 변형하여 사용하였다. 3T3-L1을 6-well plates에서 분화유도한 후 PNO 0.1 mg/mL을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. PNO가 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis reagent (Qiagen, Hilden, Germany)를 각 wells에 1 mL씩 분주하여 세포를 lysis하였다. Lysate는 chloroform 200 µL를 분주하여 15초간 섞었다. 그 후 12,000×g에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 isopropanol 500 µL이 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000×g에서 10분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate water (DEPC)를 75:25로 섞어 만든 75% ethanol을 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 12,000×g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하고 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 µL씩 분주하여 녹인 후 260 nm에서 흡광 측정하여 total RNA 양을 정량하였다.

First strand cDNA는 AmfiRiert Platinum cDNA Synthesis Master Mix (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하여 합성하였다. 추출한 RNA (2 µg)와 RNase free water로 9 µL을 맞추고 70°C에서 5분간 반응시킨 후 2× cDNA synthesis 완충용액 10 µL, cDNA synthesis enzyme mix 1 µL, 를 섞어 11 µL씩 각 PCR tube에 더한 후 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) 및 aP2 (adipocyte protein 2)의 mRNA 발현량 측정은 Go Tag Green Master (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 준비된 cDNA를 manual에 따라 RT-PCR하여 진행하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 Table 2와 같다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가된 1.0% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 UV 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도

**Table 1. Analysis condition of GC and GC/MSD**

Item	Condition	
	GC	GC/MSD
Column	Supelco SP-2560 (US) (100 m × 0.25 mm I.D, 0.20 µm film)	Supelco SP-2560 (US) (100 m × 0.25 mm I.D, 0.20 µm Film)
Detector	FID, 260	-
Oven	100°C (3 min)→3°C/min→240°C (20 min)	100°C (3 min)→3°C/min →240°C (15 min)
Injector	225°C	240°C
Split ratio	100:1	10:1
Injection Volume	1 µL	0.2 µL
Mobile phase	He, 0.8 mL/min	He, 0.75 mL/min

**Table 2. PCR primer sets used in the experiment**

	Primer	Sequence (5'→3')	PCR product size
PPAR $\gamma$	Sense	GGTGAAACTCTGGGAGA	195 bp
	Antisense	CAACCATTGGGTCAGC	
aP2	Sense	GTGGGAACCTGGAAGCTTGT	191 bp
	Antisense	ACGCCAGTTGAAGGAAAT	
$\beta$ -Actin	Sense	GGAGCCAAAAGGGTCATCAT	203 bp
	Antisense	GTGATGGCATGGACTGTGGT	

를 Image J (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

### Leptin 분비량 측정

지방세포에서 분비되어 배지에 함유된 leptin의 양은 Feng 등 (22)의 실험조건을 응용하여 진행하였다. 방법은 commercial kit (Quantikine & Immunoassay kit, R&D System, Minneapolis, MN, USA)에서 제공하는 ELISA protocol에 따라 분석하였다. Leptin 항체가 부착되어 있는 96-well plate에 배지 sample 100  $\mu$ L씩을 넣어 1시간 동안 배양하였다. PBS-T (phosphate buffered saline-tween 20)로 3차례 세척한 후 100  $\mu$ L의 biotinylated rabbit anti-mouse leptin IgG (200 ng/mL, R&D System, Minneapolis, MN, USA)을 넣고 1시간 동안 상온에서 배양한 후 다시 PBS-T로 3번 세척하였다. 각 well에 100  $\mu$ L의 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 넣고 30분 동안 빛이 들어가지 않는 상태에서 반응시켰다. 이 반응은 well 당 50  $\mu$ L의 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가함으로써 종료시켰다. 반응 종료 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Leptin 분비량은 대조군과 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

### 통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, IL, USA) program을 이용하여 mean $\pm$ SD로 표시하였고, one-way ANOVA test에 의해  $p < 0.05$  수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

**Table 3. Fatty acid profiles of pine nut oil (PNO)**

Peak #	Name (acid methyl esters)	Retention time (min)	Area	Area %
1	undecanoic acid methyl ester <sup>1)</sup>	29.12	24.22669	3.26383
2	Unknown	30.777	2.68434	0.36164
3	Unknown	34.246	5.53568	0.74577
4	palmitic acid methyl ester	41.602	38.72523	5.21709
5	stearic acid methyl ester	45.898	20.39443	2.74755
6	oleic acid methyl ester	47.332	190.9287	25.72204
7	Unknown	47.495	3.15317	0.4248
8	Unknown	48.364	15.67828	2.11219
9	linoleic acid methyl ester	49.365	322.3197	43.42312
10	arachidic acid methyl ester	49.844	2.72693	0.36737
11	Unknown	50.435	95.6045	12.8799
12	cis-11-eicosanoic acid methyl ester	51.187	8.68117	1.16953
13	cis-11,14-eicosadienoic acid methyl ester	53.193	4.24217	0.57151
14	Unknown	54.369	7.37578	0.99367

<sup>1)</sup>Undecanoic acid (C 11:0, 29.065 min) was used as a internal standard.

