

3T3-L1 세포에서 Resveratrol과 Epigallocatechin Gallate(EGCG)의 지방세포 분화 억제에 미치는 시너지 효과

김연정 · *곽호경*

승의여자대학교 식품영양과, *한국방송통신대학교 가정학과

Synergistic Anti-adipogenic Effects of Resveratrol and Epigallocatechin Gallate in 3T3-L1 Adipocytes

Yunjung Kim and *Ho-Kyung Kwak*

Dept. of Food and Nutrition, SoongEui Women's College, Seoul 100-751, Korea

*Dept. of Home Economics, Korea National Open University, Seoul 110-791, Korea

Abstract

Resveratrol (RVT) and epigallocatechin gallate (EGCG) individually inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. The objective was to examine the possibility of interaction between RVT and EGCG, resulting in enhanced inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Preadipocytes were treated with RVT and EGCG individually at 6.25 or 25 μ M (RVT6.25 or RVT25) and 12.5 or 50 μ M (EGCG12.5 or EGCG50) and in combination (RVT6.25 + EGCG12.5 and RVT25 + EGCG50). RVT25 as an individual compound decreased lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes by 24%, and RVT25 + EGCG50 further decreased lipid accumulation by 77%. In addition, exposure of 3T3-L1 adipocytes to RVT6.25 + EGCG12.5 and RVT25 + EGCG50 combinations resulted in an enhanced increase of adiponectin release and inhibition of leptin release. Quantitative analysis revealed that the combination of tested materials (RVT6.25 + EGCG12.5 and RVT25 + EGCG50) decreased the expression levels of C/EBP α , PPAR γ 2, and aP2. These results indicate that the combined treatments with RVT and EGCG produce synergistic effects on inhibiting adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. The overall results suggested that the combining RVT and EGCG might be more capable of exerting antiobesity effects than each individual compound by itself.

Key words: epigallocatechin gallate, resveratrol, 3T3-L1, adipogenesis, synergistic effect

서론

비만은 전 세계적으로 가장 빠른 증가 추세를 보이는 심각한 공중보건문제 중 하나로서, 우리나라에서도 2009년도에 실시한 국민건강영양조사에 의하면 성인의 비만 유병률이 대략 31.3%로 지난 10년간 무려 5.3%가 증가하였다(MHWFA & KCDC 2010). 특히 내장지방형 비만은 인슐린 저항성, 내당능 장애, 고혈압, 그리고 이상지질혈증 등을 일으키는 주요한 위험인자로 알려져 있다(Nakamura 등 1994). 한편, 최근 평균수명의 증가에 따른 삶의 질에 대한 인식 변화와 더불어 운동요

법 및 식이요법 이외에도 체중 조절에 효과적인 기능성 원료, 특히 식물성 화합물(phytochemical)에 대한 관심이 높아지고 있다. 식물성 화합물은 인체의 건강에 유익한 생리활성을 지닌 식물유래 화합물로, 식물이 해충이나 질병으로부터 자신을 보호하거나 성장을 조절하기 위해 만들어내는 성분이다(Perez-Vizcaino 등2006). 우리가 일상식사를 통해 섭취하고 있는 식물성 화합물인 폴리페놀 성분은 주로 항산화 및 항암, 항염증 효능 등이 알려져 왔으나 (Surh 2002), 최근 체중 조절 및 대사질환 개선 등에 관한 효능이 새롭게 주목받고 있다. 녹차는 우리나라를 비롯한 아시아 지역에서 널리 소비되

* Corresponding author: Ho-Kyung Kwak, Department of Home Economics, Korea National Open University, Seoul 110-791, Korea. Tel: +82-2-3668-4649, Fax: +82-2-3668-4188, E-mail: hkkwak@knou.ac.kr

고 있는 음료 중 하나로서, 녹차의 생리활성물질로 알려진 폴리페놀 성분은 주로 카테킨류로 epicatechin(EC), epicatechin gallate(EGCg), epigallocatechin(EGC), epigallocatechin gallate(EGCG) 등을 함유하고 있다. EGCG는 널리 알려진 항산화 효능뿐만 아니라, 체중 조절 및 혈당 강하, 혈중 지질 농도 감소 등과 같은 대사질환을 개선시키는 것으로 알려져 있다(Son 등 2005; Bose 등 2008). 또한, 마우스 유래 지방세포주(3T3-L1)에 EGCG를 100 μ M 이상으로 처리했을 때 지방산 산화 촉진 및 아포토시스 유도를 통해 중성지방 축적을 억제시켰다(Lin 등 2005; Wu 등 2005).

