

탱자 (*Poncirus trifoliata*)의 lipoprotein lipase 억제메커니즘*

이성미^{1**} · 강운환^{2**} · 김경곤¹ · 김태우² · 최면^{1,2†}

강원대학교 생명건강공학과,¹ 강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터²

A study of the lipoprotein lipase inhibitory mechanism of *Poncirus trifoliata* water extracts*

Lee, Sung Mee^{1**} · Kang, Yun Hwan^{2**} · Kim, Kyoung Kon¹ · Kim, Tae Woo² · Choe, Myeon^{1,2†}

¹Department of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

²Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

ABSTRACT

Purpose: *Poncirus trifoliata* has been reported to have anti-inflammatory, antioxidant, and immune activities. However, its anti-obesity activity and the mechanism by which the water extract of dried, immature fruit of *Poncirus trifoliata* (PF-W) acts are not clear. This study suggests a potential mechanism associated with the anti-obesity activity of PF-W. **Methods:** We measured the effect of PF-W on lipoprotein lipase (LPL) regulation using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and an activity assay. The LPL regulation mechanism was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to measure the mRNA expression of biomarkers related to protein transport and by western blot for analysis of the protein expression of the transcription factor CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP β). **Results:** The total polyphenol and flavonoid content of PF-W was 52.15 ± 4.02 and 6.56 ± 0.47 mg/g, respectively. PF-W treatment decreased LPL content in media to $58 \pm 5\%$ of that in control adipocyte media, and increased LPL content to $117 \pm 3.5\%$ of that in control adipocytes, but did not affect the mRNA expression of LPL. PF-W also increased the mRNA expression of sortilin-related receptor (SorLA), a receptor that induces endocytosis and intracellular trafficking of LPL, in a concentration- and time-dependent manner. Finally, cell fractionation revealed that PF-W treatment induced the expression of C/EBP β , a SorLA transcription factor, in the nuclei of 3T3-L1 adipocytes. **Conclusion:** The LPL secretion and activity assay showed PF-W to be an LPL secretion inhibitor, and these results suggest the potential mechanism of PF-W involving inhibition of LPL secretion through C/EBP β -mediated induction of SorLA expression.

KEY WORDS: *Poncirus trifoliata*, lipoprotein lipase, sortilin-related receptor, CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) β , anti-obesity

서 론

비만은 외부로부터 섭취된 에너지공급원을 지방과 에너지로 저장하는 생체 내의 조절과정에서 문제가 발생함으로써 야기된다.¹ 섭취된 잉여의 에너지는 지방의 형태로 저장되는데 이때 지방세포 내에 과도한 지방이 축적되면 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환을 포함한 만성질환을 유발하는 원인이 된다.^{2,3} 따라서 지방 등의 고에너지원의 흡수를

막거나 세포내 지방의 축적을 억제하도록 자극하는 방안에 대한 연구가 최근 많은 관심을 끌고 있다.

지금까지 미국 식품의약국 (FDA)에서 항비만제로 승인되어 주로 사용되고 있는 의약품은 sibutramine과 orlistat 2종이 있으며, sibutramine은 식욕억제와 포만감 증가를 통해 체중감소를 유도하며, orlistat는 췌장과 위장관의 lipase 활성을 억제하여 지방의 흡수를 제어함으로써 체중감소에 효과를 나타낸다.⁴ 그 중 orlistat는 위장장애, 과민증, 담

Received: November 4, 2014 / Revised: December 4, 2014 / Accepted: December 16, 2014

*This work was supported by grants of High Value-added Food Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (312001-03-01-HD040), Well-being Bioproducts Regional Innovation Center project (B0009702) and Kangwon National University Institute of Bioscience & Biotechnology (320130015).

**These authors contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-33-250-8645, e-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

즙분비장애, 지용성 비타민 흡수억제 등의 부작용이 보고되어 있으며⁵ 장기간 사용 시 약효가 감소하는 것으로 알려져 있다.⁶ 이 때문에 orlistat와 함께 사용하여 부작용을 감소시킬 수 있거나 단독으로 지질대사 개선 및 지질합성 억제제의 효능이 있는 소재 및 식품에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다.⁷⁻⁹

Lipoprotein lipase (LPL)는 간, 심장, 지방조직, 뇌 등 신체의 다양한 조직 및 세포에서 발현되는 lipase family에 속하는 효소이며 pancreatic lipase, hepatic lipase 및 endothelial lipase가 포함된다.¹⁰ 또한 세포막, 세포외부 및 혈관 내피세포로 분비되어 chylomicron이나 very low-density lipoprotein에 함유된 triglyceride를 fatty acid와 glycerol로 분해하여 fatty acid를 세포내로 흡수할 수 있게 하는 기능을 한다.^{10,11} 세포내로 유입된 fatty acid는 근육조직에서는 활발한 에너지대사 때문에 산화과정을 거쳐 소진되지만 지방조직에서는 유입된 fatty acid가 에너지대사를 통해 모두 소진되지 못하고 triglyceride로 전환되어 지방으로 저장된다.^{10,11} 지방조직 내 triglyceride 축적량이 증가하게 되면 산화스트레스, 비정상적 adipokine 분비, 염증반응 등의 유발로 인해 인슐린 저항성, 당내성 이상, 심근비대 등이 나타나게 되며 결국 Kopelman²과 Fernández-Sánchez 등¹²의 연구에서 언급한 바와 같이 비만, 당뇨, 고혈압, 심혈관 질환 등의 대사질환이 발생한다. 따라서 LPL의 억제를 통한 지방 흡수와 저장 저해는 대사질환의 예방 및 완화에 효과적일 뿐만 아니라 체중증가를 억제하는 효과도 기대할 수 있다.^{13,14}

탕자 (*Poncirus trifoliata*)는 한방에서 흉통, 복통 및 염증을 다스리는데 응용되고 있으며, 최근연구에서는 비만유도 쥐의 체중증가를 억제하고 혈중지질개선효과와 항산화효과를 나타낸다는 결과가 보고되었다.¹⁵ 또한 Shim 등¹⁶의 연구에서는 pancreatic lipase 활성에는 영향을 미치지 못하지만 장기간의 복용이 독성 없이 체중증가를 억제한다고 보고하였다.