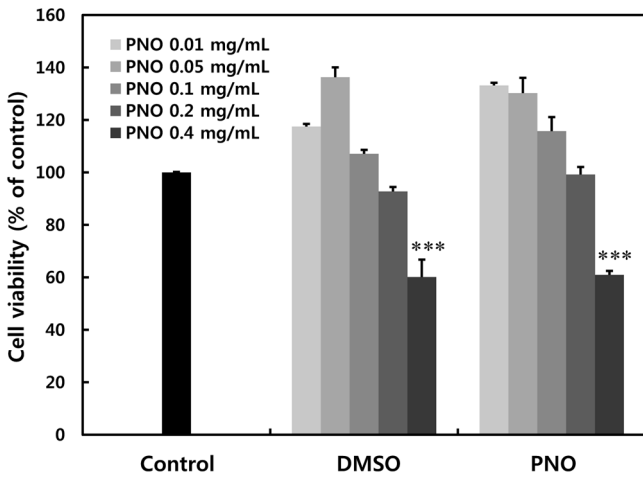
## 결과 및 고찰

### GC분석을 통한 PNO의 지방산조성

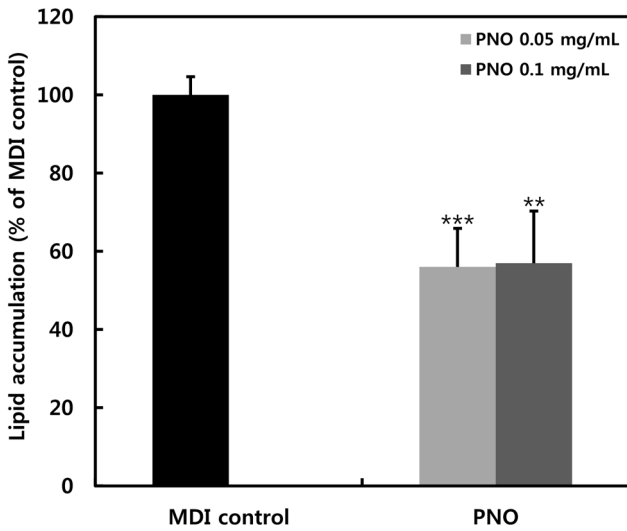
PNO는 지방산 표준용액의 retardation time을 기준으로 그 구성 성분을 분석하였다. PNO에 함유된 성분을 분석한 결과는 Table 3에 나타내었다. Acheampong 등(23)은 oleic acid 24%, linoleic acid 48.4%, pinolenic acid 14.9%, palmitic acid 4.2%의 분석결과를 보고한 바 있다. 본 분석실험 결과 oleic acid 25.7%, linoleic acid 43.4%, palmitic acid 5.2%가 분석되었으며, 분석결과와 보고된 논문자료를 바탕으로 pinolenic acid로 예측되는 11번 unknown peak는 12.8%의 함량이 확인되었다(23,24). 함량계산은 내부표준 물질 undecanoic acid의 함량을 기준으로 계산하였다.

### PNO의 세포독성

PNO는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 하여 본 실험에 사용되었으므로 PNO의 3T3-L1 세포에서의 독성실험은 DMSO 용매 단독 처리군과 비교하여 확인하였다(Fig. 1). PNO는 농도에 따라 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL 그리고 0.4 mg/mL을 처리하였으며 최고농도인 0.4 mg/mL에서 독성이 관찰되었다. 그러나 DMSO 용매 단독 처리군에서도 PNO 독성실험과 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 이는 실험에서 관찰된 PNO의 세포독성이 oil성분이 아닌 DMSO의 농도에 따른 것임을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 이후의 실험에서는 PNO 0.2 mg/mL 농도 이하에서 수행하였다.



