



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

이학석사 학위 논문

비만을 유도한 쥐의 복부에서 캡사이신
외용제가 내장지방에 미치는 영향

The effect of capsaicin ointment on mesenteric fat
of fed a high-fat diet in mice

울 산 대 학 교 대 학 원
의 학 과
이 공 략

비만을 유도한 쥐의 복부에서 캡사이신
외용제가 내장지방에 미치는 영향

지도교수 박능화

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2011년 2월

울산대학교 대학원

의학과

이공학

이공학의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 한 인 섭 (인)

심사위원 김 영 일 (인)

심사위원 박 능 화 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2011년 2월

국문 요약

캡사이신은 고추의 매운맛을 내는 성분이다. 이전의 보고들은 캡사이신 섭취로 장간막 지방이 감소할 수 있다는 것을 보였다. 그래서 우리는 캡사이신 외용제 또한 복부의 피부를 통하여 장간막 지방을 감소할 수 있는지를 조사했다. 고지방 식이로 비만이 유도된 수컷 C57BL/6 쥐들은 8주동안 0.075% 농도의 캡사이신 외용제 적용을 받았고 캡사이신이 없는 외용제를 적용한 대조군과 비교했다. Adipocytokine 유전자의 전사와 관련된 단백질들을 reverse transcription -PCR 과 western blot으로 측정했다. Glucose, cholesterol 와 triglyceride의 혈장수준은 비색측정을 통해 확인했다. 장간막지방조직, 정소지방조직 그리고 간의 박절된 대표조직을 hematoxylin-eosin염색했다. 실험군의 장간막지방과 정소지방 중량뿐만 아니라 체중과 간 중량도 상당히 대조군에 비해 감소했고 지방은 장간막지방과 정소지방조직 그리고 간조직의 조직학적 형태에서도 감소했다. 이와 반대로 섭취량은 실험군이 상당히 증가한 것으로 보였다. TNF- α 와 IL-6의 mRNA발현이 감소했기 때문에 지방조직에서 유전자발현의 연구는 캡사이신이 지방조직에 대식세포의 침윤을 감소하게 할지 모른다고 제안했다. 대조군에 비해, 0.075% 캡사이신이 처리된 장간막지방조직에서 adipsin, adiponectin, visfatin, lipoprotein lipase(LPL), peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α), PPAR- β , PPAR- γ , uncoupling protein-2(UCP-2), Fatty acid-binding protein4(FABP4), Fatty acid transport protein 1(FATP1)과 Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1(ACSL1)의 mRNA발현이 증가했다. 또한, adiponectin, leptin과 HO-1의 단백질 발현도 증가했다. 흥미롭게도 실험군에서 glucose, cholesterol와 triglyceride의 혈장수준은 감소했다. 결론적으로, 이들 결과들은 캡사이신 영향으로 지방이 감소했다는 것을 증명하고 캡사이신 외용제가 복부비만 치료제로 적용할 수 있다는 것을 시사한다.

중심단어: 캡사이신 외용제, 장간막지방, adipocytokine, 지방산의 산화

차 례

국문요약	i
표 차례	iv
그림 차례	v
서론	1
연구대상 및 방법	4
1. 비만을 유도한 쥐에서 0.1%와 0.3% 캡사이신 외용제의 효과	
1.1. 실험동물	
1.2. 캡사이신 외용제 처리	
1.3. Tissue collection	
1.4. Total RNA isolation	
1.5. cDNA synthesis	
1.6. PCR (Polymerase Chain Reaction)	
2. 비만을 유도한 쥐에서 0.075% 캡사이신 외용제의 효과	
2.1. 실험동물	
2.2. 캡사이신 외용제 처리	
2.3. Food intake	
2.4. Blood and tissue collection	
2.5. Western blot analysis	

2.6. Plasma analysis	
2.7. Hematoxylin & Eosin stain	
3. 사람에서 0.075% 캡사이신 외용제의 효과	
3.1. 사람	
3.2. 캡사이신 외용제 처리	
3.3. 허리돌레 측정	
3.4. Body Mass Index(BMI) 측정	
3.5. 복부CT촬영	
4. Image와 Statistical analysis	
4.1. Image analysis	
4.2. Statistical analysis	
결과	11
1. 비만을 유도한 쥐에서 0.1%와 0.3% 캡사이신 외용제의 효과	
2. 비만을 유도한 쥐에서 0.075% 캡사이신 외용제의 효과	
3. 사람에서 0.075% 캡사이신 외용제의 효과	
고찰	25
결론	29
참고문헌	31
영문요약	37

표 차례

Table 1. Gene-specific primer sequences used in PCR amplification	19
Table 2. Profile of the human included in the study	22
Table 3. Alteration of waist circumference in capsaicin treated human	23

그림 차례

Figure 1. Body and fat tissue weights of the three experimental groups ...	12
Figure 2. Effects of 0.075% capsaicin on gain of body weight and fat tissue weights in mice	15
Figure 3. Effects of 0.075% capsaicin on food intake in mice	16
Figure 4. Morphological changes in mesenteric fat and liver of capsaicin treated obese mice	17
Figure 5. Plasma levels of glucose, cholesterol, triglyceride are altered in capsaicin treated obese mice	18
Figure 6. Gene expression levels of adipokine in mesenteric fat of capsaicin treated obese mice	20
Figure 7. Protein levels of adipokine in mesenteric fat of capsaicin treated obese mice	21
Figure 8. Before treatment with capsaicin and after treatment with capsaicin in abdominal CT image	24
Figure 9. Skin and liver metabolism of capsaicin	28
Figure 10. This diagram display effects of capsaicin in adipose tissue	30

서론

비만은 소모열량을 초과하는 과다한 열량이 지방으로 전환되어 체내에 과량 저장된 상태이다. 이러한 비만의 지방세포는 주로 중성지방이 침착되어 과도한 지방조직을 구성한다. 비만의 원인으로 소비에너지의 저하, 유전적 요인, 선천적 대사이상, 섭취 열량의 과다 등을 들 수 있다.¹⁾ 최근 생활수준이 향상됨에 따라 비만인구가 점점 늘어나면서 비만치료제에 대한 관심이 증가하는 추세이다. 특히 내장지방의 축적으로 인한 복부비만이 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 뇌졸중 및 type II 당뇨병과 같은 성인성 질환의 주된 요인인 대사증후군을 유도하는 위험인자로 작용한다고 알려져 있을 뿐만 아니라 다낭성 난소 증후군, 담낭 장애 그리고 특정 암의 발생에도 관여하고 있다. 이런 질환들을 예방 및 개선하기 위해서는 내장지방만을 선택적으로 감소시킬 수 있는 것이 필요하다. 비만과 관련된 많은 연구들이 진행되고 있지만 개발된 치료제들이 심각한 부작용을 초래하는 경우가 많아 천연물에서 추출한 치료제 개발에 관심이 높아지고 있다. 고추에서 추출한 천연 캡사이신의 섭취가 내장지방을 감소시킬 수 있다는 보고가 있었다. 이 밖에도 캡사이신은 1919년에 처음 발견되어 관절염에 대한 항염증활성 효과와 항산화 활성, 항암제로서의 기능, 식욕증진, 식염섭취 저하, 혈관확장 및 수축, 위장관 운동 항진, 타액과 위산 분비 촉진, 진통작용, 생리활성 펩타이드 방출 항진 등의 광범위한 영향이 보고되어 있으며 혈중 글루코스 또는 유리 지방산을 이용하는 에너지 대사 항진의 효과와 지방분해 효과 그리고 지질대사를 촉진한다고 알려져 있다.²⁻⁵⁾ 하지만 캡사이신은 고추의 매운 맛 성분으로 섭취시 일시적인 고통을 유발한다. 그래서 우리는 섭취보다는 상대적으로 덜 민감한 피부를 통해 이미 통증치료제로 시판되고 있는 외용제를 복부에 발라 주었을 때 섭취와 동일하게 간이나 장간막의 지방을 줄이는 약리효과가 나타나는지를 관찰하고 지방의 합성과 대사, 에너지 소비와 관련된 유전자와 단백질 수준을 확인함으로써 그 기전을 찾고자 한다.

지방세포 분화는 근육세포 분화나 신경세포 분화와는 달리 여러 호르몬과 다양한 전사인자들의 상호작용을 통하여 매우 복잡하게 이루어진다.⁶⁾ 지방세포 분화와 관련된 전사인자 중 peroxisome proliferatoractivated receptor- γ (PPAR- γ)는 핵수용체 계열 (nuclear hormone receptors)에 속하고 retinoid x receptor (RXR)

와 heterodimer을 이루어 표적유전자의 프로모터 또는 인핸서에 존재하는 peroxisome proliferator response element (PPRE)를 인지하여 표적유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 이런 표적유전자에는 지방-특이적인 표적유전자인 fatty acid binding protein 4 (FABP4), Leptin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipoprotein lipase (LPL), adiponin, Fatty acid transport protein (FATP)등이 있다.⁸⁻¹¹⁾ 이들 유전자는 대부분 지방의 합성과 대사에 관여하는 유전자들이다. 그러므로 PPAR- γ 가 지방의 분화, 합성, 대사에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다. 그리고 PPAR- γ 는 인슐린 민감도를 향진시키는 것으로 알려져 있고 제2형 당뇨병 치료제로 개발된 thiazolidinediones (TZD)는 합성된 PPAR- γ 의 ligand로 PPAR- γ 를 활성화시켜 당뇨병을 개선하는 효과가 있다고 한다.¹²⁾ PPAR- γ 가 이런 당대사에 까지 영향을 준다는 것은 지방조직에서 과다한 지방세포의 분화와 불균형적인 에너지의 과잉공급을 확인할 수 있는 분자라고 할 수 있다. 지방조직은 능동적으로 adipocytokine 등을 분비함으로써 체내 에너지 섭취와 소비의 균형을 조절한다고 보고되어 있다. 지방조직에서 분비되는 물질로는 음식의 섭취와 에너지 대사를 조절하는 것으로 알려진 펩타이드성 호르몬인 leptin, adiponectin, resistin, visfatin 또는 TNF- α , interleukin-6 (IL-6)와 같은 adipocytokine 등과 free fatty acids (FFA)와 같은 지질 등이 존재한다.¹³⁾ leptin은 *ob* 유전자의 산물로 시상하부 수용체들을 활성화하여 식욕을 억제하고 체중을 조절하는 호르몬으로 알려져 있다. 또한 β -adrenergic 수용체들의 자극을 통해 uncoupling protein-1 (UCP-1)과 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator-1 α (Pgc-1 α)의 발현을 유도하여 열을 발생시킴으로써 에너지가 소비되게 한다. *ob* 유전자가 knockout된 쥐에서 비만이 유도된다는 사실은 leptin이 비만에 결정적인 역할을 한다는 것을 알 수 있다.¹⁴⁾ Adiponectin은 지방세포에서 높게 발현되고 혈액에 매우 높은 농도로 존재한다. 이런 adiponectin은 Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)와 관련있는 것으로 잘 알려져 있다. AMPK는 세포내 에너지 센서 역할을 하는 물질로 세포내 에너지 고갈 상태에서 활성화 되고 활성화된 AMPK는 지방산의 베타-산화(beta oxidation)를 증가시켜 지방산의 합성을 억제하는 기능을 한다. AMPK에 의한 지방산 합성 억제의 주된 기전은 SREBP-1c라는 지방합성 조절 유전자의 활성을 억제함에서 비롯된다. 이런 AMPK의 활성을 adiponectin이 함

