

포도씨 탈지박 추출물 처리가 3T3-L1 Preadipocyte 내 지방 생성에 미치는 영향

- 연구노트 -

최용민 · 이선미 · 김영화 · 전건욱 · 성지혜 · 정현상 · 이준수[†]
충북대학교 식품공학과

Defatted Grape Seed Extracts Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes

Youngmin Cho, Seon-Mi Lee, Younghwa Kim, Geonuk Jeon, Jeehy Sung,
Heon-Sang Jeong, and Junsoo Lee[†]

Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of defatted grape seed extract (DGSE) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. DGSE at 100 µg/mL significantly suppressed lipid accumulation and glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in hormonally stimulated adipocytes, an indicator of adipocyte differentiation. In order to understand the anti-adipogenic effects of DGSE, the changes in the expression of several adipogenic transcription factors including peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α and β were investigated using immunoblotting. DGSE suppressed the expression of PPAR γ , C/EBP α , and C/EBP β proteins compared with control adipocytes in a dose-dependent manner. This results indicated that DGSE may alter fat mass by directly affecting adipogenesis in maturing preadipocytes and thus may have applications for the treatment of obesity.

Key words: defatted grape seed extract, 3T3-L1, adipogenesis, PPAR γ , C/EBP

서 론

한국은 서구화된 식습관 및 생활습관의 변화로 인한 에너지 과잉 공급으로 비만 인구가 현저히 증가하고 있는 추세이다. 비만은 더 이상 외모만의 문제로 간주되지 않으며 당뇨, 고혈압, 심혈관질환 및 염증성 질환 등과 같은 성인병을 유발하는 주요 위험 요소로 작용하는 것으로 밝혀졌다(1). 이에 따라 다양한 생리활성 물질의 지방세포 분화 및 신호전달 과정에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(2-4). 3T3-L1 세포는 preadipocyte에서 다양한 호르몬 및 transcription factor(peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) γ , CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBP), sterol regulatory element binding proteins(SREBP))에 의해 mature adipocyte로 분화되면서 세포내 triglyceride(TG) 축적에 관여하는 다양한 adipogenic gene과 효소 활성이 증가된다(5,6).

와인 및 포도 가공품의 산업 부산물인 포도씨에는 상당량의 procyanidin 및 tocotrienol이 존재하고 있다. 포도씨의 phytochemical들은 체내 reactive oxygen species(ROS) 의해 유발되는 암, 비만, 고지혈증 및 당뇨 등과 같은 만성질환

의 예방에 효과적인 것으로 알려져 있다. Bagchi 등(7)은 포도씨의 proanthocyanidin이 항암, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 항염, LDL 산화억제 등의 효과뿐만 아니라 심혈관질환 예방효과 및 면역증강효과를 갖는 것으로 보고하였다. Shao 등(8)은 cardiomyocyte에 있어 H₂O₂에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대해 포도씨 proanthocyanidin이 농도 의존적으로 세포 생존율을 증가시키는 것을 보고하였다. 위와 같이 지금까지 포도씨의 다양한 생리활성이 밝혀졌지만 항비만 활성에 대한 연구는 극히 미비한 실정이다. Moreno 등(9)은 포도씨 에탄올 추출물이 *in vitro*에서 pancreatic lipase, lipoprotein lipase, hormone sensitive lipase 등 지질 대사관련 효소의 활성을 농도 의존적으로 억제함으로써 항비만 효과를 입증한바 있다. 또한 Ardévol 등(10)은 포도씨 추출물이 catechin 및 epicatechin보다 효과적으로 지방세포내 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)의 활성을 억제하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 가공 부산물로 폐기되는 포도씨 탈지박 추출물의 3T3-L1 세포내 TG 축적 억제 효과 및 이에 관여하는 GPDH 활성과 PPAR γ 및 C/EBP α , C/EBP β 단백질 발현 억제 효과를 밝히고자 하였다.