본 연구에서는 항비만효능이 알려진 탱자의 혈중지질감소를 근거로 지방의 체내 흡수에 중요한 기능을 하는 LPL의 작용에 탱자가 영향을 미칠 것이라는 가설 하에 LPL 억제효능을 평가하고 그 기전을 규명하고자 하였으며, 이를 통해 특유의 신맛 때문에 식용으로 사용이 어려운 탱자의 항비만 기능성 식품소재로의 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

연구방법

물 추출 시료 제조

본 실험에 사용된 건조된 미숙탕자는 춘천시 소재 건재

상에서 국내산 재료로 구입하여 수세한 후 건조와 분쇄를 거치고 10배 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하여 추출하였다. 실온에서 방냉한 뒤 추출한 소재는 3,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 Whatman filter paper (Whatman International, Maidstone, UK)로 여과한 후, 감압농축기 (Eyela SB-1000, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조기 (FD 8508, Ilshin, Korea)를 이용하여 건조한 후 필요한 농도로 증류수에 희석하여 실험에 사용하였다. 추출분말은 미숙탕자 원재료 무게대비 10.6%의 추출률을 나타내었다.

3T3-L1 세포배양 및 소재 처리

3T3-L1 세포의 분화유도는 Oh 등¹⁷의 연구에서 사용된 방법을 응용하였다. 3T3-L1세포는 10% calf serum을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 배양, 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 위해 6 well plate에 5 × 10⁵ cell/well의 세포를 분주하여 세포가 완전히 밀집되게 배양하고, 2일을 더 배양한 후 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 0.5 µM dexamethasone, 10 µg/mL insulin) solution 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 3일 동안 배양함으로써 분화를 개시하였다. 그 다음 10 µg/mL insulin 및 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 교환하여 4일 동안 분화를 진행시켰다. 소재는 분화가 완료된 7일째부터 6, 12, 24시간동안 처리하였다.

3T3-L1 preadipocyte에 대한 세포독성

건조된 미숙탕자의 물 추출물 (PF-W)이 3T3-L1 preadipocyte에 미치는 세포독성은 Cell Counting Kit (CCK)-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 통해 확인하였다.¹⁸ 3T3-L1세포는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 각각 96 well에 1.5 × 10⁵ cell/well로 분주한 후 24시간 부착시킨다. FBS가 첨가되지 않은 배지에서 PF-W를 각각 0.01~1 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 37°C에서 배양 하였다. 24시간 후 배양중인 배지 (100 µL)에 CCK-8 reagent를 10 µL씩 가해주고 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 (control)의 흡광도 값을 기준 (100%)으로 세포독성을 비교 하였다.

총 polyphenol 및 flavonoid 함량 측정

총 polyphenol 및 flavonoid의 함량은 Lee 등¹⁸이 사용한

동일한 조건에서 수행하였다.

항산화 활성측정

소재의 항산화활성은 Lee 등¹⁸⁾이 사용한 동일한 조건과 방법으로 수행하였다.

Lipoprotein lipase (LPL)의 enzyme-linked immuno-specific assay (ELISA) 분석

3T3-L1 지방세포의 LPL 단백질 함량은 Feng 등¹⁹⁾의 연구를 참고하여 mouse LPL ELISA kit (Cusabio, Wuhan, China)를 이용하였으며 추출소재 0.25 mg/mL을 24시간 처리한 세포의 배양배지와 단백질 추출액에서 측정하였다. 배양배지는 3T3-L1 지방세포를 분화완료한 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 소재 (0.25 mg/mL)를 24시간 처리한 후 배지만 회수하여 4°C, 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 사용하였으며, 3T3-L1 지방세포 단백질 추출물은 소재를 24시간 처리한 후 cooling된 PBS로 3회 세척하고 세포를 회수한 후 4°C, 1,000×g에서 5분간 원심분리하고 PBS를 제거한 후 RIPA buffer (50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS (m/v), 0.5% deoxycholic acid (m/v), 1% Triton X-100 (v/v), 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 가하여 4°C, 30분간 반응시킨 후 2분 동안 vortexing하고 4°C, 12,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 새튜브로 옮겨 준비하였다. LPL ELISA assay 방법은 commercial kit에서 제공하는 ELISA protocol을 따랐다. 즉, mouse LPL antibody가 pre-coating처리된 96 well plate에 배지 sample 100 µL 또는 추출단백질 sample 50 µg/100 µL을 넣어 2시간동안 정치하였다. 2시간 후 sample을 제거한 후 100 µL의 biotinylated LPL IgG를 넣고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 washing buffer (200 µL)로 3회 세척하였다. 각 well에 100 µL의 HRP-avidin을 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 다시 washing buffer (200 µL)로 5회 세척하였다. 90 µL TMB를 넣고 30분 동안 암조건 상태에서 추가 반응시킨 후 well 당 50 µL의 stop solution을 첨가함으로써 반응을 종료시킨다. 반응 종료 후 microplate reader (EL808; BioTek, Winooski, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. LPL 단백질함량은 대조군과 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

Lipoprotein lipase (LPL)의 활성측정

Lipase 활성은 mouse LPL antibody가 pre-coating된 96 well plate와 lipase activity assay kit (Sigma-aldrich, St. Louis, USA)를 이용하여 측정하였다. 실험에 사용된 단백질 추출액은, 7일 동안 3T3-L1 지방세포 분화를 유도하고

DMEM배지에서 추가 2일간 배양한 세포를 PBS로 2회 세척 후 activity assay kit 제품에서 제공하는 ice-cold lipase assay buffer를 4 volume 가하여 4°C에서 homogenizing한 후 4°C, 13,000×g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 분리하여 준비하였다. 준비된 단백질 sample을 LPL antibody가 pre-coating된 96 well plate에 100 µL씩 분주한 후 3시간동안 정치하였다. 3시간 후 결합하지 않은 단백질 sample을 washing하여 제거함으로써 동일량의 LPL 단백질이 coating된 plate를 만들고, 이 plate에 소재 100 µL (0.25 mg/mL)를 30분간 상온에서 반응시킨 후 washing buffer (200 µL)로 3회 세척하였다. 세척 후 well 당 50 µL의 lipase assay buffer를 첨가하여 반응에 필요한 volume을 맞춘 후 lipase activity assay kit제조사에서 제공하는 방법에 따라 실험을 수행하였다. Lipase activity는 milliunit/mL 단위로 계산한 후 활성비교를 위해 대조군을 기준으로 백분율(%)로 계산하였다.