으로써 지방감소를 유발한다고 할 수 있다. 그래서 비만환자에서는 낮게 발현되는 것으로 알려져 있다. Heterozygous PPAR- γ 가 knockout된 쥐에서 adiponectin/Acrp30이 과발현되어 고지방식으로 인한 비만유도를 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 간에서는 포도당 신생합성에 필수적인 두가지 효소인 phosphoenolpyruvate carboxykinase와 glucose-6-phosphatase의 발현을 감소시킨다고 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 다른 adipokine들을 보면 TNF- α 와 IL-6는 염증반응을 촉진시키는 cytokine으로 비만일 때 지방세포에서 증가되어지고 angiotensinogen은 혈압조절에서 중요한 역할을 하며 비만의 지방세포에서는 mRNA의 발현이 증가된다.¹³⁾ 지방세포에서 Reactive oxygen species (ROS)의 증가는 염증반응을 유도하여 인슐린 저항성을 높이고 혈청에서의 adiponectin 수준을 감소시킨다.¹⁸⁾ 이런 ROS 증가에 의한 산화적 스트레스로부터 heme oxygenase-1 (HO-1)이 지방세포를 보호함으로써 항비만의 표적 유전자가 될 수 있다고 알려져 있고 HO-1은 TNF- α 와 IL-6의 분비도 감소시켜 염증반응도 억제한다.¹⁹⁻²⁰⁾ 캡사이신이 세포에서 어떤 신호전달을 하기 위해서는 수용체가 존재하여야 한다. 현재 알려진 수용체로는 transient receptor potential channel vanilloid type 1(TRPV1)이 있다. 캡사이신에 의한 TRPV1의 활성화가 adipogenesis와 비만을 막고 TRPV1의 발현이 비만인 사람과 쥐에서 감소되어 있다고 한다.²¹⁾ 하지만 TRPV1 유전자가 제거된 쥐에서는 비만이 억제된다는 보고도 있다.²²⁾ 이러한 연구 결과들은 캡사이신의 신호전달이 활성화되는 경로와 불활성화되는 경로 모두 동등한 약리적 효과를 나타낸다고 할 수 있다. 비만인 쥐에서 캡사이신의 섭취는 지방세포의 염증반응을 억제하고 adiponectin, PPAR- α / Pgc-1 α 발현을 증가시켜 비만을 억제한다고 한다.²³⁻²⁵⁾ 이와 같은 캡사이신과 관련된 항비만 효과들을 바탕으로 본 연구는 지방세포에서 분비되는 adipokine의 mRNA와 단백질 발현이 캡사이신 외용제를 복부에 발라준 쥐의 장간막지방조직, 정소지방조직, 간에서 어떠한 변화가 나타나는지를 확인하고 캡사이신 외용제가 국소 비만치료제로 사용이 가능한지를 검토하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 비만을 유도한 쥐에서 0.1%와 0.3% 캡사이신 외용제의 효과

1.1. 실험동물

6주령의 수컷 C57BL/6 (SAMTAKO BIO KOREA)쥐를 실험동물로 사용하였다. 사육실 환경으로 명암은 12시간 주기로 하였고 온도는 20-25℃를 유지 하였으며 사료와 물은 제한 공급하지 않았다. 1주간 일반식 (Reasearch Diets)을 먹인 후 지방이 45%Kcal 함량된 고지방식 (Reasearch Diets)을 5주간 먹여 비만을 유도 하였다.

1.2. 캡사이신 외용제 처리

비만을 유도한 후 복부를 면도하였고 1일 1회로 4주 동안 대조군은 바세린 (그린제약)을 약 200 μ l 발라주었고 0.1% 농도의 캡사이신 외용제 (CVS pharmacy) 실험군과 0.3% 농도의 캡사이신 외용제 실험군도 동일하게 발라주었다. 0.3% 농도의 캡사이신 외용제는 0.1% 농도의 캡사이신 외용제 (CVS pharmacy)와 50mg 캡사이신 파우더 (Sigma-Aldrich Corp.)를 200 μ l의 99.5% ethylalcohol (Fluka)에 녹인 후 혼합하여 제조하였다.

1.3. Tissue collection

쥐의 살 처분은 경추탈골법을 이용하여 정소 지방조직과 림프절을 제거한 장간막 지방조직 그리고 간을 적출하여 무게를 잰 뒤 액체질소에 냉각하였고 -80℃에서 보관하였다.

1.4. Total RNA isolation

적출한 각각의 조직은 집단별로 혼합하여 개체간의 오차를 없애주었다. 집단별로 혼합된 조직에 TRI reagent (Invitrogen) 1ml 분주하여 homogenizer로 분쇄했다. 상온에 10분간 방치 후 4℃ 14000rpm에서 15분간 원심분리 하였고 최상층의 지질과 맨 아래층의 침전물을 제외한 붉은색 TRI reagent가 포함된 층을 새 tube에 옮겨 담았다. 그리고 200 μ l의 chloroform (Fluka)을 넣고 10분동안 ice에 방치하며 vortexing하여 TRI reagent의 phenol과 chloroform이 결합할 수 있도록 해주었다. 4℃ 14000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액만을 새 tube로 옮겼고 동량의 isopropanol (Fluka)을 넣고 10분동안 ice에 방치하며 vortexing한 후 -80℃에서 overnight하여 RNA를 침전 시켰다. 4℃ 14000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였고 침전된 RNA를 washing하기 위해 75% ethylalcohol을 넣고 4℃ 14000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거 하였다. 14000rpm에서 1분간 원심분리 하여 상층액을 완전히 제거 후 airdry를 시켰다. DEPC (Diethylpyrocarbonate)-treated water 20 μ l를 넣고 pipeting하여 RNA를 녹였고 항온 block 온도 60℃에서 10분간 놓아 두었다. RNA를 정량하기 위해 Nano-Drop@Spectrophotometer ND-1000을 사용하여 260nm에서 흡광도를 측정 하였다.

1.5. cDNA synthesis

2 μ g의 total RNA에 DEPC-treated water로 10 μ l를 맞춘 후 1 μ l의 oligo(dT) (Bioneer)를 넣고 70℃에서 5분간 반응 후 ice에 냉각한 다음 5X M-MLV reaction buffer (Promega), M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), 10mM dNTP (Promega), Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega) 와 DEPC water로 25 μ l를 맞춰주었다. 그리고 항온 block 온도 37℃에서 60분간 놓아두었다.

1.6. PCR (Polymerase Chain Reaction)

cDNA을 주형으로 한 PCR은 표적 유전자의 mRNA 발현 수준을 확인 할 수 있다. 표적 유전자의 10 pmol primer forward와 reverse (Bioneer), Go Taq DNA polymerase (Promega), 5X Green Go Taq buffer, 2.5mM dNTP (Promega), TDW로 10 μ l를 맞춰주었다. MyCycler™ Thermal Cycler (BIO-RAD)로 조건을 initial denaturation 94℃에서 2분, denaturation 94℃에서 30초, 각각의 primer에 따라 annealing 온도에서 30초, extension 72℃에서 30초, 각각의 cycle 수를 정하고 final extension은 72℃에서 7분 동안 실시하였다. 지방조직에서 염증반응을 촉진하는 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 mRNA 발현 수준(Fig 5A)을 확인하기 위해 primer(Table 1)로 Reverse Transcription-PCR을 하였고 정소지방과 장간막지방에서 분비하는 adipokine들의 mRNA 발현정도도 보기 위해 primer(Table 1)로 Reverse Transcription-PCR을 하였다.

2. 비만을 유도한 쥐에서 0.075% 캡사이신 외용제의 효과

2.1. 실험동물

7주령의 수컷 C57BL/6 (SAMTAKO BIO KOREA)쥐를 실험동물로 사용하였다. 사육실 환경으로 명암은 12시간 주기로 하였고 온도는 20-25℃를 유지 하였으며 사료와 물은 제한 공급하지 않았다. 1주간 일반식 (Research Diets)을 먹인 후 지방이 60%Kcal 함량된 고지방식 (Research Diets)을 52일간 먹여 비만을 유도 하였다.

2.2. 캡사이신 외용제 처리

고지방식으로 52일 동안 비만을 유도한 후 대조군에는 0.075% 캡사이신이 포함되어 있지 않은 base 외용제(다림바이오텍)를 복부에 1일 1회 발라주었고 실험군은 0.075% 캡사이신 외용제(다림바이오텍)를 대조군과 동일하게 발라주었다. 그리고 두 집단 모두 계속적으로 고지방식을 유지하며 48일간 처리하였다.

2.3. Food intake

지방이 60%Kcal 함량된 고지방식은 5.24 kcal/g이다. 캡사이신 외용제의 처리 후 2일에서 3일 간격으로 대조군과 실험군에 제공한 먹이량과 남은 먹이량을 확인하였다. 섭취한 먹이량은 제공한 먹이량에서 남은 먹이량을 빼줌으로써 계산하였다. 그리고 섭취한 먹이량에 5.24 kcal/g을 곱하여 줌으로써 섭취한 열량을 계산하였다.

2.4. Blood and tissue collection

쥐의 살 처분은 경추탈골법을 이용하여 정소 지방조직과 림프절을 제거한 장간막 지방조직, 그리고 간을 적출하여 무게를 잰 뒤 액체질소에 냉각하였고 -80℃에서 보관하였다. 그리고 일부는 10% 중성포르말린에 고정 한 후 파라핀절편을 만들었다. 혈액 채취전 4시간의 공복 후 1 ml/cc syringe를 이용하여 심장에서 채취하였다. 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리했고 -80℃에서 보관 하였다.