[†]Corresponding author. E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr
Phone: 82-43-261-2566, Fax: 82-43-271-4412

재료 및 방법

재료 및 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), phosphate buffered saline(PBS), fetal bovine serum(FBS), bovine calf serum(BCS), trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin은 GIBCO 사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Insulin, isobutyl methyl xanthine(IBMx), dexamethasone(Dex), dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazolium bromide(MTT)는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blotting에 사용된 PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β , β -actin 1차항체 및 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG은 Santa Cruz 사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

Defatted grape seed extract(DGSE)의 제조

Campbell Early 포도씨(*Vitis labruscana* B.) 100 g에 hexane 2 L를 가하여 24시간 진탕하여 탈지하였다. 탈지된 포도씨 50 g에 methanol 500 mL을 가한 뒤 상온에서 24시간 추출하였다. 추출 후 고형분은 Toyo No. 2 여과지를 이용하여 분리하였고 상정액은 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C 이하에서 감압 농축하여 용매를 완전히 제거하였다. 추출 잔사는 DMSO에 100 mg/mL의 농도로 재용해 하였으며 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 추출물은 모두 0.2 μ m filter를 사용하여 멸균한 후 사용하였다.

3T3-L1 preadipocyte의 분화 유도

실험에 사용된 3T3-L1 preadipocyte는 ATCC(CL-193, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며 세포 증식은 10% BCS가 함유된 DMEM을 이용하였으며 분화 유도 및 성숙 배지로는 10% FBS-DMEM을 이용하였다. Preadipocyte를 6-well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 seeding 한 뒤 세포가 confluent stage에 도달하면 5 μ g/mL insulin, 0.5 mM IBMx, 1 μ M Dex를 첨가한 10% FBS DMEM을 사용하여 이틀간 분화유도 하였으며 이때 DGSE의 축적 및 분화억제력을 확인하기 위해 시료를 0~200 μ g/mL의 농도로 배지에 첨가하였다. 분화 유도 후 4일 동안 insulin만 첨가한 배지를 이용함으로써 지방세포를 성숙시켰다.

Oil Red O staining

Preadipocyte의 분화 및 성숙 6일 후에 배지를 제거한 뒤 PBS를 이용하여 수차례 세척한 뒤 10% formalin 용액을 이용하여 세포를 고정하고 세포내 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응하는 0.3% Oil Red O 용액을 이용하여 염색하였다. 염색된 세포는 현미경 관찰 후 isopropanol을 이용하여 용해한 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정한 뒤 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

GPDH activity

분화 및 성숙 6일 후에 배지를 제거한 뒤 PBS를 이용하여 수차례 세척하고 sonicator(Vibra-Cell VCX 750, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)를 이용하여 세포 단백질을 추출하였고, cell lysate의 GPDH활성 측정은 TaKaRa 사(Otsu, Japan)의 GPDH assay kit를 사용하였다. 효소활성 1 unit은 1 nmol NADH/min/protein으로 나타내었다. 세포의 단백질 함량은 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)에 의해 측정하였다.

Immunoblotting

지방 분화에 관여하는 대표적 transcription factor인 PPAR γ , C/EBP α 및 C/EBP β 의 발현에 대한 DGSE의 억제 활성을 확인하기 위해 immunoblotting을 실시하였다. Preadipocyte의 분화가 완료되면 세포에 cell lysis buffer(iNtRon, Seongnam, Korea)를 가하여 4°C에서 30분간 방치한 후 세포 용액을 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 세포 단백질 용액을 얻었다. DGSE 처리 농도별 cell lysate는 각각 BCA assay를 이용하여 단백질을 정량하였고 cell lysate의 단백질을 10 μ g으로 조정하여 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 된 SDS polyacrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후 5% skim milk를 이용하여 1시간 동안 blocking하였다. PPAR γ , C/EBP α 및 C/EBP β 의 1차 항체는 1:500의 비율로 상온에서 2시간 부착시킨 뒤 수차례 세척하고 각각의 2차 항체를 상온에서 1시간 부착시켰다. 항체 반응이 끝난 membrane에 ECL detection reagent(Pierce, Rockford, IL, USA)를 처리하고 X-ray film에 감광시켜 현상하였다.

결과 및 고찰

DGSE의 TG 생성에 대한 저해효과

본 연구에서는 농산 가공 폐기물로 버려지고 있는 포도씨 탈지박 methanol 추출물의 항비만 활성을 확인하고자 하였다. DGSE에 의한 TG 생성 저해효과를 측정하기 위해 시료를 3T3-L1 preadipocyte에 농도별(0, 25, 50, 100, 200 μ g/mL)로 처리하면서 분화를 유도하였다. 예비 실험을 통하여 500 μ g/mL 농도까지 DGSE는 3T3-L1 세포에 대하여 독성을 나타내지 않는 것을 MTT assay를 통해 확인하였으며 DMSO의 독성도 보이지 않았다. 또한 200 μ g/mL 이상의 농도에서는 시료 간 활성 차이를 나타내지 않아 200 μ g/mL를 최적 농도로 결정하였다.