심혈관계질환 예방효과가 알려지면서 수년간 소비량이 증가하고 있는 적포도주는 식물성 화합물인 resveratrol(RVT)을 함유하고 있다. Resveratrol은 포도, 오디, 땅콩, 코코아 등 다양한 식품에 존재하며, 항산화 및 항암, 항염증 효능 등 다양한 생리활성이 밝혀지면서 의약품뿐만 아니라, 기능성 원료로서 주목 받고 있는 식물성 화합물이다(Jang 등 2001; Rayalam 등 2011). 이와 같은 기능과 더불어 식이성 비만 마우스에게 9주간 식이에 0.02~0.04% 농도의 resveratrol을 함께 급여한 결과, 체중 및 내장지방량이 감소되었고(Lagouge 등 2006), 3T3-L1 세포주에 25~100 μ M의 resveratrol을 처리한 결과, 지방세포 분화 관련 유전자의 발현 억제를 통해 지방 축적을 억제시키는 것으로 보고되었다(Rayalam 등 2008).

한편, Rayalam 등(2011)은 resveratrol과 다른 식물성 화합물의 혼합 사용이 대사질환 개선에 긍정적 효과를 가져올 수 있음을 시사했다. 마우스 및 인체 지방세포주에 resveratrol과 genistein 및 quercetin을 혼합 처리한 결과, 지방세포 분화 억제에 시너지 효과를 나타낸 것으로 보고되었고(Park 등 2008), 폐경기 랫트 모델에서 resveratrol과 비타민 D의 병용 급여가 체중 증가를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(Lai 등 2011). 반면, 지방 축적을 억제하는 것으로 널리 알려진 CLA(trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid)를 resveratrol과 혼합 사용한 경우에는 지방 축적 억제에 있어 상승작용이 나타나지 않았다(Lasa 등 2011). 따라서, 본 연구에서는 각기 지방 축적 억제 효과가 있음이 보고되었고, 또 널리 섭취되고 있는 음료인 녹차와 적포도주의 생리활성 물질인 EGCG와 resveratrol의 병용 처리에 따른 지방 축적 억제 시너지 효과 여부를 알아보고자, 비만 관련 연구에서 보편적으로 사용되고 있는 3T3-L1 지방세포주를 배양하여, 이들 화합물 처리에 따른 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 3T3-L1 지방전구세포의 배양

실험에 사용한 3T3-L1(CL-173) 세포는 American Type Culture

Collection에서 구입하여 10% new born calf serum과 0.1% penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL) 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 세포주는 70% confluent 상태에서 48시간마다 배지를 교환하면서 배양하였다.

2. 3T3-L1 지방전구세포의 분화유도 및 물질처리

3T3-L1 지방전구세포가 6 well plate에서 100% confluent해지면 2일 간 더 배양한 후에 10% fetal bovine serum(FBS), 1 μ M dexamethasone, 1 μ g/ml 인슐린, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)가 함유된 DMEM(분화배지)로 교환하여 2일간 배양하였다. 그 후 1 μ g/ml 인슐린이 포함된 분화배지로 교환하여 2일간 배양하면서 지방세포 분화를 유도하였다. 실험물질인 resveratrol(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 및 epigallocatechin gallate(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)는 2일마다 지방세포 분화 유도 기간 동안 배양액에 처리하였다. 각 실험물질은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 0.2 μ m 필터를 이용하여 통과시킨 후에 사용하였다.