2.5. Western blot analysis

적출한 각각의 조직에 HNTG lysis buffer (50mM HEPES , 150mM Na Cl₂, 10% glycerol, 1% triton-X-100) 200 μ l를 분주하여 homogenizer로 분쇄했다. 그리고 genomic DNA를 Sonicator로 파괴시켜 주었다. 다음 4℃ 14000rpm에서 30분간 원심분리 하였고 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic Acid Assay (Pierce)로 정량을 하였고 30 μ g을 10% SDS-PAGE에 내린 후 NC (nitrocellulose) membrane으로 transfer시켜 주었다. Tween20이 첨가된 TBS (Tris-Buffered Saline)에 5% non-fat dry milk를 녹여 1시간 동안 상온에서 blocking 해주었다. Primary antibodies (abcam: adiponectin 1:1000, leptin 1:4000, HO-1 1:1000)을 반응시키기 위해 4℃에서 overnight 했다. 다음 Peroxidase-conjugated anti-rabbit 또는 anti-mouse IgG antibodies로 상온에서 1시간 반응시켰고 ECL detection system (Pierce)으로 band를 확인하였다.

2.6. Plasma analysis

Glucose 측정은 glucose oxidase법 (asanpharm Corp.)을 이용하였다. 혈액에서 분리한 plasma내의 glucose를 glucose oxidase에 가수분해시키면 Glucuronic acid와 과산화수소가 된다. 이 과산화수소는 peroxidase의 작용에 의해 phenol과 4-aminoantipyrine을 산화적으로 축합시켜 Quinone적색 생성시킨다. 이 적색 색소를 파장 505nm에서 비색 측정하였고 표준액의 검량선에 대응시켜 glucose량을 구하였다.

Triglyceride 측정도 효소법 (asanpharm Corp.)을 이용하였다. Triglyceride를 lipoprotein lipase로 가수분해 시키면 glycerol과 Fatty acid로 분해된다. 이 glycerol을 glycerokinase로 인산화 시키면 glycerol-3-phosphate가 된다. glycerol-3-phosphate를 glycerol-3-phosphate oxidase로 가수분해 시키면 과산화수소가 생성되고 glucose와 같이 비색 측정하여 triglyceride량을 구하였다.

Total cholesterol 역시 효소법 (asanpharm Corp.)을 이용하였다. Total cholesterol를 cholesterol ester hydrolase로 가수분해 시키면 fatty acid와 free cholesterol로 분해된다. 이 free cholesterol를 cholesterol oxidase로 산화시키면 과산화수소가 생성되고 glucose와 같이 비색 측정하여 total cholesterol량을 구하였다.

2.7. Hematoxylin & Eosin stain

장간막 지방과 간 조직에서 박절한 파라핀절편은 xylene에서 파라핀제거과정을 거친 후 고농도 alcohol에서 저농도 alcohol로 함수 시켰고 hematoxylin으로 세포의 핵을 염색 시켰다. 그리고 eosin으로 세포질을 염색시킨 후 저농도 alcohol에서 고농도 alcohol로 탈수 시켰다. Xylene에서 alcohol을 제거한 후 cover glass를 덮어 mounting 하였다.

3. 사람에서 0.075% 캡사이신 외용제의 효과

3.1. 사람

복부의 지방 감소를 원하는 사람들 중 6명(여성: 23세 1명, 27세 1명, 49세 1명., 남성: 24세 1명, 35세 1명, 50세 1명)의 동의하에 실험을 하였다.

3.2. 캡사이신 외용제 처리

0.075% 농도의 캡사이신 외용제 (다림바이오텍)를 1일 1회 복부에 충분히 도포 되도록 발라주었다.

3.3. 허리둘레 측정

줄자를 이용하여 3일에 한번 씩 아침식전에 배꼽을 기준으로 허리둘레를 측정 하였고 8주간 기록하게 하였다.

3.4. Body Mass Index(BMI) 측정

실험대상자에 대한 특성을 파악하기 위해 성별, 체중, 나이, 키를 기록하였고 BMI를 측정하였다. $BMI = \text{체중(kg)} / \text{키(m)}^2$

3.5. 복부CT촬영

실험자 중 50세 남성의 캡사이신 처리 전과 후 복부CT촬영을 하였다. 그리고 캡사이신 처리기간은 두 달간 수행하였다.

4. Image와 Statistical analysis

4.1. Image analysis

표적 유전자의 DNA와 단백질을 밴드로 확인 후 정량적인 비교를 위해 Image J program (<http://rsb.info.nih.gov>)을 이용하여 수치화하였다.

4.2. Statistical analysis

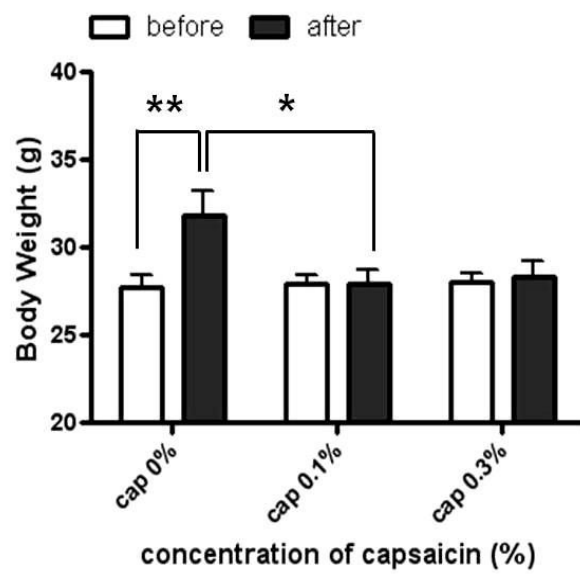
세 집단간 캡사이신 처리전과 후의 체중변화는 two-way ANOVA를 사용하였고 두 집단간 체중변화는 two-tailed t test를 사용하였다. 그리고 혈중 glucose, total cholesterol와 triglyceride 분석은 two-way ANOVA로 통계처리를 하였다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 두 집단간에 유의한 차이가 있음을 나타낸다. 이 통계분석은 Graph Pad Prism version 5.0의 소프트웨어로 실행하였다.

결 과

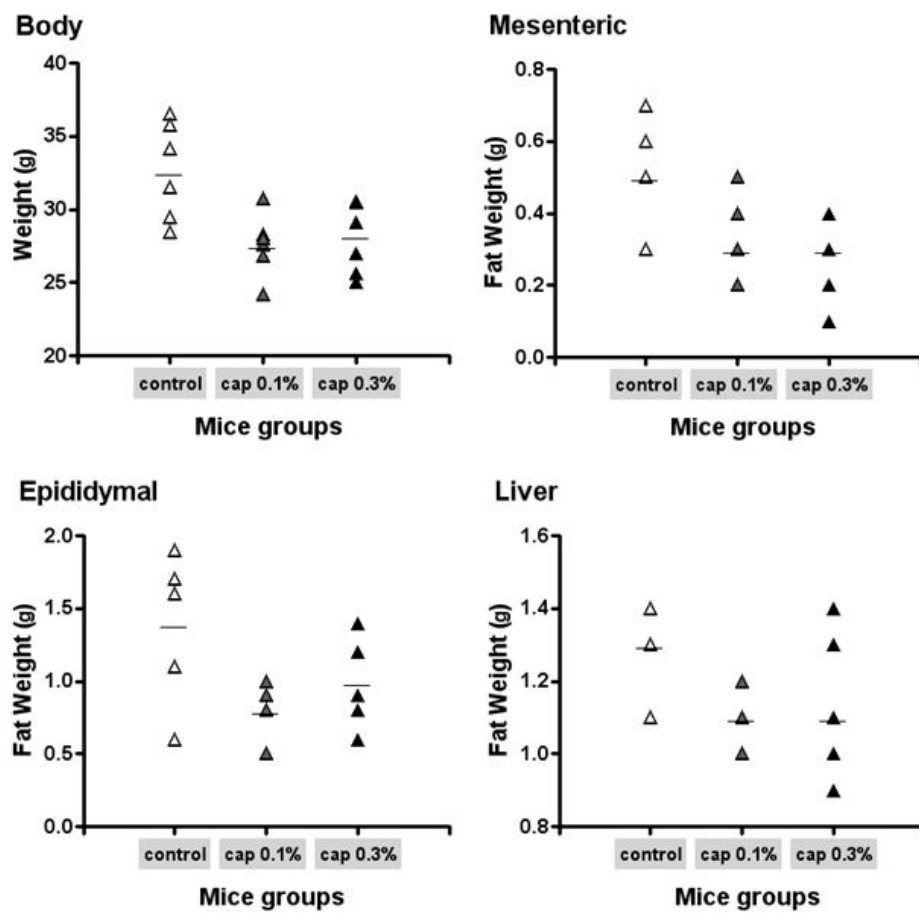
1. 비만을 유도한 쥐에서 0.1%와 0.3% 캡사이신 외용제의 효과

처음 실험을 시작할 때의 체중평균이 대조군은 $27.67 \pm 2.02(g)$ 이었고 실험군은 각각 $27.87 \pm 1.47(g)$, $27.97 \pm 1.42(g)$ 으로 거의 동일하게 맞춰 주었지만 실험 후 대조군(n=7)은 $31.79 \pm 3.79(g)$ 으로 4.12(g)증가하였고 실험군은 각각 0.1%농도의 캡사이신 외용제를 발라준 집단(n=7)에서 $27.93 \pm 2.12(g)$ 으로 0.06(g)증가, 0.3% 농도의 캡사이신 외용제를 발라준 집단(n=7)에서 $28.33 \pm 2.43(g)$ 으로 0.36(g)증가하였다(Fig 1A). 그리고 정소지방, 장간막지방, 간의 중량(Fig 1B)과 크기(Fig 1C) 또한 캡사이신 외용제를 처리한 실험군에서 모두 낮게 나타났다. 캡사이신 농도에 따른 차이는 크게 나타나지 않았지만 0.1%농도의 캡사이신에서 조금 더 효과가 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 외형적인 결과에서 캡사이신이 피부를 통해 복부지방을 감소시킬 수 있다는 약리효과를 확인하게 되었다. TNF- α 는 대조군에 비해 0.1%농도의 캡사이신 실험군에서 발현의 감소를 보였지만 0.3%농도의 캡사이신 실험군에서는 증가를 보였다. 그리고 IL-6는 대조군에 비해 0.1%농도의 캡사이신 실험군에서 약간의 감소를 보였지만 큰 차이는 나타나지 않았고 0.3%농도의 캡사이신 실험군에서 현저한 증가를 보였다.