mRNA 발현확인 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

3T3-L1 지방세포에 6시간, 12시간 동안 0.05, 0.1, 0.25 mg/mL 농도의 소재를 처리한 후 배양배지를 제거하고 QIAzol lysis reagent (Qiagen, Maryland, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 total RNA를 분리하였다. Nuclease free water에 녹인 후 RNA 5 µL에 0.1% DEPC water를 995 µL를 첨가하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 total RNA양을 정량하였다. First strand cDNA를 합성하기 위하여 AmfiRiert Platinum cDNA synthesis Master Mix (GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하였으며 제공된 방법에 따라 추출한 RNA (2 µg)와 RNase free water로 9 µL를 맞추고 70°C에서 5분간 반응시킨 후 2×cDNA synthesis buffer 10 µL, cDNA synthesis Enzyme Mix 1 µL를 각 PCR tube에 더한 후 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)은 Go Tag Green Master (Promega, Madison, WI, USA) 10 µL, forward primer (10 pmole)와 reverse primer (10 pmole)를 각각 1 µL, nuclease free water 7 µL, 합성한 first-stand cDNA 1 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 실행하였으며 각각의 primer는 Table 1과 같으며, PCR조건은 Table 2와 같다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1% agarose gel에 100 V에서 20분간 전기영동 후 UV 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드는 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

Table 1. PCR primer sets and expected sizes of PCR products used in the experiment

Gene		Primer (5'-3')	Size (bp)
LPL	forward	ATC CAT GGA TGG ACG GTA AC	483
	reverse	CTG GAT CCC AAT ACT TCG AC	
v-SNARE	forward	AAT TCC ACC CCA AAG TCG AG	224
	reverse	ACC CAG CCT CTA GTC TCC GA	
Rab3A	forward	CTA CCG CAA CGA CAA GAG GA	221
	reverse	CAC ACT TGT TTC CCA CCA GC	
Sortilin	forward	ACA AAG ACG GCT GCA TTT TG	282
	reverse	GGC ATT TGT CTC CTG GGA TT	
SorLA	forward	CAG CAG TCC ACC AGC TCC TA	194
	reverse	ACT GCT CAT CCT TGC TGA CG	
C/EBP β	forward	CTG AGC GAC GAG TAC AAG AT	445
	reverse	TTG ATC CGG ATT GCA TCA AG	
GAPDH	forward	GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	203
	reverse	GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	

3T3-L1 지방세포 분획단백질 확보

3T3-L1 지방세포의 분획단백질은 소재처리가 완료된 세포를 cooling된 PBS로 3회 세척하고 trypsinize한 후 튜브로 세포를 옮기고 PBS로 추가 1회 세척한 후 원심분리 (5,000 rpm, 5 min)를 통해 세포를 모은 후 cell fractionation kit (Cell signaling technology, Tokyo, Japan)의 사용방법에 따라 세포 분획을 진행하였다. 즉, 세포가 담긴 tube에 250 μ L의 cytoplasm isolation buffer를 넣고 5초 동안 vortexing 한 후 ice에 5분 동안 정치하였다. 원심분리 (500 \times g, 5 min)를 통해 cytoplasmic fraction (상등액)을 분리하고 pellet은 membrane isolation buffer 250 μ L를 넣고 15초 동안 vortexing 한 후 ice에 다시 5분 동안 정치하였다. 원심분리

(8,000 \times g, 5 min)를 통해 membrane fraction (상등액)을 분리한 후 pellet 은 다시 nucleus isolation buffer 125 μ L를 넣고 sonication하여 nuclear fraction을 확보하였다.

Western blot analysis

동일한 양의 단백질과 β -mercapto-ethanol를 포함한 sample buffer를 3:1로 혼합한 후 100°C 에서 3분간 가열하였다. 준비된 단백질샘플은 SDS-PAGE 후 polyvinylidene fluoride membrane (0.45 μ m, PVDF transfer membrane, Thermo, Rockford, IL, USA)으로 단백질을 전이하였다. Membrane은 0.1% Tween 20과 5% skim milk를 함유한 tris-buffered saline (TBS)에 2시간 동안 blocking 하였다. 그 후 C/EBP β (500 : 1), ERK1/2 (1,000 : 1), Vimentin (1,000 : 1) 1차 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 4% skim milk buffer에서 3시간 동안 반응하고 TBS-T (TBS containing 0.1% tween-20)로 5분 단위로 3회 세척하였다. 그런 다음 membrane은 2차 anti-rabbit IgG conjugates horseradish peroxidase antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 가 첨가된 4% skim milk buffer (2,000 : 1)를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응한 후 다시 TBS-T를 이용하여 5분 단위로 3회 세척하였다. 발색은 enhanced chemiluminescence method를 이용하여 x-ray 필름에 감광시켰다. 그 밴드는 imageJ (National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (Statisti-

Table 2. PCR condition of each primer sets

Gene	Pre-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
LPL	95°C 5 min	95°C, 30 sec	56°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C 5 min
		30 cycle			
v-SNARE	95°C 5 min	95°C, 30 sec	55.4°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C 5 min
		30 cycle			
Rab3A	95°C 5 min	95°C, 30 sec	57.5°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C 5 min
		30 cycle			
Sortilin	95°C 5 min	95°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C 5 min
		30 cycle			
SorLA	95°C 5 min	95°C, 30 sec	59°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C 5 min
		30 cycle			
C/EBPβ	95°C 5 min	95°C, 30 sec	59°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C 5 min
		30 cycle			
GAPDH	95°C 5 min	95°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C 5 min
		30 cycle			

cal Package for Social Sciences) program을 이용하여 Mean \pm SD로 표시하였고, unpaired Student's t-test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 두 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

건조 미숙탕자 물 추출물 (PF-W)의 페놀화합물 함량, 항산화 활성 및 3T3-L1 preadipocyte에 대한 세포독성

페놀화합물은 항암, 항염증, 항산화, 항동맥경화 등 다양한 생리활성을 가지고 있는 것이 보고되어 있어²⁰ 그 함량이 추출물의 생리활성에 많은 영향을 미치는 것으로 판단하고 있다. 본 실험에서는 galic acid와 quercetin을 폴리페놀과 플라보노이드의 표준물질로 각각 사용하여 PF-W의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량을 측정된 결과 Table 3에 정리한 바와 같이 52.15 ± 4.02 mg/g, 6.56 ± 0.47 mg/g의 함량이 확인되었다. 이 결과는 Lee 등²¹이 보고한 폴리페놀함량 (58.5 mg/g) 및 플라보노이드 (10.8 mg/g)와 유사한 범위의 결과임을 확인할 수 있었고, 측정값의 차이는 추출방법에 의한 것으로 판단된다.