3. Oil red O 염색 및 정량

지방세포 내 지방 축적량을 확인하기 위해 Oil Red O 염색을 실시하였다. 분화시작일로부터 10일째 되던 날 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후, 상온에서 10% 포르말린으로 1시간 동안 세포를 고정하고, Oil red O 용액(0.5 g oil red O/100 ml isopropanol)을 가하여 30분간 염색시킨 후 3차 증류수로 3~4회 세척한 후 현미경(Olympus Corporation, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포내 지방을 관찰하였다. 100% isopropanol을 이용하여 지방구를 녹인 후 FLUOstar OPTIMA-microplate reader (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포독성 평가(LDH 유리능 측정)

젯산탈수소효소(LDH) 유리능은 세포막 손상에 따라 배지로 유출된 LDH량을 측정하여 세포독성을 확인하는 방법으로 colorimetric cytotoxicity assay kit(Promega, CA, USA)를 이용하였다. 3T3-L1 지방전구세포주를 각각 5×10⁴ cells/ml가 되도록 24 well plate에 분주하고, 다양한 농도의 실험물질(RVT와 EGCG)을 처리하면서 배양하였다. 48시간 배양 후, 모든 세포 배양상층액(culture supernatants)을 취하여 실험시까지 냉장보관하였다. 세포 용해물(lysates)과 각 well에서 얻은 배양상층액에서 LDH 유리능을 측정하였다. LDH 유리능은 다음의 공식에 의해 계산하였다.

% LDH release = 배양상층액의 LDH 농도 / (배양상층액의

LDH 농도+세포용해물의 LDH농도) × 100

5. 아디포카인 분비량 측정

실험물질을 처리하면서 분화시킨 3T3-L1 세포의 마지막 48시간 동안 배양한 세포배양액을 이용하여 아디포카인의 일종인 렙틴과 아디포넥틴 단백질 농도를 각각 mouse leptin immunoassay kit(R&D Systems, Inc. Oxon, UK)와 mouse adiponectin/Acrp30 immunoassay kit(R&D Systems, Inc.)를 이용하여 측정하였다. 즉, 50 μ l의 세포배양액을 렙틴과 아디포넥틴 항체가 코팅된 96 well plate에 넣어 준 후, 항체와 반응된 항원의 값을 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. RNA 분리 및 확인

지방세포 분화유도 기간 동안 실험물질을 처리한 3T3-L1 세포에 1 ml Trizol reagent를 넣고 균질화한 다음, 실온에서 5분간 방치한 후 12,000×g(4°C)에서 10분간 원심분리하였다. 상층액에 200 μ l chloroform을 가하여 3분간 반응시킨 후, 원심분리하였다(12,000 ×g, 15분, 4°C). 상층액에 0.5 ml isoamylalcohol을 가한 후 15분간 상온에서 방치하여 RNA를 침전시킨 후, 75% ethanol을 사용하여 RNA를 세척하고, 자연건조시켰다. RNase free water인 0.1% DEPC에 RNA를 녹인 후 spectrophotometer(260/ 280 nm)를 이용하여 정량하고, 1 μ g의 RNA를 1% agarose gel에 올린 후 전기영동하여 RNA의 degradation 상태를 확인한 후, 분석에 사용할 때 까지 -80°C에 보관하였다.

7. Real-time PCR(Quantitative assay)

1 μ g RNA을 SuperscriptTM III kit(Invitrogen)를 이용하여 cDNA로 합성하였고, Real-time PCR을 실시하여, 특정 유전자 발현량을 측정하였다. 합성된 cDNA 시료 1 μ g에 각각 유전자의 특이적 primer와 LightCycler DNA Master SYBR Green I 상

업용 kit(Roche molecular biochemical, UK)를 첨가하고, Lightcycler Real-time PCR 기기(Roche molecular biochemical, UK)를 이용하여 증폭시킨 후 정량 software를 사용하여 분석하였다. PCR 조건은 95°C 10분, 40cycle의 [95°C(10초), 55°C(5초), 72°C(30초)], 72°C 10분이었다. Real time PCR을 통해 증폭된 산물은 comparative cycle threshold(Ct)법을 이용하여 정량하였으며, 각 시료는 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 internal control로 사용하여 보정하였다. PCR을 위해 사용된 각 유전자의 primer는 Table 1에 제시되었다.