(A)



(B)



(C)

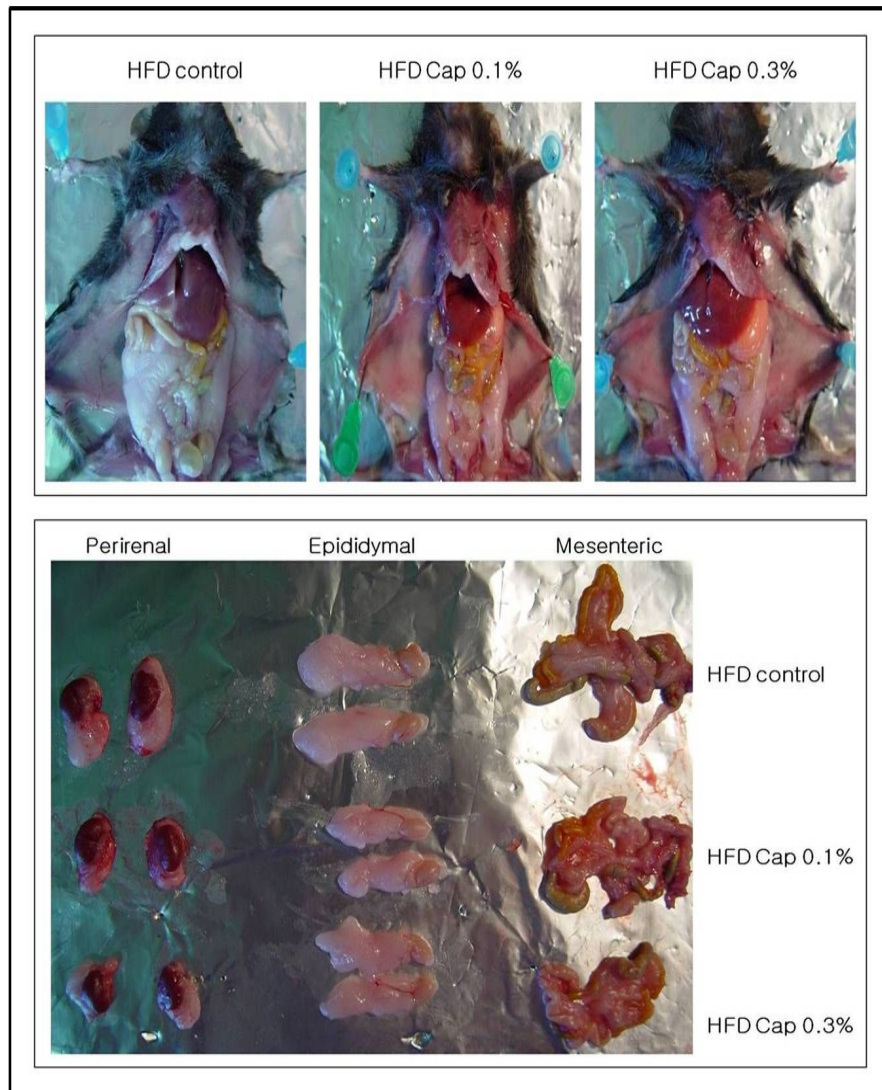


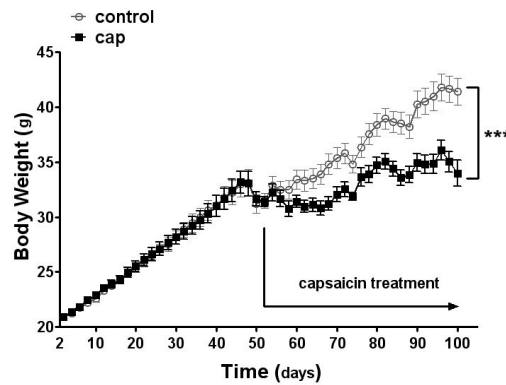
Figure 1. Body and fat tissue weights of the three experimental groups. (A) Body weight was measured before treatment with capsaicin (control 27.67 ± 2.02 , cap 0.1% 27.87 ± 1.47 and cap 0.3% 27.97 ± 1.42 g) and after treatment with capsaicin (control 31.79 ± 3.79 , cap 0.1% 27.93 ± 2.12 and cap 0.3% 28.33 ± 2.43 g). Values are means \pm SEM of 7 mice. **, $P < 0.01$ by two-way ANOVA. (B) Body, Mesenteric, epididymal fat and liver weight were reduced by capsaicin treatment. (C) Representative images illustrating the differences in size among HFD-control, HFD-0.1% capsaicin treated and HFD-0.3% capsaicin treated. (HFD: High-Fat Diet)

2. 비만을 유도한 쥐에서 0.075% 캅사이신 외용제의 효과

비만을 유도한 후 대조군(n=8)과 실험군(n=7)의 체중평균을 각각 $34.8 \pm 1.55(g)$, $34.8 \pm 1.49(g)$ 으로 맞춰 주었고 52일 이후부터 실험 종료시점인 100일 까지 성장곡선의 차이가 나타나기 시작 하였다(Fig 2A). 대조군과 실험군의 최종 체중평균이 각각 $42.4 \pm 1.24(g)$, $33.9 \pm 1.79(g)$ 으로 약8.5(g)의 상당한 차이를 보였다(Fig 2B). 그리고 정소지방과 장간막지방, 간의 중량 또한 대조군에 비해 실험군에서 더 낮게 나타났다(Fig 2B). 7일 간격으로 누적된 먹이의 총섭취량을 보면 3주차부터 대조군과 실험군의 차이가 나타나고 8주차에는 대조군 $183.93 \pm 3.45(g)$, 실험군 $204.56 \pm 1.30(g)$ 으로 대조군보다 실험군이 약20.6(g) 더 많이 먹은 것으로 나타났다(Fig 3A). 일일평균섭취열량은 대조군 $23.31 \pm 0.44(kcal)$, 실험군 $25.84 \pm 0.15(kcal)$ 로 약2.5(kcal)의 차이를 보여 대조군에 비해 실험군이 섭취한 열량이 더 높은 것으로 확인되었다(Fig 3B). Hematoxylin-eosin염색 결과는 정소지방과 장간막지방조직에서 대조군과 실험군의 지방구 크기 차이를 관찰할 수 있었다. 대조군에 비해 실험군의 지방구 크기가 더 작았고 간조직에서 또한 지방구의 수가 대조군 보다 실험군에서 현저히 적게 나타났다(Fig 4).

혈액에서 분리한 혈장으로 혈장 내의 glucose, cholesterol, triglyceride 수준을 확인한 결과 대조군에 비해 실험군에서 모두 낮은 수준을 보였다(Fig 5). 장간막 지방조직에서 adiponectin, adipsin, LPL, PPAR- α , PPAR- β , PPAR- γ , FABP4, FATP1, visfatin, UCP-2, ACSL1의 mRNA 발현정도는 대조군에 비해 실험군이 현저하게 높게 발현되었다(Fig 6B). 하지만 GLUT4는 실험군에서 더 낮게 발현되었다(Fig 6B). 단백질 발현은 HO-1, adiponectin과 leptin 모두 대조군에 비해 실험군에서 더 높게 발현되었다(Fig 7).

(A)



(B)

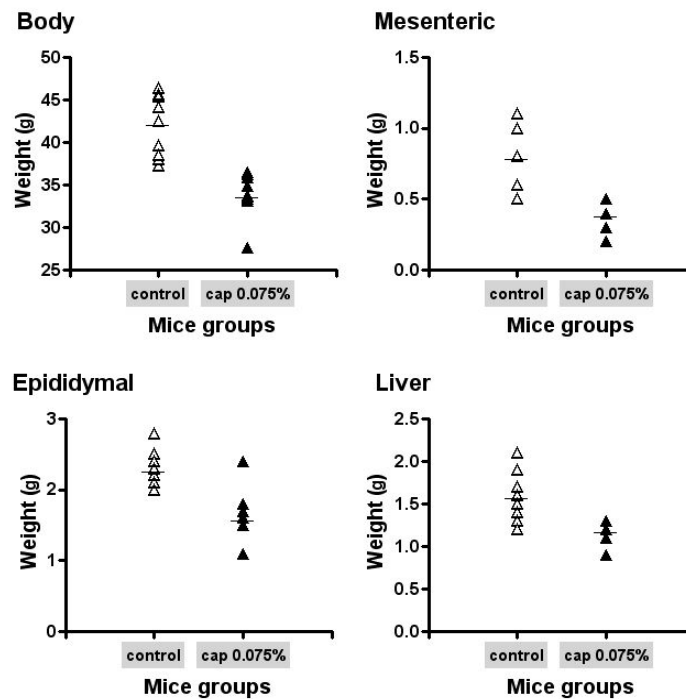
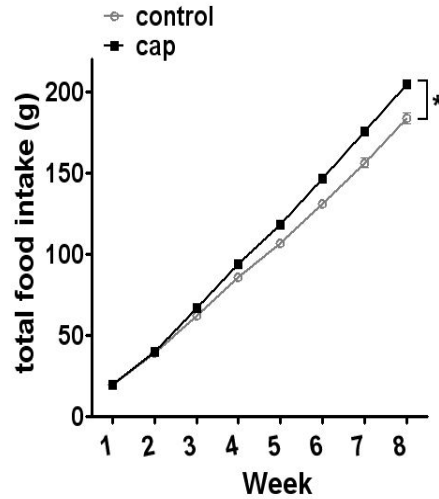


Figure 2. Effects of 0.075% capsaicin on gain of body weight and fat tissue weights in mice. (A) After 52days were begun that body weights of no treatment of capsaicin (n = 8) and 0.075% capsaicin treatment (n = 7) fed HFD were measured for 48 days. Body weight of mice treated with 0.075% capsaicin was significantly reduced compared with control. Values are means \pm SEM of 7 or 8 mice. * * *, $P < 0.001$ by two-tailed t test. (B) As compared to control, mesenteric, epididymal fat weight as well as body and liver weight were significantly reduced in 0.075% capsaicin treatment.

(A)



(B)

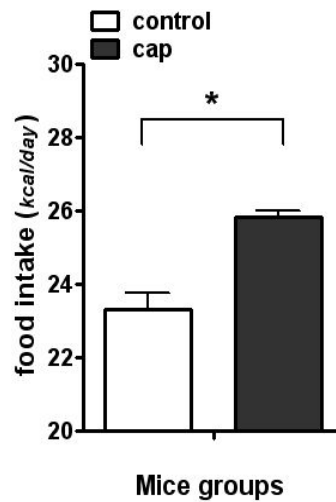


Figure 3. Effects of 0.075% capsaicin on food intake in mice.