3T3-L1 adipocyte 내 TG 생성은 Oil Red O staining에 의해 preadipocyte가 호르몬 유도에 의해 분화 및 성숙되면서 생성되는 지방을 염색한 뒤 흡광도를 측정함으로써 DGSE의 효과를 확인하였다. TG 생성은 DGSE를 25, 50, 100, 200 μ g/mL 처리하였을 때 대조군에 비해 각각 92, 78, 22 및 11%로 농도 의존적으로 현저히 감소하였다(Fig. 1).

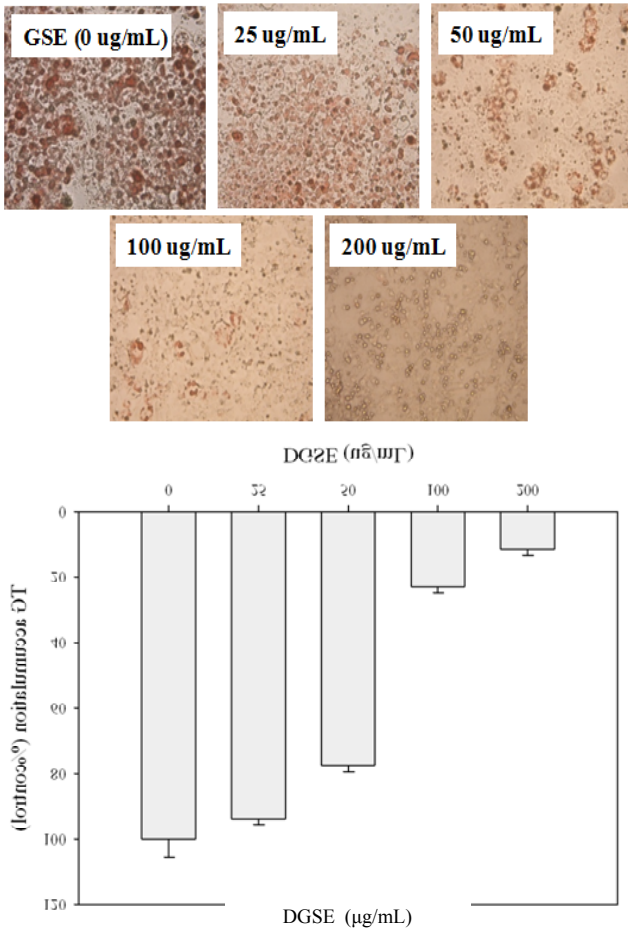


Fig. 1. Effect of defatted grape seed extracts (DGSE) on lipid accumulation (% control) in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with DGSE for 4 days (days 0~4) during differentiation. Lipid content was measured on day 6 by Oil-O-Red staining method. Assays were performed in triplicates for each treatment. Values are means ± SEM.

DGSE의 GPDH 저해효과

GPDH는 지방 및 근육세포에서 dihydroxyacetone phosphate를 glycerol-3-phosphate로 전환함으로써 TG 생합성에 관여하는 효소 중의 하나이다(11). 따라서 DGSE에 의한 TG 생성 감소에 GPDH의 관여 여부를 알아보기 위해 DGSE를 농도별로 처리하였다. 50 µg/mL까지는 시료 간 유의적인 차이를 보이지 않았으나 100 µg/mL 이상에서는 GPDH를 현저히 저해(92%)하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 본 연구에서는 GPDH의 mRNA 발현 양을 측정하지 않았지만 기존 보고에 의하면 GPDH는 preadipocyte가 지방세포로 분화되면서 그 발현양이 증가하는 것으로 밝혀졌다(12). 따라서 연구결과 지방 세포 내 TG 생성 억제에는 DGSE의 GPDH 활성 억제가 관여하며 나아가 DGSE가 GPDH의 발현에도 영향을 나타낼 것으로 생각된다.