PF-W의 항산화활성을 확인하기 위해 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium (ABTS) 라디칼 소거능, 환원력, superoxide dismutase (SOD) 유사 활성을 측정하였다. 그 결과는 Table 4에 정리된 바와 같이 1.931 mg/mL, 1.536 mg/mL, 2.098 mg/mL, 11.53 mg/mL의 IC₅₀값을 구할 수 있었으며 이는 control로 사용된 ascorbic acid의 약 1/50-1/100에 해당하는 값으로 PF-W의 항산화 활성이 비교적 낮은 것을 확인할 수 있다.

PF-W의 실험농도를 결정하기 위해 3T3-L1 세포에 대한

세포독성을 CCK-8 assay kit를 이용하여 평가하였다. 평가 결과 세포의 생존율은 Fig. 1과 같다. 0.01~1 mg/mL의 처리농도에서 독성이 관찰되지 않았으며, 본 결과를 바탕으로 세포생존율이 감소경향을 보이기 전인 0.25 mg/mL 이하에서 항후의 활성 및 기전 연구를 진행하였다. 전통의약 소재로 사용되어온 PF-W는 동물실험에서 독성이 나타나지 않아 Shim 등¹⁶의 연구에서 장기투여 연구가 진행된 바 있어 본 실험결과를 뒷받침하고 있다.

건조 미숙탕자 물 추출물 (PF-W)이 lipoprotein lipase (LPL) 단백질함량에 미치는 영향

3T3-L1세포를 분화하여 adipocyte를 생성한 후 PF-W를 처리하였을 때 배양매지에 분비되는 LPL의 단백질함량을 ELISA방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 Fig. 2A에 정리된 바와 같이 preadipocyte 배양매지에서 $64.2 \pm 7.2\%$ 수준이던 LPL의 단백질함량이 adipocyte에서 100% 수준으로 증가하였으며 0.25 mg/mL PF-W를 24시간 처리하자 다시 $58 \pm 5\%$ 수준으로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 배지에 분비된 LPL의 단백질함량은 활성을 측정하기에는 미량이어서 3T3-L1 adipocyte 추출단백질을 이용하여 LPL 활성을 측정된 결과 Fig. 2B와 같이 adipocyte (100%)와 PF-W 처리군 ($95.1 \pm 5.8\%$)간에 유의한 수준의 변화는 관찰되지 않았다. 3T3-L1 세포내 LPL의 mRNA 발현에 PF-W가 미치는 영향을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 Fig. 2C와 같이 지방세포분화에 의해 증가된 LPL mRNA 양은 PF-W 0.05, 0.1, 0.25 mg/mL을 6시간 또는 12시간 처리하였을 때 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 또한 PF-W 0.25 mg/mL 처리에 의한 3T3-L1 세포내 LPL 단백질함량의 변화를 측정된 결과

Table 3. The contents of total polyphenol and flavonoid of *Poncirus trifoliata* water extract (PF-W)

Sample	Total polyphenol (mg/g, GAE ¹⁾)	Total flavonoid (mg/g, QE ²⁾)
PF-W	52.15 ± 4.02	6.56 ± 0.47

Values are presented as Mean \pm SD from three independent experiments.

1) GAE, gallic acid equivalents 2) QE, quercetin equivalents

Table 4. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of *Poncirus trifoliata* water extract (PF-W)

Anti-oxidant experiments	IC ₅₀ (mg/mL)	
	Ascorbic acid	PF-W
DPPH radical scavenging activity	0.027	1.931
ABTS radical scavenging activity	0.092	1.536
Reducing power	0.069	2.098
SOD-like activity	0.129	11.53

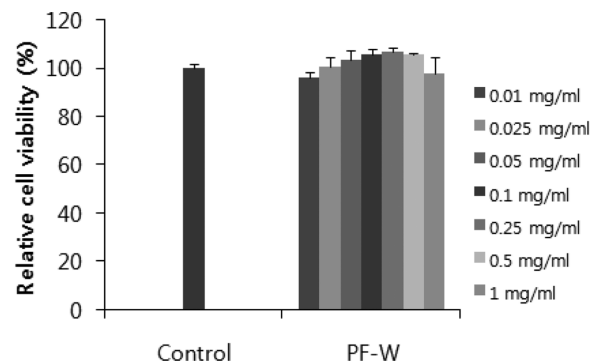


Fig. 1. Effect of a water extract of the dried, immature fruit of *Poncirus trifoliata* (PF-W) on the viability of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 cells were treated with PF-W (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, or 1 mg/mL) for 24 h. Cell viability was determined using the Cell Counting Kit (CCK)-8. Data are expressed as Mean \pm SD of triplicate experiments.