(A) After 3 weeks were showed that food intake of mice treated with 0.075% capsaicin was increased compared with control and 8 weeks were significantly increased. (B) Also daily average caloric intake of mice treated with 0.075% capsaicin was increased compared with control. Values are means \pm SEM of 7 or 8 mice. *, $P < 0.05$ by two-tailed t test

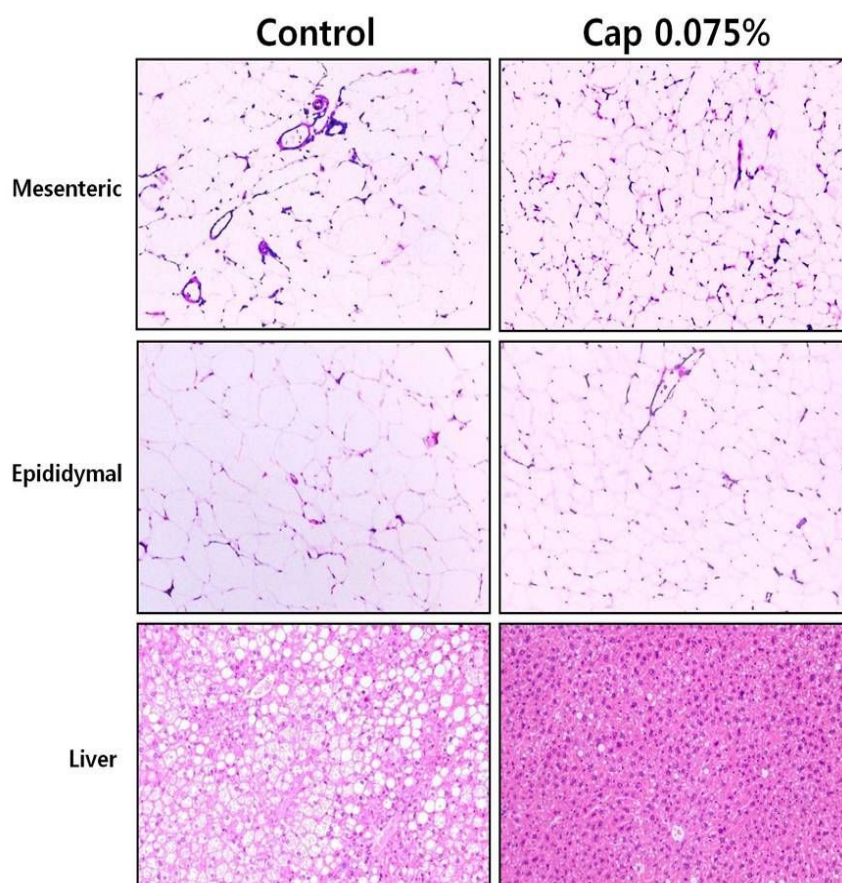


Figure 4. Morphological changes in mesenteric, epididymal fat and liver of capsaicin treated obese mice. Representative histological sections of mesenteric, epididymal fat tissue stained with hematoxylin-eosin, and liver tissue.

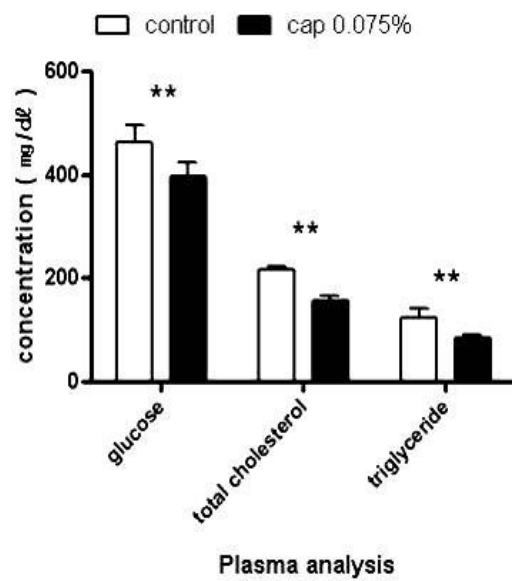
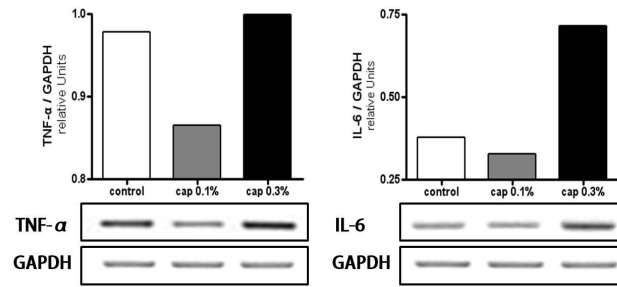


Figure 5. Plasma levels of glucose, cholesterol, triglyceride are altered in capsaicin treated obese mice. Glucose (control 462.31 ± 105.96 , CAP $397.74 \pm 74.09\text{mg/dl}$) and triglyceride (control 123.24 ± 60.74 , CAP $84.83 \pm 18.89\text{mg/dl}$) and total cholesterol (control 216.67 ± 20.47 , CAP $157.33 \pm 22.88\text{mg/dl}$) were reduced in CAP compared to control. (CAP: 0.075% capsaicin treatment) Values are means \pm SEM of 8 mice. * *, $P < 0.01$ by two-way ANOVA

Table 1. Gene-specific primer sequences used in PCR amplification

Gene	Primer sequence (5' → 3')	Product length (bp)
ACSL1	F: CTTCCAACCAACACCCTCAT R: CATGGTTCTGACATCGTCGT	207
adiponectin	F: GGAAGCTTGTGCAGGTTGGAT R: GCTTCTCCAGGCTCTCCTTT	221
adipsin	F: TGCACAGCTCCGTGTACTTC R: CACCTGCACAGAGTCGTCAT	236
FABP4	F: TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA R: TCGACTTTCCATCCCCTTC	283
FATP1	F: GGAAGAGCCTCCTCAAGTT R: GCAGGCAGTCATAGAGCACA	280
GAPDH	F: CTCATGACCACAGTCCATGC R: CACATTGGGGGTAGGAACAC	201
GLUT4	F: CACTACGCTCTGGGCTCTCT R: GAGGAACCGTCCAAGAATGA	202
IL-6	F: AGTTGCCTTCTTGGGACTGA R: TTCTGCAAGTGCATCATCGT	223
LPL	F: CCCTAAGGACCCCTGAAGAC R: GGCCCGCTACAACCAGTCTA	227
PPAR- α	F: ATGCCAGTACTGCCGTTTTC R: GGCCTTGACCTTGTTTCATGT	220
PPAR- β	F: CTGGAGCTCGATGACAGTGA R: CCGTCTTCTTTAGCCACTGC	250
PPAR- γ	F: CTCCTGTTGACCCAGAGCAT R: CAACCATTTGGGTCAGCTCTT	249
TNF- α	F: GAACTGGCAGAAGAGGCACT R: AGGGTCTGGGCCATAGAACT	203
UCP-2	F: AACAGTTCTACACCAAGGGC R: AGCATGGTAAGGGCACAGTG	472
visfatin	F: CCACCGACTCGTACAAGGTT R: ACTTCTTTGGCCTCCTGGAT	217

(A)



(B)

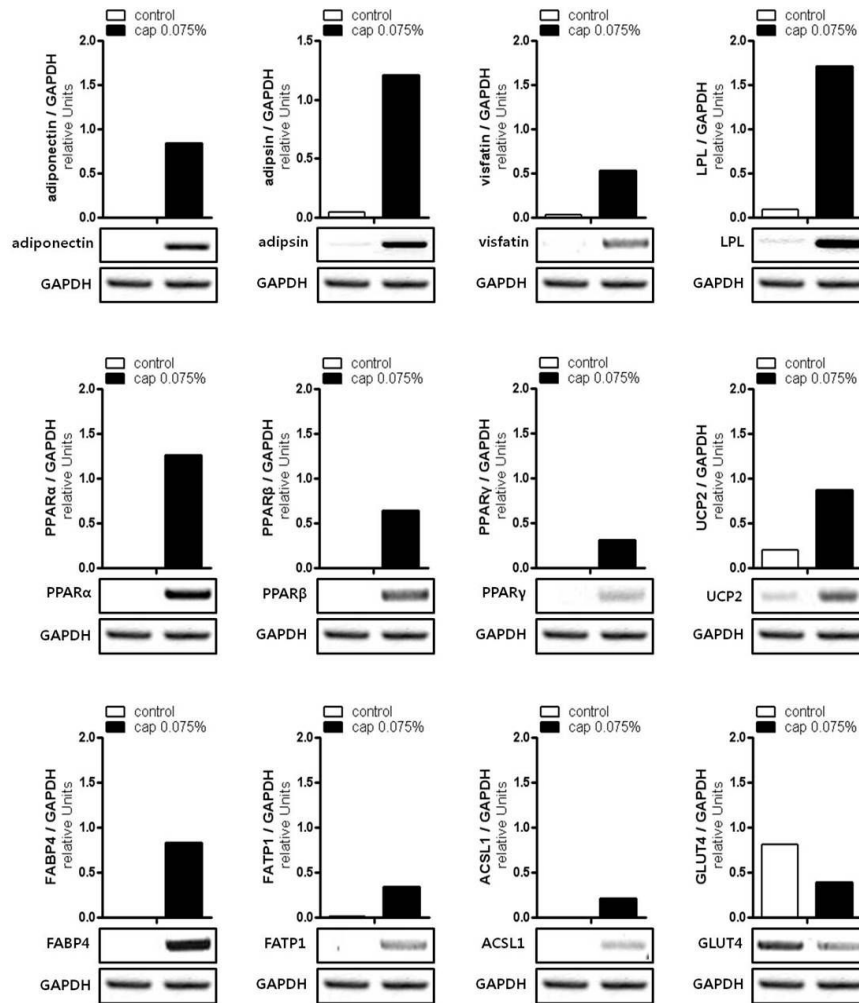


Figure 6. Gene expression levels of adipokine in mesenteric fat tissue of capsaicin treated obese mice. (A) mRNA expression levels of TNF-α and IL-6 were measured in three experimental groups. (B) mRNA expression levels of adipocyte related gene in mesenteric fat tissue was determined.

