

연구노트

Comparison of Anti-Adipogenesis Activity by Several Grape Extracts

Si-Rim Lee¹, Chul-hong Park¹, Eun-Young Kuan¹, Yan-Qing Lu¹, Hong Kim¹,
Ki-Chan Kim¹, Hyeong-U Son¹, Hyun-Jin Lee¹, Jin-Chul Heo² and Sang-Han Lee^{1,2*}

¹Department of Food Science and Biotechnology,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Food and Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

포도 추출물로부터 C/EBP 전사인자 활성 비교

이시림¹ · 박철홍¹ · 권은영¹ · 루옌칭¹ · 김 홍¹ · 김기찬¹ ·
손형우¹ · 이현진¹ · 허진철² · 이상한^{1,2*}

¹경북대학교 농업생명과학대학 식품공학과, ²경북대학교 식품생물산업연구소

Abstract

In order to compare what kinds of transcription factors are associated with the inhibition of preadipocyte cell proliferation, we prepared several grape extracts and tested the expression patterns by reverse transcription-polymerase chain reaction. As a result, 50% ethanol extract of Campbell early seed inhibited adipogenesis derived from the MDI solution. Extract of Campbell early seed was significantly inhibited lipid droplet formation and expression of molecular factors C/EBP-alpha and delta in 3T3-L1 cells. It is suggested that grape extracts of fractions would be a good candidate for the development of regional skin fat modulator.

Key words : grape extracts, anti-adipogenesis, biomarkers, C/EBP transcription factor

서 론

포도나무(*Vitis vinifera* L.)는 쌍떡잎식물 갈대나뭇목(*Rhamnales*) 포도과(*Vitaceae*)의 낙엽성 덩굴식물로서(1), 국내에서 재배되는 주 품종은 캠벨얼리(Campbell early) 품종으로, 1892년 미국에서 개발된 포도 품종이며 가장 기호성이 강한 품종 중 하나로 알려져 있다. 포도는 세계적으로 가장 많이 소비되는 과일 중의 하나이며, 특히 캠벨얼리 포도(*Vitis labrusca* L.)는 당도가 높고 신맛과 향기가 강하고 과즙이 풍부하며 국내 생산량 중 약 7%는 포도주, 포도즙, 포도잼, 빵, 과자 등의 가공제품으로 소비되며 93% 이상이 생과로 소비되고 있다(2,3).

포도는 당, 유기산 및 독특한 향기를 함유하며, 항산화성 폴리페놀 성분들(resveratrol, flavonoids, phenolic acid 등)이 풍부하게 함유되고 있어 산화적 스트레스 등을 예방할 수

있으며(4-8), 여러 가지 생체조절 기능을 나타낸다고 알려져 있다. 이들의 대부분은 씨(60-70%)와 과피(30%)에 함유되어 있고, 특히 포도씨에는 항산화 성분들이 다수 포함되어 있어 암, 고혈압, 동맥경화, 혈전, 심장질환 및 노화 등을 예방한다고 보고되어 있다(9,10). 또한 노인성 치매, 당뇨, 대장암 예방 등에 관한 생체내의 효과에 대한 많은 연구가 행해지고 있다(11,12). 그러므로 포도과정 중 부산물로 생산되는 포도씨를 이용하여 현재 증가하고 있는 비만 예방 효과를 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다.

비만(obesity)은 과다한 지방세포의 분화와 불균형적인 에너지 대사에 의해 유발된다(13). 비만은, 조직 내 중성지방 축적 및 증가로 인해 당뇨병을 유발시킬 수 있으며(14-19), 혈액 내에 중성지방 증가로 고지혈증이 발생되어 고혈압 및 심혈관계 질환 등을 유발할 수 있으며 다양한 만성퇴행성 질환들을 유발하게 된다(20,21). 즉 지방세포 내에 과다한 중성지방의 축적으로 인해 다양한 합병증들이 유발되게 되는 것이다. 그러므로 현재 비만을 억제하기 위

*Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

하여 지방세포의 분화와 지방대사에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(22,23).

전지방세포인 3T3-L1 cell은 분화가 진행될수록 지방생성에 관여하는 여러 가지 효소들과 전사인자 및 호르몬 등이 발현되면서 지방구(lipid droplet) 형성이 증가하게 되는데, 그 결과 지방구 내에 주로 존재하고 있는 중성지방의 증가와 지방 축적에 관여하는 효소들이 활성을 띠으로써, 세포 내 지방 축적이 일어나게 된다(24-26).