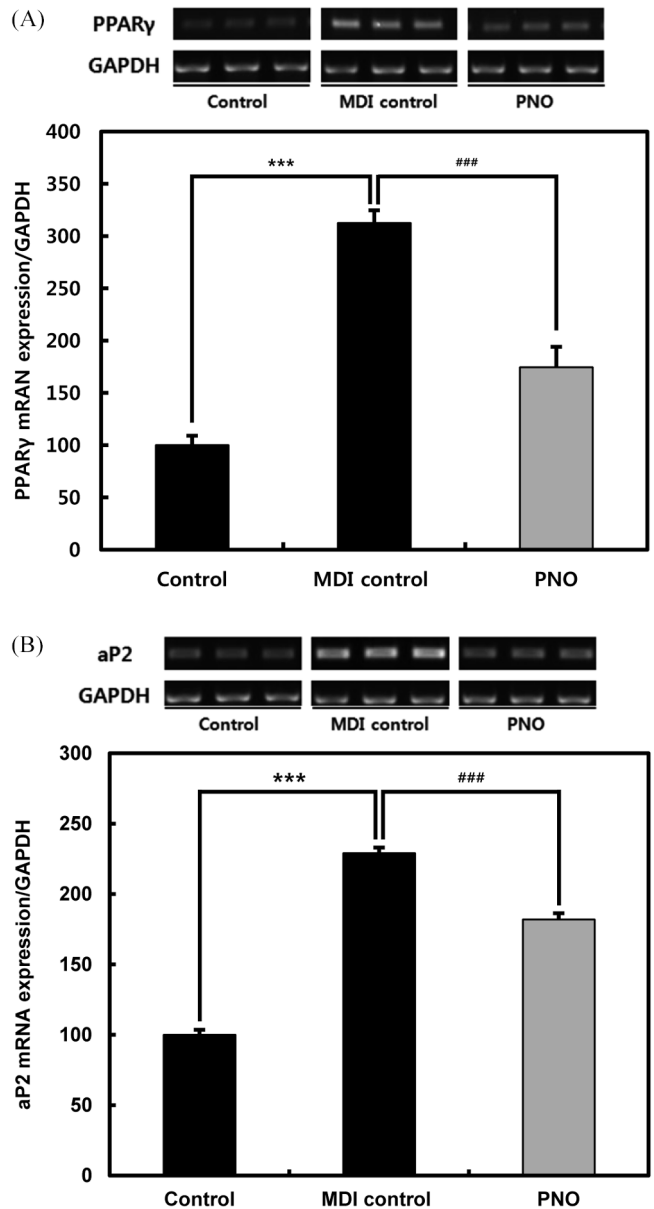
**Fig. 1. Concentration-dependent effect of pine nut oil (PNO) on 3T3-L1 cell growth.** Cell viability (0.01-0.4 mg/mL) was analyzed using the CCK-8 assay kit. Each bar is the mean±SD from three independent experiments. \*\*\*indicates a significant difference ( $p<0.001$ ) by one-way ANOVA.



**Fig. 2. Pine nut oil (PNO) inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 cells.** Adipocytes were incubated with two concentrations (0.05 and 0.1 mg/mL) of PNO and lipid accumulation was determined by Oil Red O staining. Results are presented as mean±SD of three independent experiments. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  as compared to the MDI control by one-way ANOVA.

**PNO 처리에 의한 지방축적량 변화 측정**

PNO의 항비만 효과는 3T3-L1의 지방축적 저해효과를 관찰하는 것으로부터 연구를 시작할 수 있다. 3T3-L1은 지방세포로의 분화가 가능하며 분화가 완료된 세포에서는 지방의 합성과 분해에 관련되는 다양한 메커니즘의 연구가 가능하다(21,22). 본 실험에서는 PNO 처리가 3T3-L1 adipocyte의 지방적(lipid droplet) 형성을 얼마나 저해할 수 있는지 Oil Red O staining을 통해 확인하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같다. Pre-adipocyte에서 adipocyte로 분화가 완료된 MDI control 그룹과 adipocyte에 PNO 0.05, 0.1 mg/mL을 처리한 그룹을 비교한 결과 MDI control (100%) 대비 약 56, 57%까지 지방적의 형성을 억제하는 것이 관찰되었다. 그러나 농도의존적인 지방적 억제효과는 관찰되지 않았다. 이 결