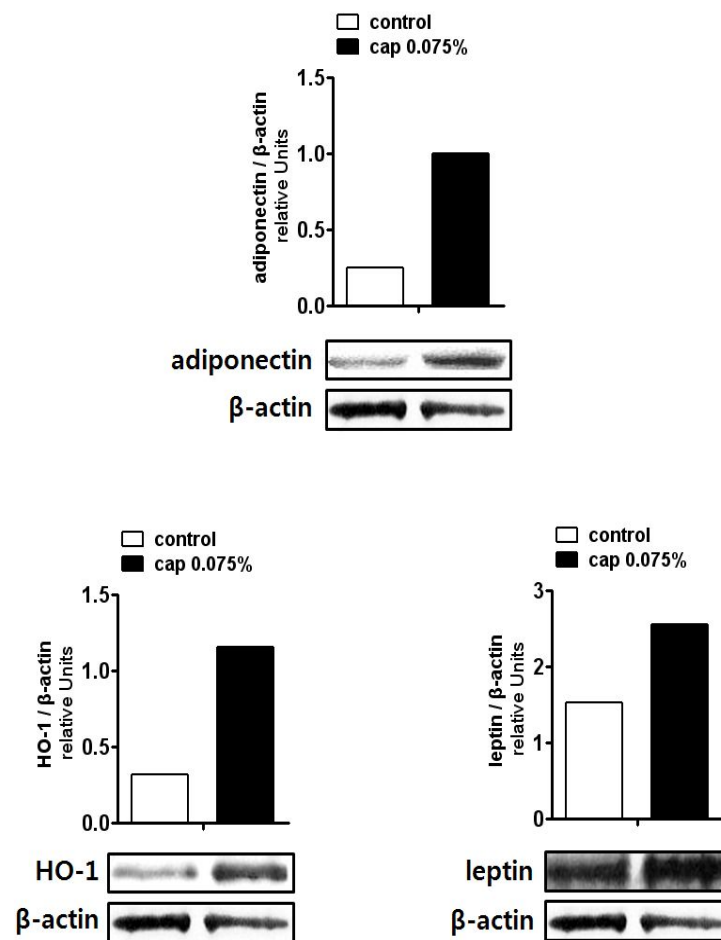


Figure 7. Protein levels of adiponectin, leptin in mesenteric fat of capsaicin treated obese mice. Protein expression levels of adiponectin, leptin and HO-1 were increased in cap 0.075% compared to control.

3. 사람에서 0.075% 캡사이신 외용제의 효과

실험대상자의 BMI측정 결과 남성은 모두 대한비만학회가 정의하는 비만에 해당하였고 허리둘레는 여성 한명을 제외한 모두 복부비만이였다(Table 2). 캡사이신 처리 후 사람마다 정도의 차이는 있었지만 모두 실험전 보다 허리둘레가 줄어들었다(Table 3). 그리고 M3(Table 2)남성의 캡사이신 처리 전과 후 복부CT 촬영 결과 내장지방의 감소를 확인하였고 피하지방은 거의 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig 8). 그리고 이 남성은 실험 후 허리둘레가 3.5cm 줄었다. 실험하는 동안 평상시와 같이 생활했고 체중감량을 위한 식이요법이나 운동을 한 실험자는 없었다.

Table 2. Profile of the human included in the study

	women			men		
	W1	W2	W3	M1	M2	M3
Age (years)	23	27	49	24	35	50
BMI (kg/m ²)	23.9	23.3	24.8	32.5	27.1	25.6

BMI (Body Mass Index) = body weight / height²

Korean Society for the Study of Obesity(KSSO) define as obesity, if BMI is above 25 in korean.

Table 3. Alteration of waist circumference in capsaicin treated human

week	women			men		
	W1	W2	W3	M1	M2	M3
1	100	82	97	108	99.5	93
2	97	81	95.5	107	98	92.5
3	97	80	92	106.3	98.7	91
4	101	79	91.5	105.2	97.5	90.3
5	99.8	78	93	104.5	97	89.5
6	101	80	93	104.3	97	90
7	100	79	93	103.7	96.3	90
8	99.2	79	92	103.4	97.3	89.5
alteration	-0.8cm	-3cm	-6cm	-4.6cm	-2.2cm	-3.5cm

Korean Society for the Study of Obesity(KSSO) define as abdominal obesity, if waist Circumference are above 90cm for men and 85cm for women in korean.

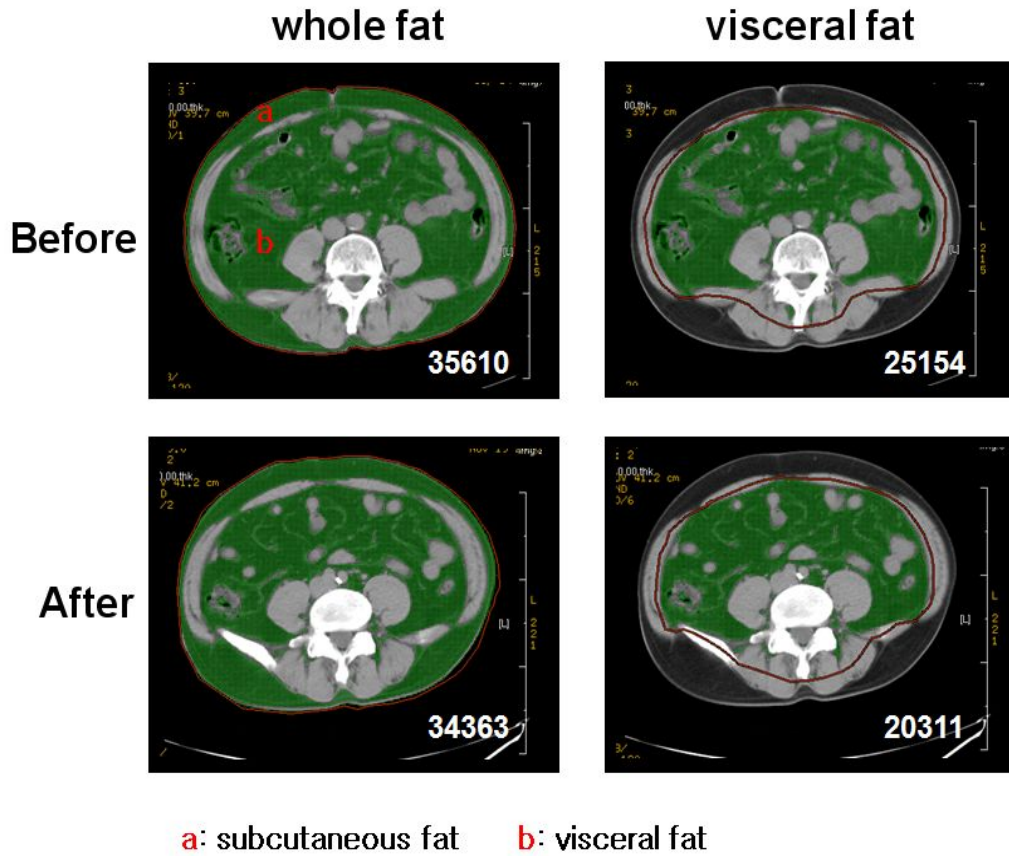


Figure 8. Before treatment with capsaicin and after treatment with capsaicin in abdominal CT image. This human was defined as abdominal obesity in profile(Table 2-M3). Abdominal CT images of whole and visceral fat were showed that fat area was significantly reduced after treatment with capsaicin compared to before treatment with capsaicin. But whole fat was displayed that subcutaneous fat area was made no difference before and after treatment with capsaicin.

고 찰

최근 비만이 대중적인 문제로 관심이 증가하고 있는 추세이다. 과거에는 음식이 귀하고 기본적인 의식주의 중요성이 높았지만 생활 수준이 향상되면서 패스트푸드 섭취 및 음주문화로 인하여 비만이 대중화 되고 있다. 특히 피하에 지방이 축적되는 비만 보다 내장에 지방이 축적되는 복부비만이 성인병과 관계가 깊고 더 많은 건강 위험요소를 가지고 있다고 알려져 있다. 내장주위는 음식물로부터 흡수된 영양분이 흐르는 혈관에 둘러싸여 있어 식이로 인한 섭취에너지를 쉽게 받아들일 수 있다. 그래서 지방이 쉽게 축적되고 식이에 의한 영향도 크게 작용한다. 이런 비만을 치료하기 위한 식욕억제제와 지방의 소화흡수억제제의 경우 어지러움, 복부팽만감, 혈압상승, 기름변이 등의 부작용이 보고되고 있어¹⁾ 체내에 부작용이 적고 안전성이 높은 천연물을 이용한 연구들이 진행되고 있다.

캡사이신은 고추의 매운 맛을 내는 천연물 성분으로 섭취시 비만, 인슐린 저항성, 지방간을 감소시킨다는 보고가 있다.¹⁶⁾ 본 연구는 이러한 사회적 관심과 연구들을 바탕으로 캡사이신의 섭취가 아닌 외용제로써의 약리효과를 실험하게 되었다. 비만을 유도한 쥐에서 0.1%와 0.3% 캡사이신 외용제의 효과 연구는 근소한 차이지만 0.1% 캡사이신 외용제 처리에서 지방의 감소가 더 많았다. 그리고 염증반응을 촉진하는 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 mRNA 발현수준은 0.1% 캡사이신 외용제를 처리한 집단보다 0.3% 캡사이신 외용제를 처리한 집단이 더 높게 나타남을 확인 할 수 있었다. 이는 캡사이신 농도가 0.3%에서는 오히려 염증반응을 촉진 할지도 모른다고 할 수 있다. 이런 결과들로 0.1%의 캡사이신 농도가 가장 적합하다고 판단되었고 통증치료제로 국내에서 시판되고 있는 0.075%농도의 캡사이신 외용제도 복부 지방감소의 효과가 나타나는지를 실험하게 되었다. 외형적인 결과들에서 캡사이신 섭취로 인한 지방감소의 효과와 유사한 결과들을 얻었고 지방세포에서 분비하는 adipokine들의 mRNA 발현정도를 확인한 실험에서는 내장지방의 adiponectin, adipsin, LPL, PPAR- α , PPAR- β , PPAR- γ 가 모두 발현이 증가되어 있는 것을 확인 하였다(Fig 6B). 고지방식이에 의한 비만 쥐의 지방조직에 adiponectin의 감소되어 있다는 보고가 있는데¹⁷⁾ 대조군의 내장지방에서 확인 할 수 있었고 캡사이신을 처리한 실험군에서는 증가한 것으로 나타났