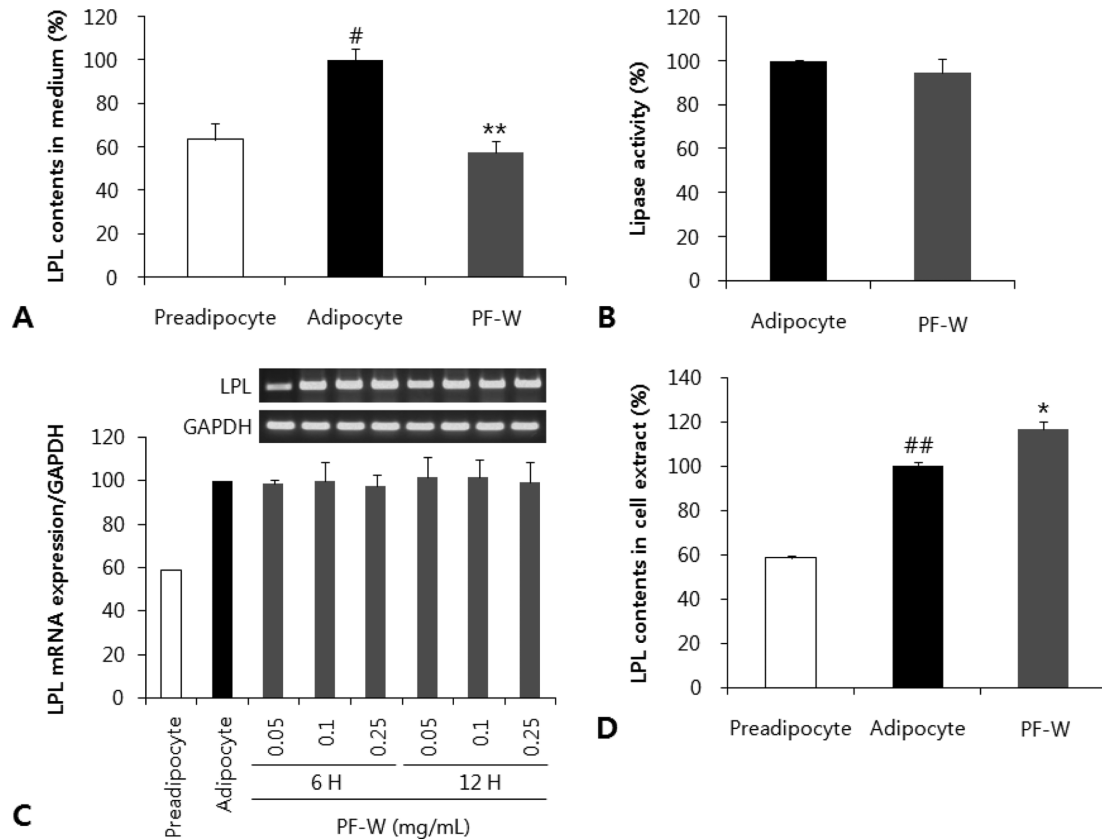


Fig. 2. Effect of a water extract of the dried, immature fruit of *Poncirus trifoliata* (PF-W) on the lipoprotein lipase (LPL) expression and activity in 3T3-L1 adipocytes. A: LPL content of 3T3-L1 cell culture medium. B: Comparison of LPL activities in cell extract with and without 0.25 mg/mL PF-W. C: LPL mRNA expression as a function of PF-W concentration and time of exposure. D: LPL content in 3T3-L1 cell extract. Data are expressed as Mean \pm SD of triplicate experiments. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ as compared to the preadipocytes. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared to control adipocytes.

preadipocyte ($59 \pm 1.3\%$)보다 adipocyte (100%)에서 유의하게 증가된 LPL 단백질함량이 PF-W 처리 ($117 \pm 3.5\%$)로 더욱 증가하는 것이 확인되었다.

건조 미숙탕자 물 추출물 (PF-W)이 단백질 운반 인자에 미치는 영향

세포의 분비작용에 관여하는 단백질인 v-SNARE의 mRNA 발현을 확인한 결과 Fig. 3A에 나타난 바와 같이 PF-W의 0.05, 0.1, 0.25 mg/mL 처리농도와 6시간 또는 12시간 처리시간에서 유의한 변화를 유도하지 못하는 것을 확인하였다. Rab3A는 Ca^{2+} 의존성 exocytosis를 조절하는 단백질로서 v-SNARE와 마찬가지로 PF-W의 처리가 영향을 미치지 못하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). Sortilin은 endocytic receptor로서 골지체, 세포막에 주로 존재하며 LPL과 결합 후 분해에 관여하는 것으로 알려져 있지만 앞선 실험과 같이 PF-W의 처리가 아무런 영향을 미치지 못하는 것이 관찰되었다 (Fig. 3C). SorLA (sortilin-related receptor)도 sortilin과 같은 family에 속하는 receptor로서

endocytic activity와 LPL의 세포내 분포를 변화시키는 인자로 알려져 있다.²² Fig. 3D에서 관찰한 바와 같이 SorLA mRNA는 PF-W 0.05, 0.1, 0.25 mg/mL을 6시간동안 처리한 경우 $80.6 \pm 4.7\%$, $102.2 \pm 0.3\%$, $118 \pm 1.4\%$ 의 발현을 나타내었으며, PF-W 0.05, 0.1, 0.25 mg/mL을 12시간동안 처리한 경우 $103.3 \pm 2.6\%$, $128.1 \pm 7.3\%$, $136.2 \pm 4.6\%$ 의 발현을 나타내었다. PF-W 0.05 mg/mL PF-W를 6시간 처리하였을 때 감소하는 경향을 보이지만 향후 농도의존적, 시간의존적인 형태로 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

건조 미숙탕자 물 추출물 (PF-W)이 SorLA promoter에 미치는 영향

SorLA의 발현에 PF-W가 미치는 영향을 확인하기 위해 SorLA의 promoter 정보를 검토하였다. 그 결과 Hirayama 등²³의 연구에서 transcription factor인 activator protein 1 (AP-1), CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) β , Hepatocyte nuclear factor (HNF)-5가 SorLA promoter에