8. 통계 분석

모든 자료의 통계분석은 SPSS 12.0(Chicago, IL, USA)을 사용하여 실시하여 평균 및 표준편차를 구하였다. 분석수치는 mean±SEM으로 표시하였고, 실험군 간의 유의적인 차이는 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA) 및 Duncan's multiple range test를 사용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 지방구 생성에 미치는 영향

RVT와 EGCG는 각각 지방세포 분화 억제 효과가 알려졌지만, 이 두 화합물의 혼합(combination) 시 지방세포 분화 및 지방 축적 억제능의 상승효과(synergy effect)에 대한 연구는 진행된 바가 없다. 따라서, 본 연구는 지방세포에 RVT와 EGCG를 함께 혼합 처리했을 때 지방세포 분화 및 지방 축적 억제 효과가 각 혼합물을 단독처리 했을 시보다 더 상승되는 지에 대해 알아보려고 하였다.

RVT과 EGCG 혼합 처리시 지방 축적 억제 효과를 측정된 실험 결과는 Fig. 1A, B에 제시되었다. 두 화합물의 혼합에 따른 지방 축적 억제 동반 상승 효과를 관찰하기 위하여, 각 화합물의 농도는 선행연구자들(Wu 등 2005; Moon 등 2007; Park 등 2008; Rayalam 등 2008)이 보고한 것을 참고로 3T3-L1 cell에 세포독성이 없으면서, 각 화합물의 지방 축적 억제능이 관찰된 최소 농도(RVT 25 μ M 및 EGCG 50 μ M)와 이 농도보다 낮은 농도(RVT 6.25 μ M 및 EGCG 12.5 μ M)를 선택하여 실험에 사용하였다. RVT는 3T3-L1세포에 25~200 μ M 농도로 처리시 농도의존적으로 지방세포 분화를 억제하며, 이 농도 이하의 RVT는 지방세포 분화 억제 효과를 보이지 않았다(Park 등 2008; Rayalam 등 2008). EGCG는 3T3-L1 세포에 50~100 μ M로 처리시 농도의존적으로 지방세포 분화를 억제하였고, 10 μ M 농도에서는 지방세포 분화효과가 없었으며, 100 μ M 이상의 농도에서는 아포토시스가 유도되었다(Wu 등 2005; Moon 등 2007). 이와 같은 결과는 두 화합물(RVT 및 EGCG)의 세포

Table 1. DNA sequence of primers used in real-time PCR

Gene	PCR	Primer sequences	Product size (bps)
C/EBP α	Sense	ACTCCTCCTTTTCCTACCG	79
	Antisense	AGGAAGCAGGAATCCTCCAA	
PPAR γ 2	Sense	CATCCAAGACAACCTGCTGC	122
	Antisense	TGTGACGATCTGCCTGAGGT	
aP2	Sense	AGCATCATAACCTTAGATGG	128
	Antisense	GAAGTCACGCCTTTCATAAC	
GAPDH	Sense	GGAGATTGTTGCCATCAACG	85
	Antisense	TTTGCCGTGAGTGGAGTCAT	