다. 이 결과는 고지방식이를 통해 비만을 유도 하였음에도 불구하고 캅사이신에 의해 지방세포에서 adiponectin을 증가 시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서 adiponectin은 fatty acid의 산화를 증가시킨다고 알려져 있기 때문에 지방의 감소에 결정적인 역할을 할 것이라고 판단된다. 이런 adiponectin의 역할은 AMPK 활성화에 의해 나타나는데 이에 요구되는 것이 FATP1과 ACSL1이라고 한다³²⁾. 실험군에서 FATP1과 ACSL1의 mRNA발현 증가(Fig 6B)는 adiponectin에 의한 AMPK가 활성화되고 있다는 것을 간접적으로 보여주는 것이다. Adipsin 역시 비만 쥐에서 감소되는 것으로 알려져 있지만²⁷⁾ 캅사이신 효과로 증가된 것을 확인할 수 있었다. LPL은 triglyceride를 가수분해하여 glycerol과 fatty acid로 분해한다. LPL을 과발현시킨 동물실험에서 고지방식이에 의한 비만유도와 인슐린 저항성을 억제한다는 연구보고³¹⁾는 실험군에서 나타난 LPL의 mRNA 발현증가와 일맥상통한다고 할 수 있다. 이런 LPL의 증가는 중성지방의 축적을 억제한다고 할 수 있다. 우리는 PPAR- α ligand (GI259578A)가 백색지방세포의 크기를 감소시킨다는 보고²⁹⁾에 부합하는 결과를 실험군의 조직학적인 형태변화(Fig 4)와 PPAR- α 의 mRNA 발현정도(Fig 6B)를 확인한 결과에서 얻었다. 따라서 PPAR- α 의 증가가 내장지방과 정소지방세포의 크기 감소에 영향을 주었다고 생각된다. PPAR- α 의 활성화는 fatty acid의 산화를 증가시킨다고 알려져 있고 adaptive thermogenesis를 유발하여 에너지를 소비시킨다.²⁸⁾ 실험군의 조직학적인 형태변화(Fig 4)를 보면 흥미롭게도 미토콘드리아 수적인 증가를 확인할 수 있었다. 이는 PPAR- γ 의 활성화와 관련된 연구³³⁾에서 보고된바 있어 PPAR- γ 에 의한 영향이라고 예상된다. 지방세포의 분화뿐만 아니라 대사를 조절하는 PPAR- γ 의 발현 증가는 adipogenesis가 활성화되고 있는 것을 반영하지만 외형적으로 지방이 오히려 감소되는 것으로 나타나 adipogenesis에 관여하는 다른 억제유전자가 작용하는 것이 아닌가 생각이 되고 지방의 대사조절과 연관된 adiponectin, adipsin, LPL 유전자의 전사인자로 작용하기 때문에 높게 발현되는 것이라고 생각된다. PPAR- γ 의 역할에 대해서는 adipogenesis에 관여하는 억제유전자들을 확인해야 명확하게 해석될것으로 판단된다. PPAR- β 는 PPAR- δ 와 함께 활성화되면 지방세포의 염증성 cytokine들을 억제한다.³⁰⁾ 따라서 캅사이신 처리한 실험군에서 TNF- α 와 IL-6의 발현수준(Fig 6B)이 낮게 나타난 것은 PPAR- β /PPAR- δ 의 영향이 작용한 것이라고 생각된다. 그리고 세포내의 산화적

스트레스를 제거하여 염증반응을 억제하는 HO-1의 증가(Fig 7) 역시 TNF- α 와 IL-6의 낮은 발현수준을 반영한다고 할 수 있다. 그리고 캡사이신 수용체인 TRPV-1의 활성화에 대한 연구에서 이런 항염증³⁵⁾과 항비만²¹⁾의 효과를 보여주는 여러 보고들이 있다. TRPV-1은 이온채널로 알려져 있고 캡사이신에 의해 활성화 되면 일시적으로 세포내의 칼슘이온을 증가시켜 전위의존적 칼슘채널을 막는다고 한다. 그 결과 신경전달물질의 분비를 억제함으로써 통증을 완화시킨다. 그리고 칼슘차단제인 nifedipine이 PPAR- γ 를 활성화시킨다는 보고³⁴⁾도 있어 세포내에서의 칼슘조절이 PPAR- γ 에 영향을 주는 것으로 생각된다. 우리의 결과에서 이런 이유로 캡사이신이 PPAR- γ 를 활성화시키고 지방세포 특이적인 유전자들의 전반적인 발현증가를 가져오는 것이라고 예상된다. 실험군의 혈중 glucose 감소는 캡사이신이 당대사에도 영향을 준다는 것을 반영한다. 그리고 혈중 total cholesterol과 triglyceride 감소는 캡사이신으로 인해 지방대사가 활발하게 이루어진다는 것을 간접적으로 나타낸다. 우리의 결과들 중 가장 흥미로운 사실은 먹이의 섭취량이다. 실험군이 대조군에 비해 체중과 지방조직은 감소하지만 먹이의 섭취량은 더 많다는 것이다(Fig 3). 이는 비만억제에 있어서 긍정적인 의미와 부정적인 의미를 동시에 나타낸다. 긍정적인 의미는 실험군의 먹이섭취량을 대조군 만큼으로 제한 했을 때 체중과 지방조직의 감소효과는 더 크게 나타날 것이라는 것과 부정적인 의미로는 캡사이신이 식욕을 증진 시킨다는 것이다. 하지만 먹이로 섭취한 열량보다 에너지대사를 통해 소비되는 열량이 더 많다는 것을 확실하게 보여주는 결과이다. 그래서 우리는 우리의 실험에 동의하는 지원자를 모집하여 임상실험을 수행하였다. 그 결과 실험대상자 모두에서 허리둘레가 감소함을 확인하였다(Table 3). 복부CT사진은 캡사이신이 피하지방보다는 내장지방의 감소에 더 영향을 주는 것으로 보였다(Fig 8). 캡사이신으로 인해 동물실험과 임상실험 모두 복부비만 억제에 효과가 나타났고 정확한 기전을 밝히기 위해서는 에너지대사와 관련된 깊이있는 연구가 필요하다. 그리고 캡사이신 섭취에 의한 연구와 우리의 연구가 지방감소의 효과에 있어서 외형적인 유사성을 보이지만 섭취한 것은 간에서 대사가 이루어지기 때문에 피부를 통한 것 보다는 대사체가 더 다양하다³⁶⁾. 즉 이것은 작용기전이나 효과의 정도가 다를수도 있다는 것을 시사한다. 피부와 간의 대사체들 중 공통적으로 대사되는 vanillylamine(Fig 9)이 지방감소에 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

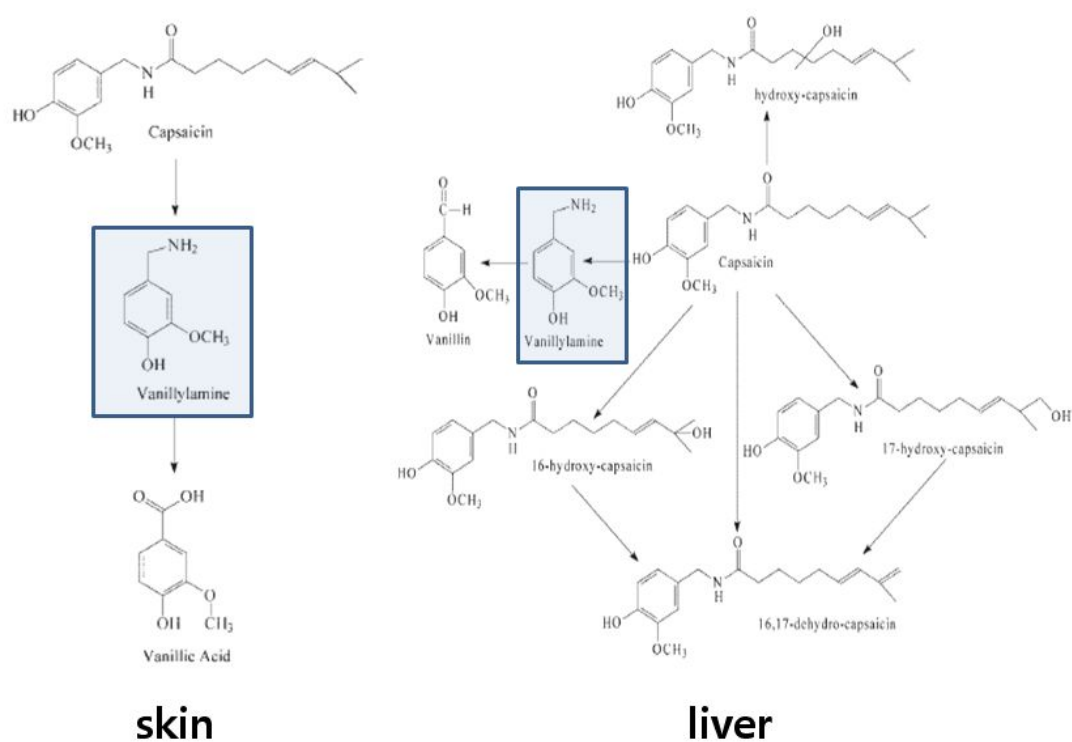


Figure 9. Skin and liver metabolism of capsaicin.
Proposed biotransformation pathway for capsaicin in skin and liver.

결 론

본 연구에서 비만을 유도한 쥐의 복부에 캡사이신 외용제를 발라 주었을 때 외형적인 관찰과 에너지 소비 및 지방의 대사에 관여하는 유전자의 발현에 대해 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 캡사이신 외용제에 포함되어 있는 캡사이신이 복부의 피부로 흡수되어 지방세포의 염증반응을 억제하고 에너지 소비와 지방의 분해, 지방산의 산화에 관여하는 유전자의 발현을 증진시킴으로써 내장 지방의 지질량을 감소시키고 지방구의 크기를 감소시키는 것으로 예상된다(Fig 10). 따라서 캡사이신 외용제는 성인성 질환의 주된 요인인 대사증후군을 유도하는 복부비만에서 내장지방의 축적을 억제하는 천연물 항비만 치료제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