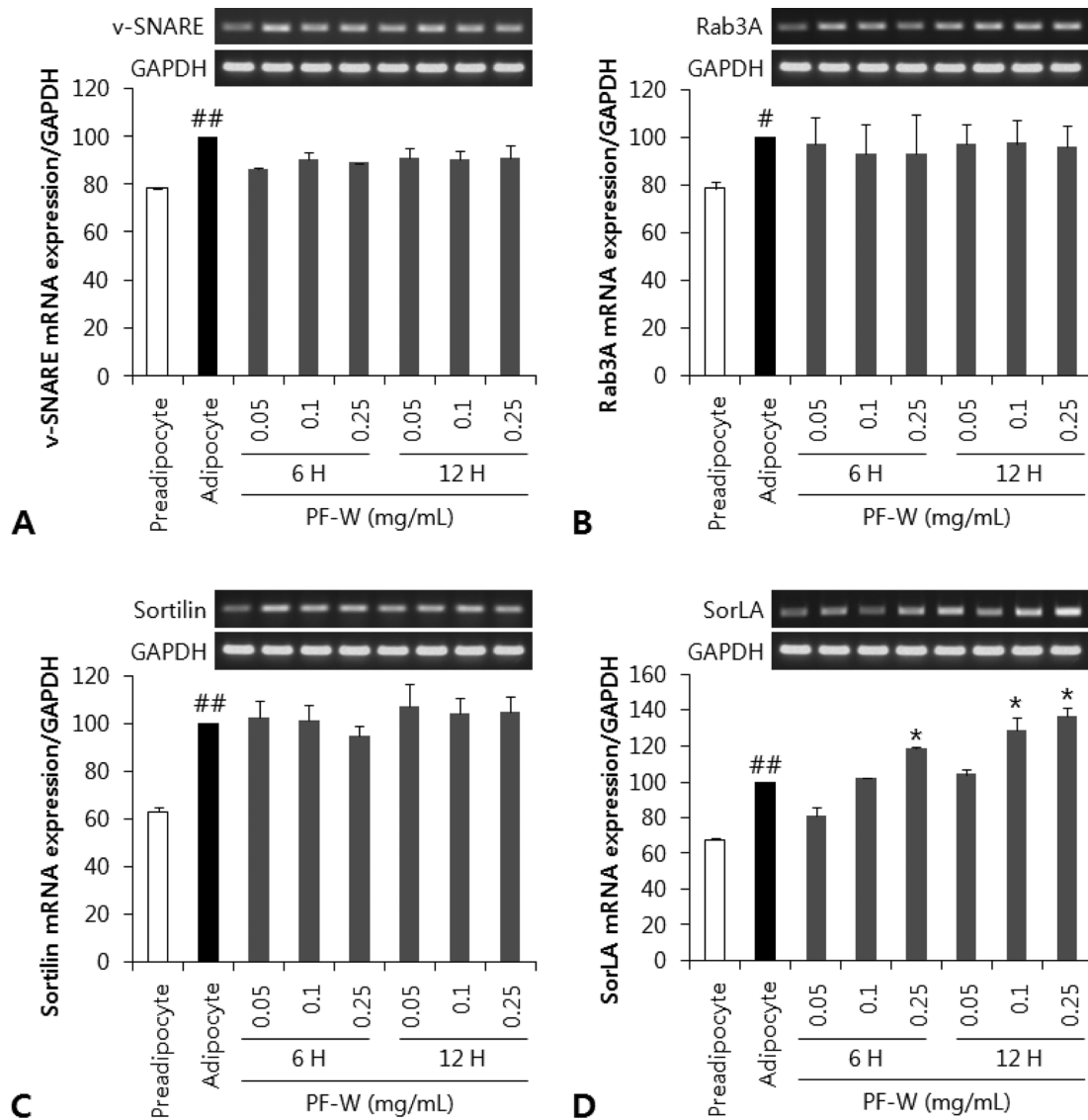


Fig. 3. Effect of a water extract of the dried, immature fruit of *Poncirus trifoliata* (PF-W) on the mRNA expression levels of protein transport-related biomarkers in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 cells were treated with PF-W (0.25 mg/mL) for 6 and 12 h. A: v-SNARE mRNA expression. B: Rab3A mRNA expression. C: Sortilin (SorLA) mRNA expression. D: SorLA mRNA expression. Data are expressed as Mean \pm SD of triplicate experiments. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ compared to the preadipocyte. *: $p < 0.05$ compared to the adipocyte.

작용할 수 있음을 확인할 수 있었다. 그중 간세포에서 작용하는 HNF-5를 제외한 PEA-1, C/EBP β 의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다 (data not shown). 그 결과 Fig. 4A에 정리한 바와 같이 C/EBP β 만이 PF-W 0.25 mg/mL 처리한 시간에 따라 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 C/EBP β 단백질 발현을 확인한 결과 Fig. 4B에 정리된 바와 같이 PF-W 처리 전·후의 세포질단백질 (Cyto)과 핵단백질 (Nuc)을 비교한 결과 PF-W 0.25 mg/mL 처리 전 (0.99 ± 0.1) 보다 6시간 처리한 후 (2.64 ± 0.8)의 핵단백질에서 더 많은 양의 C/EBP β 단백질이 확인되었다. ERK1/2는 세포질단백질분획, vimentin은 핵단백

질분획 확인을 위한 biomarker로 이용하였다.

고 찰

페놀화합물은 식물계에 널리 분포하는 2차 대사산물로 phenolic hydroxy group을 지닌 방향족 화합물이며 항암, 항염증, 항산화, 항동맥경화 등 다양한 생리활성을 가지고 있는 것이 보고되어 있다.²⁰ 그 중 일반적으로 총 폴리페놀 함량이 증가할수록 항산화 등의 생리활성이 증가하는 경향이 있다.^{20,24,25} 플라보노이드는 식물에 널리 분포하는 노란색 또는 담황색 계통의 색소로 항균, 항암, 항바이러스

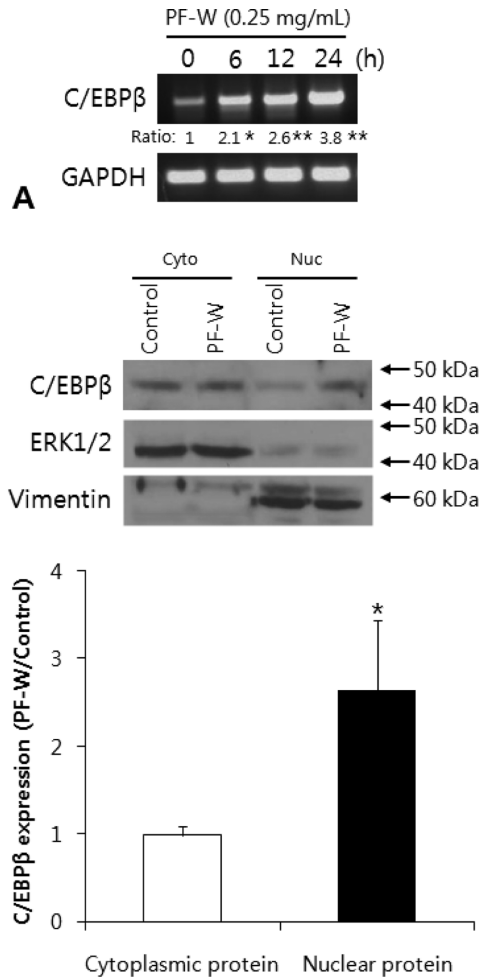


Fig. 4. Effect of a water extract of the dried, immature fruit of *Poncirus trifoliata* (PF-W) on C/EBPβ expression in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 cells were treated with PF-W (0.25 mg/mL) for 12 h. A: C/EBPβ mRNA expression by PF-W treatment. B: C/EBPβ protein expression in cytoplasmic and nuclear protein fraction by PF-W treatment. Data are expressed as Mean \pm SD of triplicate experiments. *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$.