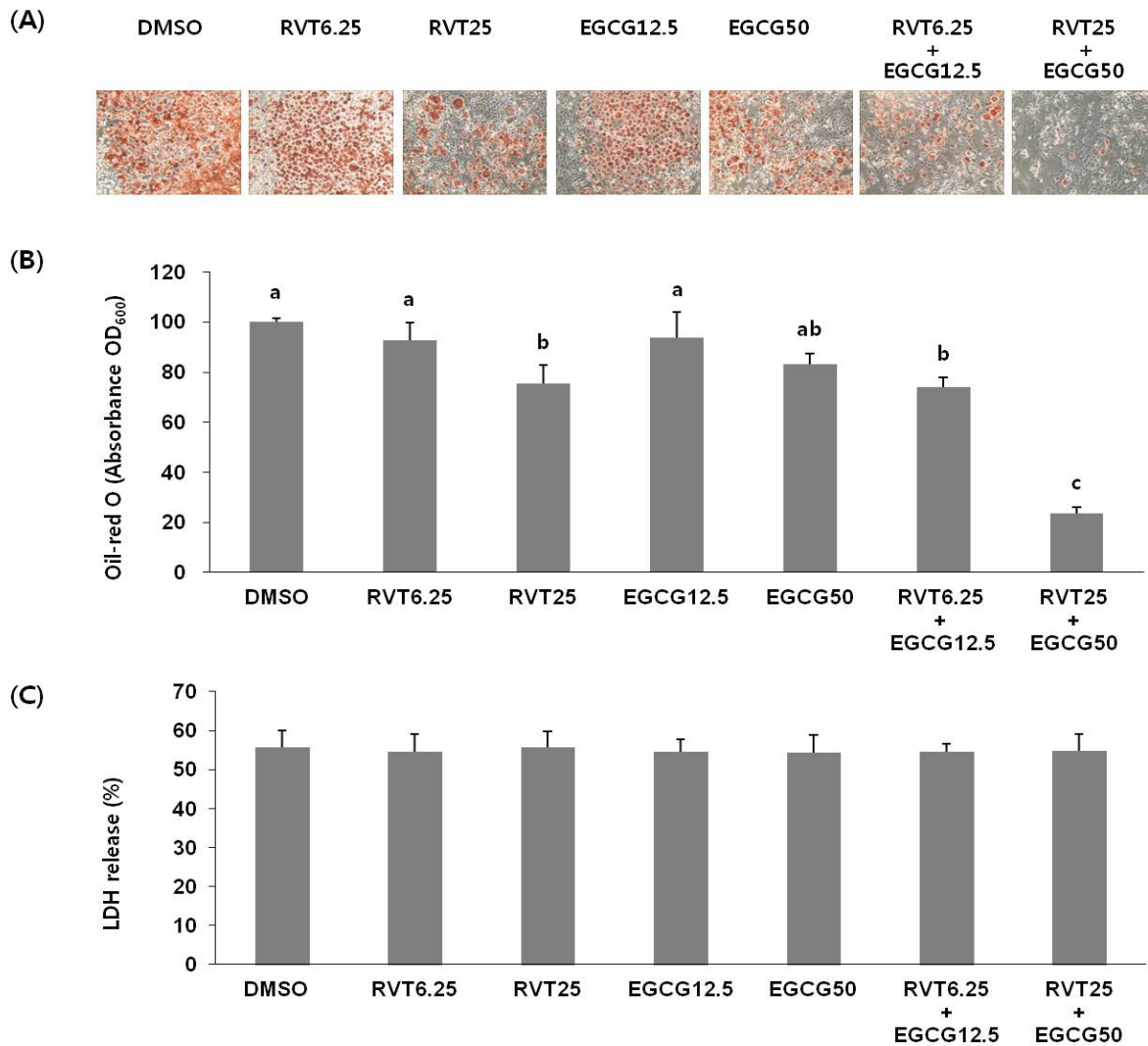


Fig. 1. Effect of RVT and EGCG on adipocyte morphology, and lipid accumulation. (A) Ten days after the initiation of differentiation, visualization of lipid accumulation by oil red O staining and high magnification (200×) of cells was conducted. (B) Cells were harvested and the lipid accumulation was measured through a spectrophotometer. (C) Cytotoxicity was expressed as % LDH release. The values shown represent the mean±SEM of triplicate determinations from three independent wells. Values with different superscript letters are significantly different at $p < .05$ by ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

처리 농도를 설정하기 위한 예비실험에서도 동일하게 나타났기 때문에(data not shown), 두 화합물의 혼합 효과를 관찰하기 위해 각 화합물의 지방세포 분화 억제 효과를 나타내는 최소농도와 각 화합물의 단독 처리시에는 지방세포 분화 억제 효과를 나타내지 않는 저농도를 선택하여 실험에 사용하였다.

3T3-L1 세포에 각 화합물을 위에 제시된 농도로 각각 단독 처리한 결과, RVT 25 μ M을 처리한 경우에서만 지방 축적 억제 효과(24.4% 감소, $p < 0.05$)가 관찰되었다. 하지만, RVT 25 μ M과 EGCG 50 μ M를 혼합 처리하였을 경우, 대조군에 비해

지방 축적이 76.6% 감소되었다. 이는, RVT25 세포군사용(24.4% 감소)과 EGCG50 세포군사용(16.7% 감소)의 지방 축적 감소 효과를 수치적으로 합산한 41.1%(24.4+16.7%) 감소 효과보다 1.9배 높은 것으로, 이 두 화합물 혼합 시 지방 축적 억제에 대한 동반 상승 효과가 있는 것으로 사료된다. 한편, RVT와 EGCG는 본 실험에 사용된 농도 하에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1C).