Hsu와 Yen(3)에 의하면 식물체에 존재하는 phenolic compounds 즉, coumaric acid, EGCG, procynidin 및 pycnogenol이 µM 농도 수준에서 효과적으로 지방세포 내 TG 생

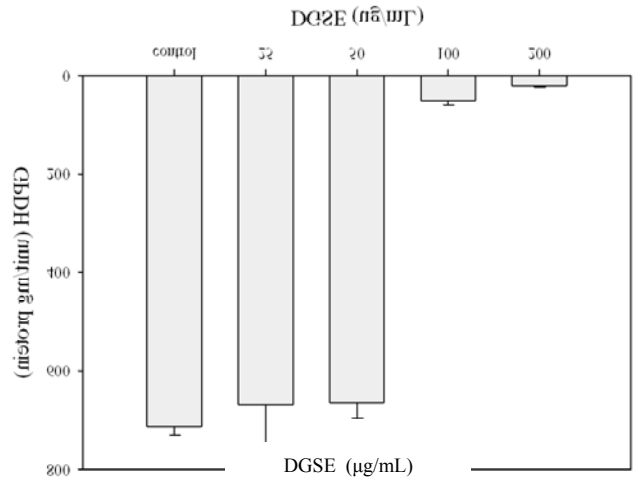


Fig. 2. Effect of defatted grape seed extracts (DGSE) on glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity (unit/mg protein) differentiated in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with DGSE for 4 days (days 0~4) during differentiation. Assays were performed in triplicates for each treatment. Values are means ± SEM.

성 및 GPDH 활성을 억제할 수 있는 것으로 나타나 있다. 본 연구에 사용된 DGSE 역시 포도씨 탈지박 methanol 추출물로부터 얻은 시료로써 상당량의 procyanidin들이 함유되어 있을 것으로 생각되며 세포내 TG 생성 억제 활성을 나타내는 주요 성분으로 작용했을 것으로 생각된다(13).

DGSE의 PPARγ, C/EBPα, C/EBPβ 단백질 발현 억제

Preadipocyte가 adipocyte로 분화하는 과정에는 Fig. 1의 사진에 나타낸 바와 같이 형태적 변화뿐 아니라 다양한 adipocytokine의 분비 및 transcription factor와 adipogenic protein의 발현이 수반된다. PPARγ 및 C/EBP α와 β 지방세포에 나타내는 특이적인 전사 인자로서 C/EBPβ는 분화 초기에 PPARγ와 C/EBPα는 분화 후기에 발현되어 여러 leptin 및 adiponetin과 αP2 및 FAS 등과 같은 adipocytokine과 adipogenic protein 발현에 중요한 역할을 한다(4).

본 연구에서는 DGSE의 PPARγ와 C/EBPα 및 β 단백질 발현 억제활성을 확인하기 위해 시료를 3T3-L1 preadipocyte에 농도별(0, 25, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리하면서 분화를 유도하였다. 호르몬 처리에 따라 각각의 세 단백질 모두 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3~5). 세 전사인자 모두 200 µg/mL에서는 95% 이상의 높은 발현 억제 활성을 나타내었으며 100 µg/mL에서도 약 50% 이상의 높은 활성을 나타냄에 따라 PSE의 지방분화 억제활성은 주요 전사인자의 발현 감소가 adipogenic protein의 발현을 억제시킴으로써 최종적으로 세포 내 TG 생성을 줄일 수 있었던 것으로 생각한다. 기존의 연구 보고에 의하면 PPARγ와 C/EBP 발현은 cAMP-response element binding protein(CREB) 및 extracellular signal-regulated protien(ERK)의 activation이 C/EBP 발현에 주요 역할을 하는 것으로 알려졌다(14). 또한 에너지 대사 항상성에 관여하는 AMP-