이에 본 연구는 Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물을 이용하여 비만 억제 효과를 확인하고자 지방세포의 생성 억제 정도를 보기 위해 3T3-L1 preadipocyte cell을 MDI solution을 이용하여 지방세포로 분화시켰을 때 추출물의 효과를 확인하였고, 이를 통하여 초기 분화에 관여하는 CREBP- δ 와 후기분화에 관여하는 CREBP- α 의 억제 정도를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

재료는 2005년에 수확한 켈벨을 김천농협에서 구입하여 10°C의 저장고에 보관하면서 사용하였다. 재료는 실험실 내에서 과육과 과피하여 포도씨만을 건조한 후 homogenizer를 이용하여 완전히 분쇄한 다음, 각 sample에 10배의 50% ethanol을 이용하여 추출과정을 거쳤으며, 이후 filter paper를 이용하여 찌꺼기를 제외한 용액을 동결건조를 통하여 분말로 만들어서 실험에 사용하였다.

세포 배양

실험에 사용된 세포는 3T3-L1 Preadipocyte cell line으로서, DMEM (Delbecco's modified eagle medium) 배지에 10% BS가 첨가된 배지를 사용하였으며 배양 조건은 37°C, 5% CO₂ incubator 내에서 배양하였다. 3-4일 간격으로 세포가 약 70% 정도 자랐을 때 계대하였다.

Adipogenesis assay

배양 중인 3T3-L1 세포를 6 well plate에 1×10^6 cells/mL가 되도록 분주하여 10% BS가 첨가된 DMEM 배지에 배양하였다. 세포가 confluent 상태가 되고 나서 1일 후 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 세포분화유도물질인 MDI solution (3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), insulin, dexamethasone)을 처리하여 2일 동안 배양하였다. 그 후 3일째부터는 10% FBS와 insulin을 첨가한 DMEM 배지에 7일간 배양하였으며 세포내 지방구(lipid droplet)의 형성을 근거하여 지방세포로 분화시켰다. Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물은 0.1, 0.3, 1 mg/mL의 농도로 분화 전 과정동안 배지에 첨가하였다.

Oil Red-O Staining

세포 배양액을 제거하고 1X PBS로 2번 세척한 다음, 세포를 고정시키기 위해 10% formalin solution을 각 well에 넣고 상온에서 1시간 동안 고정하였다. 고정된 세포를 건조시킨 후 Oil Red-O 시약(Sigma, USA)을 세포에 처리하여 1시간 동안 염색하였다. 염색이 된 세포는 현미경으로 관찰하였으며 지방구에 염색된 염색시약을 isopropyl alcohol로 용해하여 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 염색은 0, 1, 2, 4, 6, 8일 째 모두 염색하여 관찰하였다.

Biomarkers의 분석(RT-PCR)

추출물을 처리한 세포의 배양액을 제거한 후 TRI-Reagent (MRC, USA)을 이용하여 Total RNA를 추출하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, AMV RTase (Finnzymes, Finland)와 Oligo dT primer를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후 cDNA를 e-Taq polymerase (Solgent, Korea)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR에 사용된 Primer로는 C/EBP- α (forward(F) : 5'-AGCCGAGATAAAGCCAAACAAC-3', reverse(R) : 5'-GAAT CTCCTAGTCCTGGCTTGC-3'), C/EBP- δ (F: 5'-TGTCG GGGTCTGAGGTATAGGT-3', R : 5'-AACCAGGAGATG CAGCAGAAG-3'), SREBP-1 (F: 5'-AGTGGCAAAGG AGGCACTACAG-3', R: 5'-GAAGACCACAGCCAATGA CAAA-3'), PPAR- γ (F: 5'-CATCGA GGACATCCAAGACAAC-3', R: 5'-GGGTGGGACTTTCTCTGCTAATA-3'), 18s RNA (F:5'-ATGTGGTGTGAGGAAAGCAGA-3', R: 5'-TCTTGG ATACCCACAGTTCG-3')를 사용하였다. PCR 반응이 끝난 후 1% agarose gel에 EtBr을 첨가하여 전기영동 하였으며 이를 UV을 이용하여 DNA를 확인하였다.