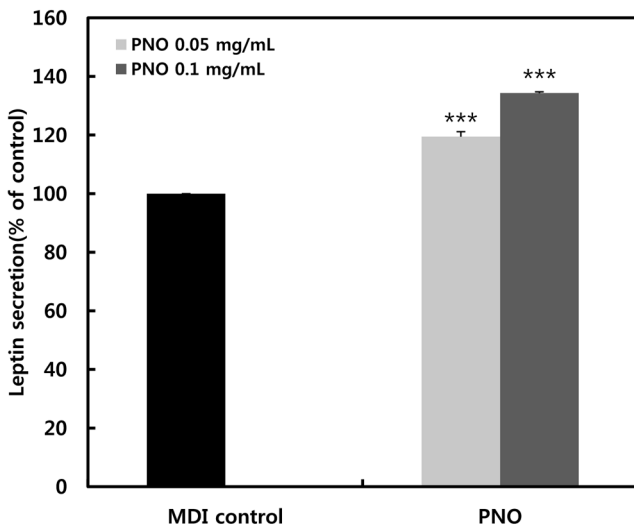


**Fig. 3. Effect of pine nut oil (PNO) (0.1 mg/mL) on peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and adipocyte protein 2 (aP2) mRNA expressions in 3T3-L1 cells.** Results are presented as mean±SD of three independent experiments. \*\*\* $p<0.001$  as compared to the control, ### $p<0.001$  as compared to the MDI control by one-way ANOVA.

과는 Le 등(9)의 연구결과에서 보고한 PNO의 skeletal muscle에서의 지방 에너지대사 촉진과 함께 PNO의 항비만 효과를 확인한 또 다른 결과라 할 수 있을 것이다.

**PPAR $\gamma$  및 aP2의 발현억제활성 측정**

3T3-L1 분화유도세포에서 지방적 형성이 저해되는 것을 관찰하고 그 이유를 찾기 위해 지방의 합성과 축적에 관련되는 biomarker의 발현을 mRNA 수준에서 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 PPAR $\gamma$ 와 aP2의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 지방세포의 분화와 지방축적에 영향을 미치는 transcription factor는 다수가 알려져 있다. 그중 sterol regulatory element bind-



**Fig. 4. Pine nut oil (PNO) induces leptin secretion in 3T3-L1 cells.** Adipocytes were incubated with two concentrations (0.05 and 0.1 mg/mL) of PNO. Leptin secretion was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results are presented as mean±SD of three independent experiments. \*\*\* $p$ <0.001 as compared to the MDI control by one-way ANOVA.

ing proteins (SREBPs), CAAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs), peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) 등이 가장 잘 연구되어 있다(25). 본 실험에서는 PNO 0.1 mg/mL을 처리한 후 이들의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였으며 (data not shown), 그 중 PPAR $\gamma$ 가 분화 전(control)과 비교하여 분화 후 (MDI control) 3배가량 발현이 증가하였다가 PNO 처리 후 MDI control 대비 약 55% 수준까지 감소시키는 것을 Fig. 3A에서 확인할 수 있었다. PPAR $\gamma$ 는 mature adipocyte에서 발현되며 다양한 대사관련 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있고, 특히 glucokinase, perilipin, adipocyte protein 2 등의 대사 및 지방축적에 관련된 인자 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다(26,27). PPAR $\gamma$ 의 target 유전자들 중 adipocyte 대사작용에 관여되는 glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, perilipin, aP2의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 결과(data not shown), aP2의 발현이 MDI control에서 증가하였다가 PNO 처리에 의해 유의한 수준으로 감소하는 것을 Fig. 3B에서 관찰할 수 있었다. aP2는 fatty acid binding protein 4로 알려져 있으며, adipocyte에서 fatty acid trafficking에 관여하여 비만을 증가시키고 macrophage에서 염증반응과 foam cell 형성 및 cholesterol의 방출을 조절하는 것으로 알려져 있다(13). 이 실험결과를 통해 PNO의 처리에 의해 감소된 PPAR $\gamma$ 에 의해 aP2의 발현이 감소하여 지방운반이 억제되어 3T3-L1세포내 지방축적이 저해되었음을 예측할 수 있었으며, 항비만 소재로서의 가능성을 다시 한 번 확인할 수 있었다. 그러나 추가적인 PPAR $\gamma$ 의 단백질 발현과 세포핵으로의 localization 및 aP2의 단백질 발현과 함께 aP2 promoter와 PPAR $\gamma$ 의 반응성이 PNO의 처리에 의해 어떻게 변화되는지에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

#### PNO의 leptin 방출유도 효과

PNO의 섭취가 식욕을 억제한다는 보고는 Hughes 등(8)과 Paman 등(10)의 연구를 통해 이루어졌으며, endogenous cholecystokinin과 glucagon like peptide-1의 증가에 의한 것임을 규명하였