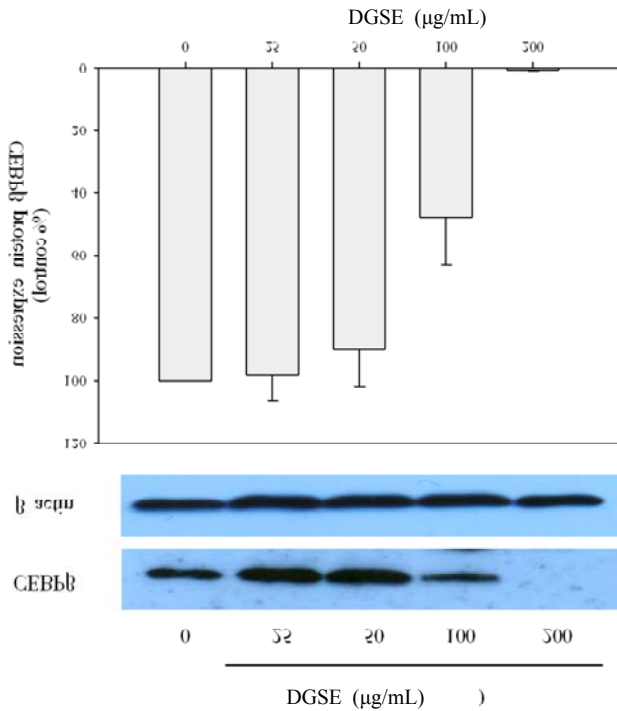


Fig. 3. Effect of defatted grape seed extracts (DGSE) on C/EBPβ protein expression in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with DGSE for 4 days (days 0~4) during differentiation. Assays were performed in triplicates for each treatment. Values are means ± SEM.

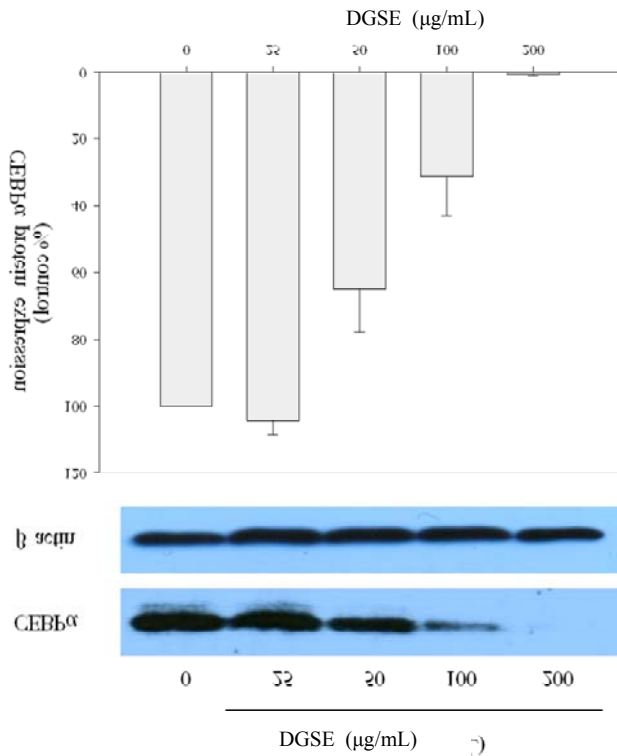


Fig. 4. Effect of defatted grape seed extracts (DGSE) on C/EBPα protein expression in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with DGSE for 4 days (days 0~4) during differentiation. Assays were performed in triplicates for each treatment. Values are means ± SEM.

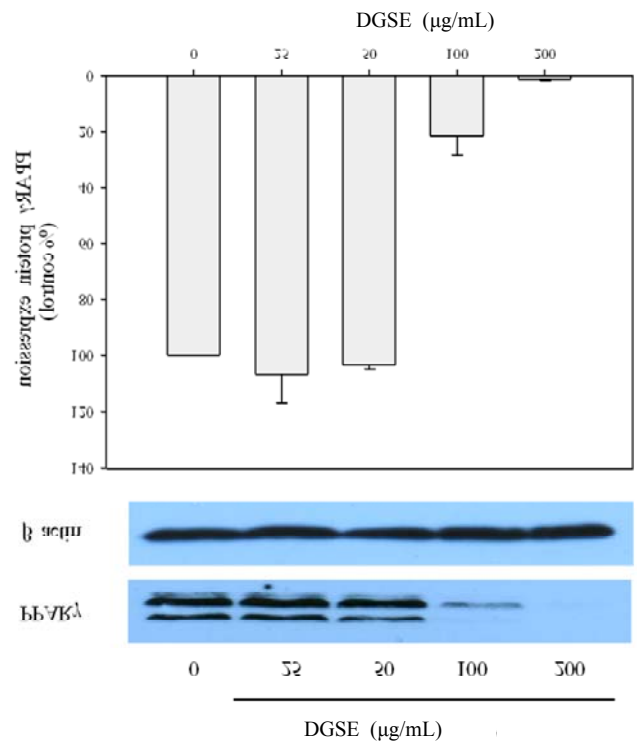


Fig. 5. Effect of defatted grape seed extracts (DGSE) on PPARγ protein expression in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with DGSE for 4 days (days 0~4) during differentiation. Assays were performed in triplicates for each treatment. Values are means ± SEM.