2. 렙틴 및 아디포넥틴 분비능에 미치는 영향

본 연구에서는 RVT 및 EGCG가 지방세포 분화과정에서

렙틴과 아디포넥틴 분비에 미치는 영향을 조사하였으며, 대조군에 대한 비율로 나타냈고, 그 결과는 Fig. 2, 3과 같다. RVT는 6.25 μM 및 25 μM 농도에서 렙틴의 감소효과가 나타나지 않았으며, EGCG는 50 μM 농도에서 23% 유의적으로 감소효과가 나타났다. 반면, RVT 6.25 μM 과 EGCG 12.5 μM 를 혼합하거나 RVT 25 μM 과 EGCG 50 μM 를 혼합 처리하였을 경우, 렙틴 농도는 대조군에 비해 각각 48%, 75% 유의적으로 감소하였다. 한편, 아디포넥틴 농도의 경우 RVT와 EGCG를 각각 처리하였을 때는 변화가 없었으나, RVT 6.25 μM 과 EGCG 12.5 μM 를 혼합하거나 RVT 25 μM 과 EGCG 50 μM 를 혼합 처리하였을 경우에는 대조군에 비해 각각 49%, 78% 유의적으로 증가하였다. 따라서, RVT와 EGCG를 혼합하여 처리할 경우 지방세포에서 분비되는 렙틴 및 아디포넥틴 조절에 시너지 효과를 일으키는 것으로 사료된다.

지방조직은 사이토카인, 케모카인, 호르몬 유사 인자 등을 포함한 수 백 가지 종류의 아디포카인을 분비함으로써 식욕, 당대사 조절, 혈압 및 면역 기능을 조절하는 내분비기관으로 인식되고 있다(Wozniak 등 2009). 이 중 비만 및 대사증후군과 관련하여 에너지대사를 조절하는 대표적인 아디포카인으로 렙틴(leptin)과 아디포넥틴(adiponectin)이 알려져 있다. 장기간 고지방 식이를 섭취했을 경우 내장지방조직 증가로 인해 렙틴이 많이 만들어지기 때문에 혈액 내 렙틴 농도가 높게 나타난다(Cottrell & Mercer 2012). 렙틴은 뇌하수체에 있는 렙틴 수용체와 결합하여 식욕을 감소시킴으로써 에너지 저장고 역할을 하는 말초조직에서 뇌로 신호를 전달하여 에너지 항상성 및 당대사, 면역조절 기능 등을 조절한다(Ahima & Flier 2000; Zhang & Chen 2008). 그리고, 식욕을 증가시키고 에너지 대사를 감소시키는 신경전달물질인 뉴로펩타이드 Y(neuropeptide Y)와 상호작용을 한다(Alegre Vde 등 2010). 또한, 고렙틴혈증(hyperleptinemia)은 심혈관 질환을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Karbowska & Kochan 2012).

아디포넥틴의 혈중 농도는 비만 및 대사증후군 환자에서 정상인에 비해 낮으며, 내장지방량 축적과 음의 상관관계를 나타낸다(Arita 등 1999). 저아디포넥틴혈증(hypo adiponectinaemia)은 동맥경화증 및 제2형 당뇨병을 일으킨다고 알려져 있다(Bastard 등 2006). 특히, 일본인을 대상으로 한 실험결과에서 혈중 아디포넥틴 농도가 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 이하일 때 체내 지방량 증가 및 고지혈증, 고혈압 등의 대사증후군이 많이 나타났다(Pyrzak 등 2010). 이와 반대로, 혈중에 아디포넥틴 농도가 높으면 고지혈증 및 당뇨, 염증을 감소시키는 효과가 있어서 대사증후군을 진단하는 마커로 사용되기도 한다(Trujillo & Scherer 2005). 한편, 최근 식이성 비만 마우스 모델을 대상으로 한 연구에서 RVT가 갈라닌 조절 지방세포 분화 신호전달체계(galanin-mediated adipogenesis signaling cascade)를 조절함으로써 내장지방조직