결과 및 고찰

Adipogenesis assay에 의한 비만 억제 활성 비교

비만억제 활성을 확인하기 위해 3T3-L1 preadipocyte cell을 MDI solution을 이용하여 지방세포로 분화시키면서, 동시에 Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물 0.1, 0.3, 1 mg/mL을 각각의 분화 과정에 처리해 주면서 MDI solution만을 처리한 것과 비교하였다. MDI solution을 처리하게 되면 preadipocyte가 시간이 경과함에 따라 지방구가 증가하면서 지방세포가 점점 분화되는데 이를 Oil Red-O으로 염색하여 현미경으로 관찰하면 비만억제 정도를 확인할 수 있다(Fig. 1). Oil Red-O는 지방세포가 분화되면서 생성되는 중성지방을 적색으로 염색시켜 중성지방의 양을 확인할 수 있는데, 염색된 양을 비교함으로써 지방구 생성 억제 효과를 확인할 수 있다.

그 결과, Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물 1 mg/mL을 처리한 세포에서는 MDI solution만을 처리한 세포에 비교하였을 때, 분화된 지방세포가 약 50% 이상 현저히 억제되는 것을 현미경적 관찰에서 확인할 수 있었다(Fig. 1). Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물 1 mg/mL을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 날짜별로 비교하였을 때 0-4일째까지는 중성지방의 양이 크게 변화가 없었으나, 4-6일째로 넘어가는 기간부터 6-8일째까지 비교하였을 때 확연히 중성지방의 양 뿐만 아니라 크기 또한 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 그 후, 더 정확한 결과를 갖기 위하여 중성지방에 염색된 Oil Red-O를 용해하여 흡광도를 측정 한 결과 역시 대조군에 비하여 Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물 1 mg/mL을 처리한 군에서 50% 이상 억제되는 결과를 나타내었다. 이는 Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물이 지방 세포가 분화되는 과정에서 생성되는 중성지방의 양을 감소시킴으로써 비만 억제 활성이 뛰어나다고 할 수 있다.

린에 의해 활성화되는 C/EBPs나 SREBPs와 함께 지방합성과 저장에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 역할을 한다(27). 이 때, C/EBP α 는 지방세포의 전사조절분자 중의 하나로서 PPAR γ 와 마찬가지로 지방세포의 후기 분화과정에 주요 전사인자이다. 다양한 섬유아세포에서 과다 발현하게 되면 adipogenesis를 유도한다고 보고되어 있다(29).

본 연구에서는 이들의 mRNA 발현에 미치는 Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물의 효과를 살펴본 결과, 후기 분화에 중요한 역할을 하는 C/EBP α 가 대조군에 비하여 줄어든 것을 확인할 수 있었으나, PPAR γ 는 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 C/EBP α 는 감소하였으나 그 상호조절자인 PPAR γ 는 차이가 나는 것으로 보아 기존의 data와는 상이한 것으로 추정되어 본 실험에서 사용하기 위하여 제조한 Campbell early의 seed 50% 에탄올 추출물은 PPAR γ independent pathway를 거치는 것으로 간주된다. 또한, 어떤 인자들이 C/EBP α 의 mRNA 발현을 억제하는지 알아보기 위하여 이들의 상위에서 조절하는 전사인