및 항염증 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되어 있다.^{20,26,27} PF-W는 gallic acid와 quercetin을 폴리페놀과 플라보노이드의 표준물질로 사용하여 측정하였을 때 약 52 mg/g의 폴리페놀과 6.6 mg/g의 플라보노이드가 확인되었으며 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼소거능, 환원력, SOD 유사활성을 확인한 결과 IC₅₀ 농도가 Table 4와 같이 확인되었다. 이는 약용식물의 페놀화합물 함량과 항산화 활성을 탐색한 Kim 등²⁴의 연구논문을 바탕으로 PF-W의 폴리페놀과 플라보노이드의 함량 및 항산화 활성에 대해 평가한 결과 폴리페놀의 함량은 취 (59.75 mg/g)과 비슷한 수준이었으며, 오갈피나무 (69.59 mg/g), 삼지구엽초 (81.20 mg/g), 해동피 (62.06 mg/g)보다는 적은 값이었으며, 플라보노이드 함량은 부자 (5.97 mg/g), 당귀 (7.20

mg/g), 산수유 (5.15 mg/g), 삼칠삼 (5.89 mg/g), 인삼 (5.91 mg/g)과 비슷한 수준이었다. 또한, 페놀화합물의 함량에 비해 PF-W항산화 활성은 산수유 (IC₅₀: DPPH 0.74 mg/mL, SOD 4.57 mg/mL), 오갈피나무 (IC₅₀: DPPH 0.70 mg/mL, SOD 2.92 mg/mL), 삼지구엽초 (IC₅₀: DPPH 0.79 mg/mL, SOD 4.59 mg/mL)보다 2배 이상 낮은 것으로 확인되었으며 해동피의 DPPH 1.27 mg/mL와 유사한 값을 나타내었다.²⁴ 그러나 Shim 등¹⁶의 연구에서 설명한 바와 같이 항비만 효과와 함께 독성이 없어 장기간 섭취가 가능하므로 PF-W의 항비만 메커니즘을 규명하는 것은 향후 소재의 산업화를 위해 필요한 기초과정이라 판단된다.

LPL은 lipoprotein triglyceride를 free fatty acid와 mono-glyceride로 분해하여 세포 내로 free fatty acid가 들어올 수 있게 하는 효소로서 지방의 분해와 조직 내 지방의 축적에 주요기능을 하는 것으로 알려져 있다.²⁸ 그러므로 LPL의 억제를 통해 지방의 세포 내 흡입을 저해함으로써 항비만 효과를 나타내는 천연소재를 탐색하고 그 기전을 규명하는 것은 효과적인 항비만 기능성 소재를 확보하는 유효한 방법이라 판단되어 본 실험을 수행하였다.

PF-W 처리가 배양배지 내의 LPL의 함량을 감소시키고 활성과 mRNA의 변화에는 영향을 미치지 않으며, 3T3-L1 adipocyte 내의 LPL 단백질 함량은 증가시키는 것을 Fig. 2를 통해 확인할 수 있었다. 이는 Shim 등¹⁶이 연구한 결과와 같이 LPL의 활성에는 PF-W가 영향을 미치지 못한다는 것을 보여주는 자료임과 동시에 LPL mRNA의 발현에도 영향을 미치지 못하는 것을 추가적으로 나타낸다. 하지만 본 실험의 배지 내 LPL 단백질함량 감소와 세포 내 단백질함량 증가결과는 생성된 LPL 단백질이 세포 밖으로 분비되지 못하고 세포내부에 일정부분 축적되고 있음을 보여준다. 이는 앞선 많은 연구에서 제시한 LPL 단백질의 exocytosis와 endocytosis에 작용하는 여러 인자에 PF-W가 작용할 가능성이 있음을 의미한다.^{22,29} 이를 증명하기 위해 세포내 단백질 운반에 관련되는 여러 단백질들의 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. SNARE는 수송소포를 선별적으로 표적 막에 융합시키는 과정에 관여하는 단백질로서 v-SNARE (vesicle SNARE)와 t-SNARE (target SNARE)로 나눌 수 있으며 v-SNARE는 수송소포에, t-SNARE는 표적의 막에 존재하며 이들은 서로 docking하여 fusion하는 역할을 함으로서 세포의 분비과정을 조절한다.³⁰ Rab3A는 small GTP-binding protein superfamily로서 Rab family에 속하며, Ca²⁺ 의존성 exocytosis에 관여하는 것으로 보고되었다.³¹ Sortilin은 N-terminal Vsp10p (vacuolar protein sorting defective) domain을 가지며 type-1 transmembrane receptor family에 속하는 endocytic

receptor로서 골지체, 세포막에 주로 존재하며 LPL과 결합 후 분해에 관여하는 것이 알려져 있다.^{32,33} SorLA (sortilin-related receptor)도 sortilin과 같은 family에 속하는 receptor로서 endocytic activity와 세포내 vesicle들의 이동에 관여하는 것이^{22,32} 알려져 있을 뿐만 아니라 LPL의 세포내 분포를 변화시키고, lysosome으로 운반하여 분해를 유도함으로써 LPL의 활성을 조절한다고 보고되어있다.²² 이러한 연구결과들을 바탕으로 v-SNARE, Rab3A, Sortilin 및 SorLA의 발현변화에 PF-W가 미치는 영향을 확인한 결과 Fig. 3에 정리된 바와 같이 v-SNARE, Rab3A, Sortilin은 PF-W의 농도별, 시간별 처리에 따라 변화가 관찰되지 않은 반면 SorLA는 PF-W의 처리농도 및 처리시간에 따라 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 PF-W의 처리가 SorLA의 발현을 유도하여 endocytic activity 증가를 통한 LPL의 분비감소와 세포내 LPL의 분해에 관여함을 유추할 수 있었다. 그러나 SorLA 단백질과 LPL의 상호결합과 세포내 이동에 PF-W가 미치는 영향에 대한 구체적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