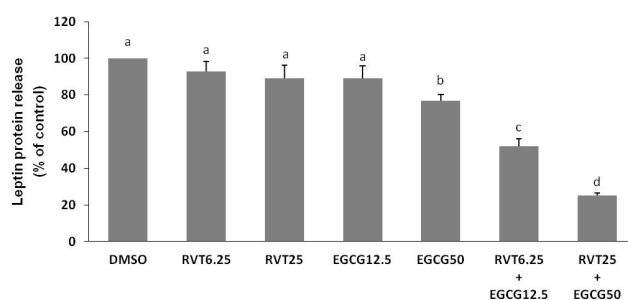


Fig. 2. Effects of RVT and EGCG on leptin release in 3T3-L1 adipocytes. After treatment of various doses of RVT and EGCG for 24 hr, leptin level in the culture supernatant was measured using mouse leptin immunoassay kit. Values are expressed as mean \pm SEM (n=3). Values with different superscript letters are significantly different at $p<.05$ by ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

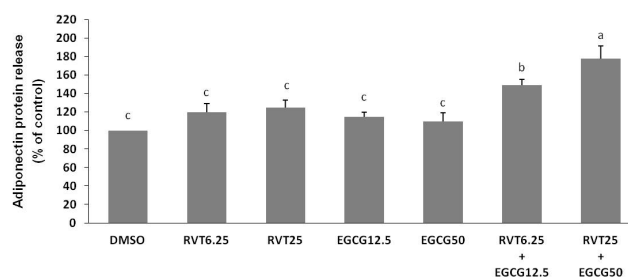


Fig. 3. Effects of RVT and EGCG on adiponectin release in 3T3-L1 adipocytes. After treatment of various doses of RVT and EGCG for 24 hr, adiponectin level in the culture supernatant was measured using mouse adiponectin/Acrp30 immunoassay kit. Values are expressed as mean \pm SEM (n=3). Values with different superscript letters are significantly different at $p<.05$ by ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

의 지방세포 분화를 억제시켰다(Kim 등 2011). 따라서, 본 연구에서 RVT와 EGCG의 혼합 사용이 지방세포 분화를 억제하고, 이로 인해 내장지방량 축적의 대표적 진단 마커인 렙틴과 아디포넥틴의 분비량에 영향을 미쳤을 것으로 예상된다.

3. 지방세포 분화 관련 유전자의 mRNA 발현 비교

시료의 지방세포에 대한 분화 억제능을 측정하기 위해 지방세포 분화(adipogenesis) 관련 유전자의 mRNA 발현량을 조사하였고, 결과는 Fig. 4와 같다. C/EBP α 유전자의 발현을 측정한 결과, RVT 6.25 μM 과 EGCG 12.5 μM 를 혼합하거나 RVT 25 μM 과 EGCG 50 μM 를 혼합하여 처리하였을 경우만 대조군에 비해 각각 25%, 45% 유의적으로 감소하였다. 반