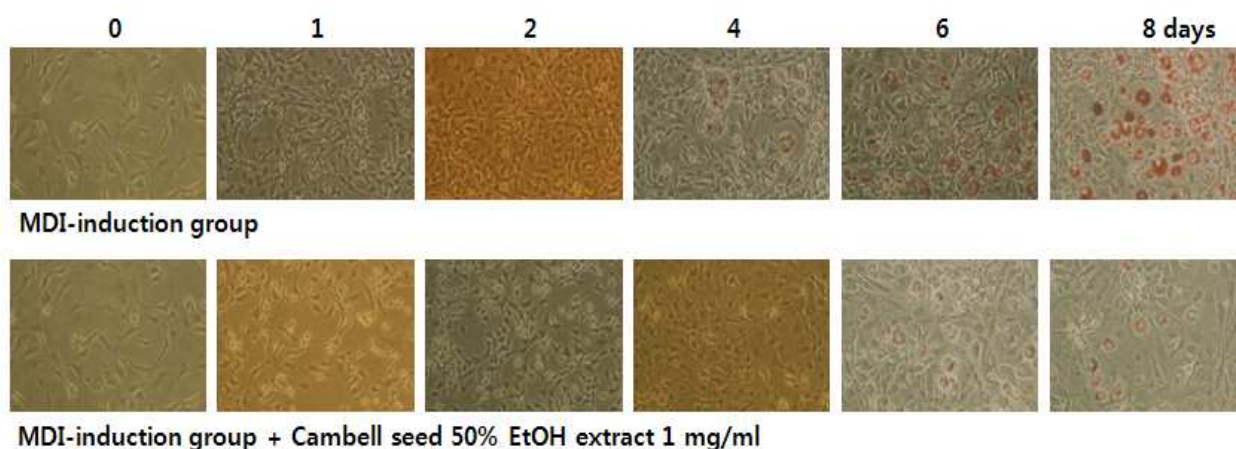


Fig. 1. Inhibitory effects by Campbell seed 50% EtOH extract 1 mg/mL in preadipocyte cells activated with insulin induction (MDI-Induction).

Preadipocyte cells were observed with Oil Red-O staining solution on 0 - 8 days.

비만 억제 활성에 관여하는 biomarkers의 비교

중성지방의 양이 감소되는 것이 지방 생성이 억제되어 지방 축적이 감소되는지를 알아보기 위하여 RNA level에서 확인하였다. 중성지방의 형성은 몇 가지 주요 효소들의 도움에 의해 합성된다. 이 효소들은 PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins), SREBPs (sterol regulatory element binding proteins)과 같은 여러 transcription factors에 의해 조절된다(27). PPAR- γ 는 preadipocyte에서 지방 세포로 분화되는 과정 중 지방생성의 관여에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이며 특히 후기 분화의 주요 전사인자로 알려져 있다. 이들은 지방세포의 분화와 관련된 여러 가지 enzyme들의 발현에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며(28), 인슐

린에 의해 활성화되는 C/EBP δ 의 mRNA 발현 또한 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). C/EBP δ 는 지방세포의 초기 분화과정에서 발현되며 PPAR γ 와 C/EBP α 의 상위에서 mRNA 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 즉, C/EBP δ 는 분화 초기에 PPAR γ 와 C/EBP α 는 분화 후기에 발현되어 지방세포 생성에 관여하고 있다.

그 외에 PPAR γ 의 상위에서 조절하는 전사인자인 SREBP-1은 mRNA 발현의 감소가 보이지 않았다. 이 결과로 보아 초기 분화에 생성되는 SREBP-1에 차이가 없고 그러므로 PPAR γ mRNA 발현 또한 달리 변화가 없는 것으로 보인다. 그러나, SREBP-1 외에 상위에서 조절하는 C/EBP δ 를 감소함으로써 C/EBP α 의 mRNA 발현을 감소시켜 지방 세포로 분화되는 과정 중 지방생성을 감소시킴으로써 비만을 억제하는 것으로 판단된다.

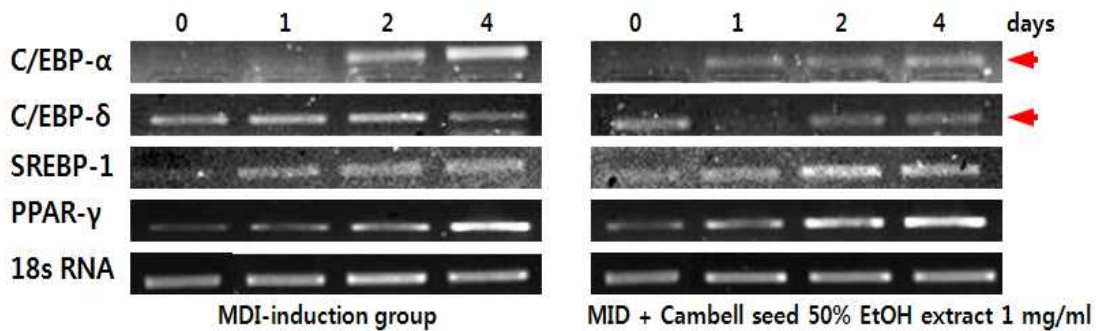


Fig. 2. Comparison of C/EBP-alpha and delta transcription factors by Cambell seed 50% EtOH extract 1 mg/mL.