다. 본 실험에서는 3T3-L1세포를 이용하여 PNO 0.05, 0.1 mg/mL을 처리하였을 때 방출되는 leptin의 함량을 배지에서 측정하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같다. 방출되는 leptin의 함량은 MDI control (100%)대비 농도 의존적으로 PNO 0.05 mg/mL에서 119.5%, PNO 0.1 mg/mL에서 134.3% 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 PNO의 식욕억제에 관련된 또 다른 호르몬 leptin을 확인할 수 있었다. leptin은 지방세포에서 분비되는 주요 호르몬 중 하나로 순환계로 들어간 후 뇌로 전달되면 leptin 수용체와 결합하여 신경을 통해 신호를 전달하게 되며 그로인해 음식섭취를 줄이고 에너지소비를 증가시키는 것으로 알려져 있다(11).

## 요 약

본 연구에서는 성분분석을 통해 품질이 확인된 PNO의 항비만 효과를 세포수준에서 확인하고 기능성소재로서의 연구 가능성을 제시하고자 수행하였다. 그 결과 PNO는 기준에 알려진 바와 같이 linoleic acid, oleic acid, pinolenic acid, 및 palmitic acid가 분석되었으며 정량을 위한 표준물질인 undecanoic acid의 함량을 기준으로 확인한 결과 linoleic acid 43.4%, oleic acid 25.7%, pinolenic acid로 예측되는 11번 unknown peak 12.8%, palmitic acid 5.2% 및 다수의 미량 성분을 함유하고 있었다. 세포독성 실험을 통해 0.2 mg/mL 농도 까지 독성이 관찰되지 않음을 확인하였으며 그 이상의 농도에서도 PNO보다는 용매 DMSO에 의한 독성이 관찰되었다. PNO를 이용하여 항비만 효과에 대한 잠재적 기능 및 기전을 연구하기 위해 Oil Red O staining, PPAR $\gamma$  및 aP2 mRNA 발현 확인 그리고 leptin의 분비량 측정을 진행하였다. 그 결과 PNO는 MDI solution 처리를 통해 분화가 유도된 mature adipocyte에서 지방적(lipid droplet) 형성을 유의하게 억제하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 PNO가 항비만 활성에 잠재적으로 기능을 할 수 있음을 의미한다. 또한 PPAR $\gamma$ 와 aP2 mRNA 발현을 확인한 결과, 두 유전자가 유의한 수준으로 MDI control 대비 감소하는 반면 SREBP-1c, C/EBP $\alpha$ , glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase 및 perilipin에는 영향이 없는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). RT-PCR 결과는 PNO의 처리가 지방대사 및 축적을 단백질 및 유전자 발현조절 기전에 의해 억제할 수 있음을 제시하여 주며, 추가적인 연구가 필요함을 시사한다. 마지막으로 확인한 PNO의 leptin 방출유도 실험을 통해 leptin이 PNO의 처리에 의해 농도 의존적으로 방출량이 증가됨을 확인할 수 있었다. Leptin은 식욕억제 효과가 있는 호르몬으로 잘 알려져 있다. 이는 PNO가 기준에 알려진 cholecystokinin과 glucagon like peptide-1 (GLP-1)의 분비증가를 통해 식욕을 억제할 뿐만 아니라 leptin의 방출을 유도하여 추가적인 식욕억제작용을 유도할 수 있음을 의미한다. 위의 연구결과를 종합하면 PNO는 불포화지방산이 다량 함유된 우수한 식물성유지이며 기능적으로 항비만 효능을 잠재적으로 가지는 우수한 소재임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구결과를 기초자료로 하여 효과적인 기능성 식품 및 소재의 개발을 위해 체계적이고 과학적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부 고부가가치 식품개발사업 (312001-03-01-HD040), 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터 (B0009702) 및 강원대학교 생명공학연구소 (320130015)의 일부 지원으로 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