activated protein kinase(AMPK) 경로 역시 다양한 phytochemical에 의해 억제 혹은 활성화됨에 따라 3T3-L1 지방세포의 lipolysis에 영향을 미침으로써 항비만 활성을 나타내는 것이 보고된 바 있다(15-17). 따라서 본 연구에도 upstream 단계의 signaling proteins의 활성화 및 AMPK 경로에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

지금까지 포도씨 procyanidin에 대한 연구는 항산화, 항암, 항염증 활성에 초점이 맞춰져 있었다. Moreno 등(9)이 포도씨 에탄올 추출물 자체의 *in vitro* lipase 억제활성을 보고한 것을 제외하곤 포도씨 procyanidin의 항비만 연구는 추출물이 아닌 catechin 및 epicatechin 등의 표준품을 이용한 지방세포 분화 억제활성 및 lipolysis 활성에 국한되어 있음을 문헌고찰을 통해 알 수 있었다. 따라서 본 연구에 사용된 포도씨 메탄올 추출물의 procyanidin 조성에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 3T3-L1 preadipocyte에 있어 호르몬 유도에 의한 TG 생성 및 주요 전사인자(PPARγ 및 C/EBPα와 β)의 발현을 확인하였으며 DGSE의 효과적인 억제활성을 증명하였다. 포도씨 기름 가공 폐기물로부터 제조된 DGSE가 100 μg/mL의 비교적 낮은 농도에서도 우수한 지방 분화억제 활성을 나타내어 경제적이며 효과적인 항비만 기능성식품으로서의 활용가치가 기대된다.

요 약

본 연구에서는 농산 가공 폐기물로 버려지고 있는 포도씨 탈지박 methanol 추출물의 항비만 활성을 확인하고자 하였다. DGSE에 의한 TG 생성 저해효과를 측정하기 위해 시료를 3T3-L1 preadipocyte에 농도별(0, 25, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리하면서 분화를 유도하였다. 실험 결과 DGSE는 지방세포내의 TG 생성과 GPDH 활성 및 주요 전사 인자인 PPAR γ 및 C/EBP α 와 β 의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. DGSE는 100 µg/mL의 비교적 낮은 농도에서도 우수한 지방 분화억제 활성을 나타내어 경제적이며 효과적인 항비만 기능성식품으로서의 활용가치가 기대된다.

감사의 글

이 논문은 농림수산식품부 농림기술개발사업 지원으로 포도연구사업단의 연구비에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22: 355-375.
- Rayalama S, Della-Fera MA, Baile CA. 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 19: 717-726.
- Hsu CL, Yen GC. 2008. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 52: 53-61.
- Cowherd RM, Lyle RE, McGehee Jr RE. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10: 3-10.
- Morrison RF, Farmer SR. 2000. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130: 3116S-3121S.
- Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122S-3126S.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148: 187-197.
- Shao ZH, Becker LB, Vanden Hoek TL, Schumacker PT, Li CQ, Zhao D, Wojcik K, Anderson T, Qin Y, Dey L, Yuan CS. 2003. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates oxidant injury in cardiomyocytes. *Pharmacol Res* 47: 463-469.
- Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. 2003. Inhibitory effects of grape seed extracts on lipases. *Nutrition* 19: 876-879.
- Ardévol A, Bladé C, Salvadó MJ, Arola L. 2000. Changes in lipolysis and hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Obesity* 24: 319-324.
- Wise LS, Groom H. 1978. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem* 25: 273-276.
- Grégoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
- Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Tokutake S. 2002. Pro-cyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. *J Agr Food Chem* 50: 4983-4988.
- Saito T, Abe D, Sekiya K. 2007. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 371-376.
- Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, Park OJ. 2005. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 694-699.
- Yin W, Mu J, Birnbaum MJ. 2003. Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 278: 43074-43080.
- Holm C. 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31: 1120-1124.

(2010년 3월 2일 접수; 2010년 4월 9일 채택)