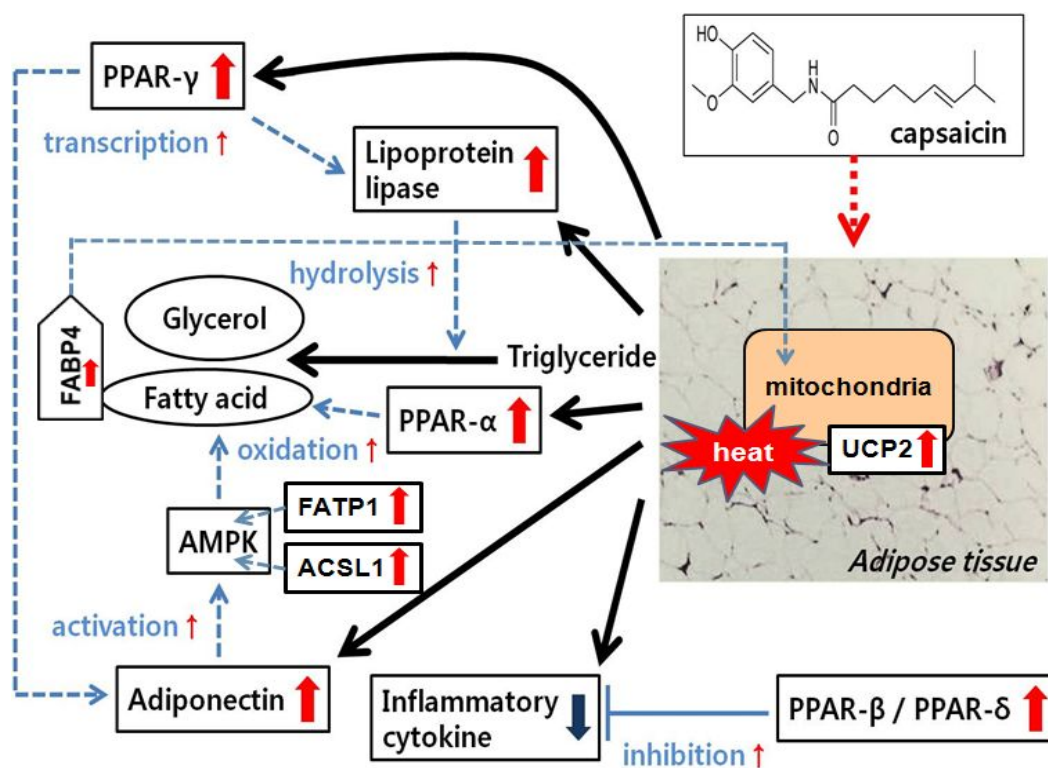


Figure 10. This diagram display effects of capsaicin in adipose tissue. Effects of capsaicin were showed in result. mRNA expression levels of LPL, adiponectin, PPAR- α , PPAR- β and PPAR- γ were increased. Triglyceride was hydrolyzed by LPL. Glycerol and fatty acid were by product of hydrolysis. Fatty acid was transferred in mitochondria. Oxidation of fatty acid were increased by adiponectin and PPAR- α . FATP1 and ACSL1 were required in AMP-activated protein kinase activation by adiponectin. Inflammatory cytokin was inhibited by PPAR- β /PPAR- δ . In thermogenic adipose tissue uncoupling protein 2(UCP2) potently catalyzes the dissipation of mitochondrial proton motive force as heat. Energy expenditure was increased. Thus, mesenteric fat was reduced in capsaicin treatment.

참고문헌

1. Kopelman, P., Obesity as a medical problem. *Nature*, 2000; 404: 635-43.
2. Kawada, T., Hagihara, K. I., Iwai, K. Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J. Nutr.* 1986; 116: 1272-8.
3. Kawada, T., Watanabe, T., Takaishi, T., Tanaka, T., Iwai, K. Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1986; 183: 250-6
4. Yoshioka, M., St-Pierre, S., Drapeau, V., Dionne, I., Doucet, E., Suzuki, M., Tremblay, A. Effects of red pepper on appetite and energy intake. *Br. J. Nutr.* 1999; 82: 115-23.
5. Matsumoto, T., Miyawaki, C., Ue, H., Yuasa, T., Miyatsuji, A., Moritani, T. Effects of capsaicin-containing yellow curry sauce on sympathetic nervous system activity and diet-induced thermogenesis in lean and obese young women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2000; 46: 309-15.
6. Cornelius, P., MacDougald, OA., Lane, MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 1994; 14: 99-129.
7. Brun, RP., Spiegelman, BM. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *J Endocrinol* 1997; 155: 217-18.

8. Biscetti, F., Straface, G., Pitocco, D., Zaccardi, F., Ghirlanda, G., Flex, A. Peroxisome proliferator-activated receptors and angiogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 ;19: 751-9.
9. Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, TP., Rastinejad, F. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 2008; 456: 350-6.
10. Powell, E., Kuhn, P., Xu, W. Nuclear Receptor Cofactors in PPARgamma-Mediated Adipogenesis and Adipocyte Energy Metabolism. *PPAR Res* 2007; 2007: 53843
11. Yu, S., Reddy, JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1771: 936-51.
12. Forman, BM., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, RP., Spiegelman, BM., Evans, RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995; 83: 803-12.
13. B. Antuna-Puente., B. Fevec., S. Fellahi., J.-P. Bastard. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & Metabolism.* 2008; 34: 2-11.
14. Becerril S., Rodríguez A., Catalán V., Sáinz N., Ramírez B., Collantes M., Peñuelas I., et al. Deletion of inducible nitric-oxide synthase in leptin deficient mice improves brown adipose tissue function. *PLoS One.* 2010; 5: e10962.
15. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005; 26: 439-51.

16. Katja Rabe., Michael Lehrke., Klaus G Parhofer., Uli C Broedl. Adipokines and Insulin Resistance. *Mol Med.* 2008; 14: 741-51.
17. Whitehead JP., Richards AA., Hickman IJ., Macdonald GA., Prins JB. Adiponectin a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 2006; 8: 264-80.
18. Angelique Nicolai., Ming Li., Dong Hyun Kim., Stephen J. Peterson., Luca Vanella., Vincenzo Positano., Amalia Gastaldelli. Heme Oxygenase-1 Induction Remodels Adipose Tissue and Improves Insulin Sensitivity in Obesity-Induced Diabetic Rats. *Hypertension.* 2009; 53: 508-15.
19. Abraham NG., Tsenovoy PL., McClung J., Drummond GS. Heme oxygenase: a target gene for anti-diabetic and obesity. *Curr Pharm Des.* 2008; 14: 412-21.
20. Dong Hyun Kim., Angela P. Burgess., Ming Li., Peter L. Tsenovoy., Francesco Addabbo., John A. McClung., Nitin Puri. et al. Heme Oxygenase-Mediated Increases in Adiponectin Decrease Fat Content and Inflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor-and Interleukin-6 in Zucker Rats and Reduce Adipogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 325: 833-40.
21. Zhang LL, Yan Liu D, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, Yan ZC, et al. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel Prevents Adipogenesis and Obesity. *Circ Res.* 2007; 100: 1063-70.
22. Arianne L. Motter, Gerard P. Ahern. TRPV1-null mice are protected from diet-induced obesity. *FEBS Lett.* 2008. 25; 582: 2257-62.

23. Kang JH, Goto T, Han IS, Kawada T, Kim YM, Yu R. Dietary capsaicin reduces obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet. *Obesity*. 2010; 18: 780-7.
24. Kang JH, Kim CS, Han IS, Kawada T, Yu R. Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. *FEBS Lett*. 2007. 18; 581: 4389-96.
25. Khadija Alawi, Julie Keeble. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. *Pharmacol Ther*. 2010; 125: 181-95.
26. Suri A, Szallasi A. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29: 29-36.
27. Rosen BS, Cook KS, Yaglom J, Groves DL, Volanakis JE, Damm D, White T, et al. Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity. *Science*. 1989; 244: 1483-7.
28. Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguère V, Kralli A. Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 1418-23.
29. Okamoto Y, Higashiyama H, Inoue H, Kanematsu M, Kinoshita M, Asano S. Quantitative image analysis in adipose tissue using an automated image analysis system: differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor- α and γ agonist on white and brown adipose tissue morphology in AKR obese and db/db diabetic mice. *Pathol Int*. 2007; 57: 369-77.

30. Coll T, Barroso E, Alvarez-Guardia D, Serrano L, Salvadó L, Merlos M, Palomer X, et al. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta on the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *PPAR Res.* 2010;2010. pii: 368467.

31. Tomonari Koike, Jingyan Liang, Xiaofei Wang, Tomonaga Ichikawa, Masashi Shiomi, George Liu et al. Overexpression of Lipoprotein Lipase in Transgenic Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits Improves Hyperlipidemia and Obesity. *JBC.* Vol. 279, No. 9, Issue of February 27, pp. 7521–7529, 2004

32. Qingqing Liu, Marie-Soleil Gauthier, Lei Sun, Neil Ruderman, Harvey Lodish. Activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by adiponectin and insulin in mouse adipocytes: requirement of acyl-CoA synthetases FATP1 and Acs11 and association with an elevation in AMP/ATP ratio. *FASEB.* Vol. 24 November 2010

33. Young Jun Koh¹, Byung-Hyun Park, Ji-Hyun Park, Jinah Han¹, In-Kyu Lee, Jin Woo Park, Gou Young Koh¹. Activation of PPAR γ induces profound multilocularization of adipocytes in adult mouse white adipose tissues. *EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE*, Vol. 41, No. 12, 880–895, December 2009

34. Hashimoto R, Umemoto S, Guo F, Umeji K, Itoh S, Kishi H, Kobayashi S, Matsuzaki M. Nifedipine Activates PPAR γ and Exerts Antioxidative Action Through Cu/ZnSOD Independent of Blood-pressure Lowering in SHRSP. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* Vol. 17 (2010), No. 8, 785–795

35. Khadija Alawi, Julie Keeble. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 125 (2010) 181 - 195

36. Sanjay Chanda, Mohammad Bashir, Sunita Babbar, Aruna Koganti, and Keith Bley. In Vitro Hepatic and Skin Metabolism of Capsaicin. *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION* Vol. 36 (2008), No. 4, 670-675.

Abstract

Capsaicin is a spicy component of hot red pepper. Previous reports have been showed that dietary capsaicin could reduce mesenteric fat. So we investigated whether capsaicin ointment also can reduce mesenteric fat through the abdominal skin. Male C57BL/6 obese mice fed a high-fat diet received a application of 0.075% capsaicin ointment for 8 weeks and were compared with free applicable controls. Transcripts of adipocytokine genes and corresponding proteins were measured by reverse transcription-PCR and western blot, plasma levels of glucose, cholesterol and triglyceride were determined by enzymatic colorimetry. Representative histological sections of mesenteric, epididymal fat tissue stained with hematoxylin-eosin, and liver tissue. Body and liver weight as well as mesenteric, epididymal fat weight of experimental groups was significantly reduced compared with control and fat was reduced in histological morphology of mesenteric, epididymal fat tissue and liver tissue. On the contrary to this, food intake was showed that experimental groups were significantly increased. The study of gene expression in adipose tissue suggested that capsaicin may reduce the infiltration of macrophages in adipose tissue, because mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 were decreased. As compared to control, mRNA expression levels of adiponectin, adipsin, visfatin, lipoprotein lipase(LPL), peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α), PPAR- β , PPAR- γ , uncoupling protein-2(UCP-2), Fatty acid-binding protein4(FABP4), Fatty acid transport protein 1(FATP1) and Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1(ACSL1) were increased in mesenteric adipose tissue of 0.075% capsaicin treatment. Also, protein expression levels of adiponectin, leptin and HO-1 were increased. Interestingly, plasma levels of glucose, cholesterol and triglyceride were decreased in experimental groups. In conclusion, these results demonstrate that capsaicin efficiently reduces fat and suggest that capsaicin ointment can apply as therapy of abdominal obesity.