Adipogenesis-related gene expressions were confirmed by RT-PCR.

포도의 추출물을 이용하여 비만 억제 활성을 비교한 결과, Campbell early seed의 50% ethanol 추출물에서 MDI 유도 후, 4일째에서 lipid droplet의 억제 활성이 보이기 시작하였으며 이때에 관여하는 분자인자로서 C/EBP-alpha 및 delta에서 발현의 차이를 보였다. 본 추출물을 이용하면 비만 억제 등의 용도로 피부미용에의 응용이 가능하다고 판단된다.

참고문헌

- Lee KY, Ko KC, Lee JC, Yoo YS, Kim SK (1985) The Furture of Grape Culture. Daehan Book Co, Seoul.
- Park ER, Kim KS (2000) Volatile flavor components in various varieties of grape. Korean J Postharvest Sci Technol, 7, 366-372
- Jo YG, Kim JE (2008) Quality characteristics of wet noodles after addition of grape-peel powder. East Asian Soc Dietary Life, 18, 822-828
- Renauds S, Loregeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart diseases. Lancet, 339, 1523-1526
- Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J (1993) Possible mechanisma for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food Technol, 4, 85-89
- Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE (1994) Natural antioxidants in grapes and wines. J Agric Food Chem, 42, 64-69
- Tanahashi H, Suwa Y, Toyoda Y, Itakura H (1995) Clinical and component studies on antioxidant ability of red wine. Am J Enol Vitic, 46, 405-409
- Clare MH (1998) Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. Food Technol, 52, 63-70
- Trichopoulou A, Lagiou P (1997) Health traditional Mediterranean diet, An expression of culture, history, and lifestyle. Nutr Rev, 55, 383-389
- Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol, 33, 1061-1080
- Castillo J, Benavente-Garcfa O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, Adel Rio J (2000) Antioxidant activity and radioprotective effect against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds: Comparative study versus other phenolic and organic compounds. J Agric Food Chem, 48, 1738-1745
- Ariga T (1999) Antioxidative functions. Preventive action toward disease and utilization of proanthocyanidins. 日本油化学會誌, 48, 1087-1096
- Kim JB (2001) New horizon in atherosclerosis research: Insights into fat cell differentiation and insulin sensitivity with ADD1/SREBP1 and PPARγ. Korean J Lipidol, 11, 79-83
- Kelly DE, Mandarino LJ (2000) Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. Diabetes, 49, 677-683
- Kelly DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH (2000) Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistansce. Am J Physiol Endocrinol Metab, 278, 941-948
- Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Kawanaka K, Holloszy JO (1999) Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. Am J Physiol., 276, 665-672
- Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Ferguson K, Holloszy JO (2000) High fat diet induced muscle insulin resistance: High fat diet induced muscle insulin resistance: Relationship to visceral fat mass. Am J Physiol, 279,

- 2057-2063
18. Storlien LH, Baur LA, Kriketos AD, Pan DA, Cooney GJ, Jenkins AB, Calvert GD, Campbell LV (1996) Dietary fats and insulin action. *Diabetologia*, 39, 621-631
 19. Pan DA, Lillioja S, Kriketos Ade, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH (1997) Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*, 46, 983-988
 20. Ahn JY, Lee HJ, Kim SN, Park JH, Ha TY (2008) The anti-obesity effect of zuerletin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 373, 545
 21. Woo MN, Bok SH, Lee MK, Kim HJ, Jeon SM, Do GM, Shin SK, ha TY, Choi MS (2008) Anti-obesity and hypolipidemic effects of a proprietary herb and fiber combination (S&S PWH) in rats fed high-fat diets. *J Med Food*, 11, 69
 22. Grundy SM (1998) Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr*, 67, 563S-572S
 23. Albu J, Allixon D, Boozer CN, Heymsfield S, Kissileff H, Kretser A, Krumhar K, Leibel R, Nonas C (1997) Obesity solutions report of a meeting. *Nutr Rea*, 55, 150-156
 24. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 875-888
 25. Morrison RF, Farmer SR (2000) Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr*, 130, 3116S-3121S
 26. Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*, 130, 3122S-3126S
 27. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 14, 1293-1307
 28. Rossen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, 4, 611-617
 29. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD (1994) Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev*, 8, 1654-1663

(접수 2010년 9월 28일, 수정 2011년 1월 25일 채택 2011년 1월 28일)