Hirayama 등²³의 연구를 통해 C/EBP β 가 SorLA promoter에 작용할 수 있음을 확인하였으며 실험결과 C/EBP β 의 mRNA가 PF-W의 처리시간에 따라 증가하는 것이 관찰되었고 3T3-L1 adipocyte의 세포질 및 핵 분획에서 PF-W의 처리에 의한 C/EBP β 단백질의 발현을 확인한 결과 핵에서의 단백질양이 증가된 것을 관찰하였다. 이를 통해 PF-W의 처리가 SorLA promoter에 작용이 가능한 C/EBP β 단백질을 핵으로 유도하여 SorLA의 mRNA 발현을 유도함으로써 증가된 SorLA가 LPL과 결합하여 endocytic activity 증가 또는 lysosome으로의 운반을 유도하여 LPL을 분해함으로써 LPL의 분비 및 활성감소를 유도하는 것으로 유추할 수 있었다. 그러나 구체적인 promoter 조절기전, 세포내 LPL의 이동에 대한 실험이 추가되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에는 최근 항비만 소재로 연구되고 있는 건조, 미숙탕자의 물 추출물 (PF-W) 소재를 대상으로 폴리페놀 (52.15 ± 4.02 mg/g)과 플라보노이드 (6.56 ± 0.47 mg/g) 함량을 측정하고 항산화 활성과 세포독성을 시험한 후, 지방흡수 제어 가능성을 확인하고자 lipoprotein lipase (LPL)의 억제효능을 배양배지와 세포 내의 LPL 함량, LPL mRNA 발현 그리고 LPL 효소활성측정을 통해 검토하였다. 그 결과 PF-W은 3T3-L1 adipocyte에서 LPL mRNA의 발현과 활성에는 영향이 없었으며, LPL의 분비를 억제하

는 것을 알 수 있었다. PF-W의 LPL 분비억제기작을 확인하기 위해 다양한 단백질 이동 관련 유전자의 발현을 확인하였고, 그 결과 LPL의 이동과 분해에 관여하여 세포내 LPL의 활성을 조절하는 것으로 알려진 SorLA의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 조절하는 transcription factor의 발현과 세포핵으로의 이동에 PF-W가 미치는 영향을 검토한 결과 PF-W를 처리함으로써 SorLA promoter에 작용하는 C/EBP β 의 단백질양이 세포핵에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 PF-W가 SorLA 유전자의 transcription factor인 C/EBP β 의 단백질 발현을 세포핵에서 증가시킴으로써 SorLA의 발현이 증가되어 LPL의 분비억제가 가능함을 확인할 수 있었으며 이는 PF-W의 항비만 효과기전을 설명하는 기초자료를 제공하는 것이라 사료된다.

References

1. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 1996; 87(3): 377-389.
2. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404(6778): 635-643.
3. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 2001; 22: 355-375.
4. Chaput JP, St-Pierre S, Tremblay A. Currently available drugs for the treatment of obesity: Sibutramine and orlistat. *Mini Rev Med Chem* 2007; 7(1): 3-10.
5. Collins P, Williams G. Drug treatment of obesity: from past failures to future successes? *Br J Clin Pharmacol* 2001; 51(1): 13-25.
6. Li M, Cheung BM. Pharmacotherapy for obesity. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68(6): 804-810.
7. Vickers SP, Cheetham SC, Headland KR, Dickinson K, Grempler R, Mayoux E, Mark M, Klein T. Combination of the sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor empagliflozin with orlistat or sibutramine further improves the body-weight reduction and glucose homeostasis of obese rats fed a cafeteria diet. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2014; 7: 265-275.
8. Bae JS, Kim TH. Pancreatic lipase inhibitory and antioxidant activities of Zingiber officinale extracts. *Korean J Food Preserv* 2011; 18(3): 390-396.
9. Kumar P, Bhandari U, Jamadagni S. Fenugreek seed extract inhibit fat accumulation and ameliorates dyslipidemia in high fat diet-induced obese rats. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 606021.
10. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297(2): E271-E288.
11. Braun JE, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 1992; 287(Pt 2): 337-347.
12. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011; 12(5): 3117-3132.

13. Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 2003; 19(10): 876-879.
14. 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 annuum* L. water extracts on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. *Nutr Res Pract* 2013; 7(2): 96-102.
15. Lee E. Antihyperlipidemic and antioxidant effects of *Poncirus trifoliata*. *Korean J Plant Resour* 2006; 19(2): 273-276.
16. Shim WS, Back H, Seo EK, Lee HT, Shim CK. Long-term administration of an aqueous extract of dried, immature fruit of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. suppresses body weight gain in rats. *J Ethnopharmacol* 2009; 126(2): 294-299.
17. Oh SD, Kim M, Min BI, Choi GS, Kim SK, Bae H, Kang C, Kim DG, Park BJ, Kim CK. Effect of *Achyranthes bidentata* blume on 3T3-L1 adipogenesis and rats fed with a high-fat diet. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014: 158018.
18. Lee SM, Kang YH, Kim DJ, Kim KK, Lim JG, Kim TW, Choe M. Comparison of antioxidant and α -glucosidase inhibition activities among water extracts and sugar immersion extracts of green pepper, purslane and shiitake. *J East Asian Soc Diet Life* 2014; 24(1): 101-108.
19. 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* 2014; 30(3): 319-325.
20. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56(11): 317-333.
21. Lee GW, Park SM, Yoo YC, Cho YH. Effect of *Poncirus fructus* extracts fermented with *Ganoderma lucidum* on the collagen synthesis and expression of matrix metalloproteinase-1. *Korean J Biotechnol Bioeng* 2013; 28(2): 106-114.
22. Klinger SC, Glerup S, Raarup MK, Mari MC, Nyegaard M, Koster G, Prabakaran T, Nilsson SK, Kjaergaard MM, Bakke O, Nykjær A, Olivecrona G, Petersen CM, Nielsen MS. SorLA regulates the activity of lipoprotein lipase by intracellular trafficking. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 7): 1095-1105.
23. Hirayama S, Bujo H, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Kobayashi J, Schneider WJ, Saito Y. Differential expression of LR11 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275(2): 365-373.
24. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 2004; 36(2): 333-338.
25. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(5): 727-747.
26. Kim EJ, Choi JY, Yu M, Kim MY, Lee S, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 2012; 44(3): 337-342.
27. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013: 162750.
28. Goldberg IJ, Merkel M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci* 2001; 6: D388-D405.
29. Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* 2014; 76: 301-331.
30. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993; 362(6418): 318-324.
31. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81(1): 153-208.
32. Hermey G. The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(16): 2677-2689.
33. Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, Gliemann J, Petersen CM. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1999; 274(13): 8832-8836.