1. Kim J, Im S, Choi SH, Lee JS, Roh MS, Lim YP. Construction of a full-length cDNA library from *Pinus koraiensis* and analysis of EST dataset. *CNU J. Agr. Sci.* 38: 11-16 (2011)
2. Yoon TH. Fatty acid composition of total lipids from seeds of *Pinus koraiensis*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 16: 93-97 (1987)
3. Park S, Lim Y, Shin S, Han SN. Impact of Korean pine nut oil on weight gain and immune responses in high-fat diet-induced obese mice. *Nutr. Res. Pract.* 7: 352-358 (2013)
4. Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev. Med. Chem.* 13: 201-210 (2013)
5. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336: 909-917 (2005)
6. Lee JW, Lee KW, Lee SW, Kim IH, Rhee C. Selective increase in pinolenic acid (all-cis-5,9,12-18:3) in Korean pine nut oil by crystallization and its effect on LDL-receptor activity. *Lipids* 39: 383-387 (2004)
7. Chen SJ, Hsu CP, Li CW, Lu JH, Chuang LT. Pinolenic acid inhibits human breast cancer MDA-MB-231 cell metastasis *in vitro*. *Food Chem.* 126: 1708-1715 (2011)
8. Hughes GM, Boyland EJ, Williams NJ, Mennen L, Scott C, Kirkham TC, Harrold JA, Keizer HG, Halford JC. The effect of Korean pine nut oil (PinnoThin™) on food intake, feeding behaviour and appetite: a double-blind placebo-controlled trial. *Lipids Health Dis.* 7: 6 (2008)
9. Le NH, Shin S, Tu TH, Kim CS, Kang JH, Tsuyoshi G, Teruo K, Han SN, Yu R. Diet enriched with korean pine nut oil improves mitochondria oxidative metabolism in skeletal muscle and brown adipose tissue in diet-induced obesity. *J. Agr. Food Chem.* 60: 11935-11941 (2012)
10. Paman WJ, Heimerikx J, Rubingh CM, van den Berg R, O'Shea M, Gambelli L, Hendriks HF, Einerhand AW, Scott C, Keizer HG, Mennen LI. The effect of Korean pine nut oil on *in vitro* CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids Health Dis.* 7: 10 (2008)
11. Yu JH, Kim MS. Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab. J.* 36: 391-398 (2012)
12. Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thre A, Rydn M, Hamsten A, Arner P. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia.* 44: 1268-1273 (2001)
13. Furuhashi M, Tuncman G, Grgn CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447: 959-965 (2007)
14. Nugara RN, Inafuku M, Iwasaki H, Oku H. Partially purified *Peucedanum japonicum* Thunb extracts exert anti-obesity effects *in vitro*. *Nutrition* 30: 575-583 (2014)
15. Watkins BA, Shen CL, McMurtry JP, Xu H, Bain SD, Allen KG, Seifert MF. Dietary lipids modulate bone prostaglandin E2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. *J. Nutr.* 127: 1084-1091 (1997)
16. Ministry of Food and Drug Safety. Food Code. Available from: [http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu\\_02\\_01\\_01.jsp](http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_01.jsp). Accessed April. 17, 2014.
17. Magun R, Gagnon A, Yaraghi Z, Sorisky A. Expression and regulation of neuronal apoptosis inhibitory protein during adipocyte differentiation. *Diabetes* 47: 1948-1952 (1998)
18. Yeh WC, Bierer BE, McKnight SL. Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 11086-11090 (1995)
19. Kang ES, Ham SA, Hwang JS, Lee CK, Seo HG. Effects of *Garcinia cambogia* extract on the adipogenic differentiation and lipotoxicity. *Korean J. Food Sci. An.* 33: 411-416 (2013)
20. Lee SM, Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lim JG, Kim TW, Choe M. Comparison of antioxidant and glucosidase inhibition activities among water extracts and sugar immersion extracts of green pepper, purslane and shiitake. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 24: 101-108 (2014)
21. Baek J, Lee J, Kim K, Kim T, Kim D, Kim C, Tsutomu K, Ochir S, Lee K, Park CH, Lee YJ, Choe M. Inhibitory effects of *Capsicum annum* L. water extracts on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. *Nutr. Res. Pract.* 7: 96-102 (2013)
22. Feng Z, Hai-ning Y, Xiao-man C, Zun-chen W, Sheng-rong S, Das UN. Effect of yellow capsicum extract on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Nutrition.* 30: 319-325 (2014)
23. Acheampong A, Leveque N, Tchaplá A, Heron S. Simple complementary liquid chromatography and mass spectrometry approaches for the characterization of triacylglycerols in *Pinus koraiensis* seed oil. *J. Chromatogr. A.* 1218: 5087-5100 (2011)
24. Wolff RL, Bayard CC. Fatty acid composition of some pine seed oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 72: 1043-1046 (1995)
25. White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol. Cell Endocrinol.* 318: 10-14 (2010)
26. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* 19: 557-566 (2013)
27. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 53: 124-144 (2014)