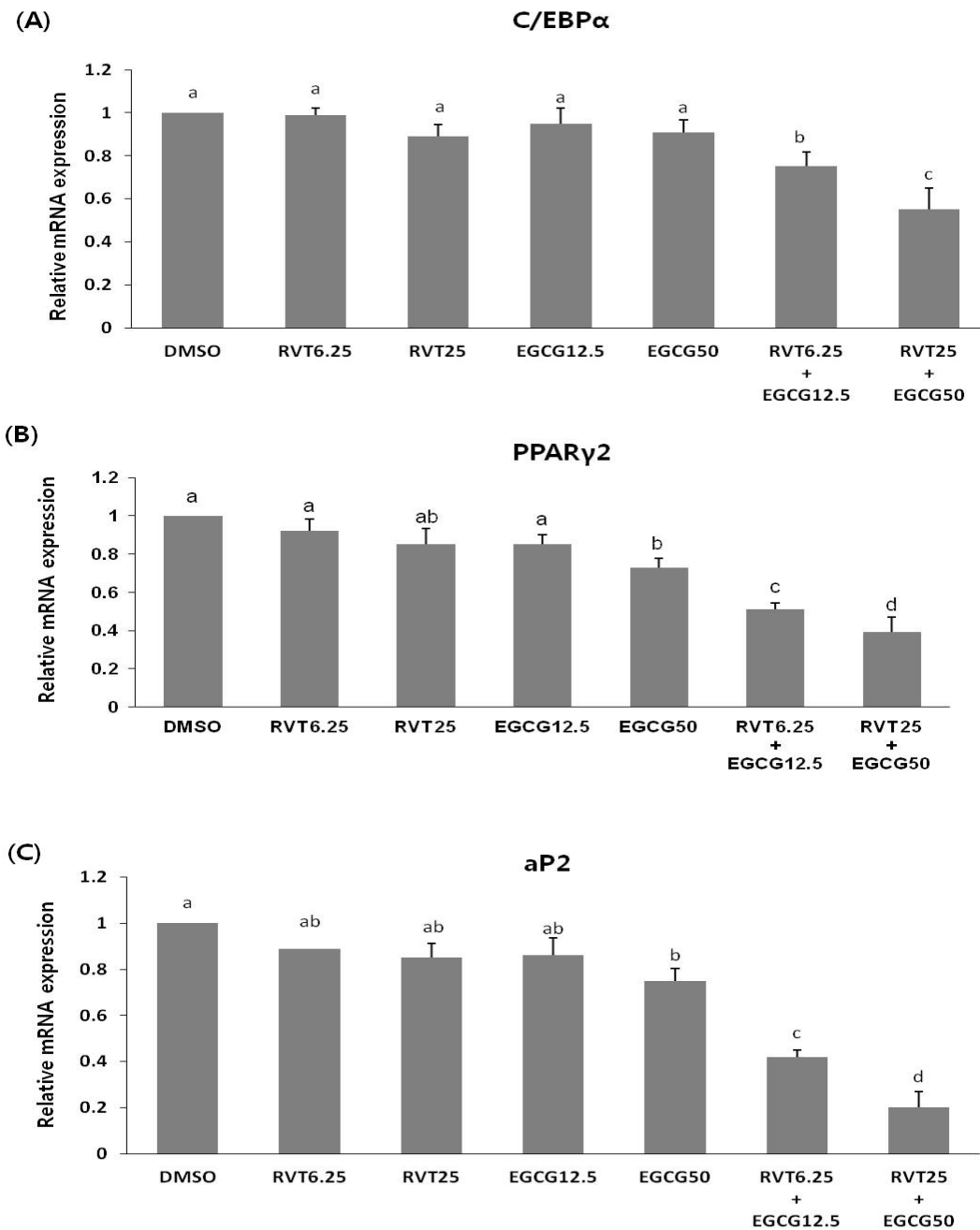


Fig. 4. Effects of RVT and EGCG on gene expressions of C/EBP α , PPAR γ 2, and aP2 in 3T3-L1 adipocytes. The amount of mRNA was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SEM (n=3). Values with different superscript letters are significantly different at $p < .05$ by ANOVA followed by Duncan's multiple range test.

면, PPAR γ 2 유전자의 발현을 측정된 결과, EGCG는 50 μ M 농도에서 27% 유의적으로 감소효과가 나타났으며, RVT 6.25 μ M과 EGCG 12.5 μ M를 혼합하거나 RVT 25 μ M과 EGCG 50 μ M를 혼합 처리하였을 경우, 대조군에 비해 각각 49%, 61% 유의적으로 감소하였다. 한편, aP2 유전자의 발현을 측정된 결과, EGCG는 50 μ M 농도에서 25% 유의적으로 감소효과가

나타났으며, RVT 6.25 μ M과 EGCG 12.5 μ M를 혼합하거나 RVT 25 μ M과 EGCG 50 μ M를 혼합 처리하였을 경우, 대조군에 비해 각각 58%, 80% 유의적으로 감소하였다.

지방세포 분화란 지방전구세포에서 지방세포로 분화하는 과정으로서, 여러 가지 종류의 지방세포 분화 관련 전사인자들(adipogenic transcription factor)이 관여하게 된다(Tang &

Lane 2012). 특히, 지방전구세포에 분화유도물질을 처리하면 C/EBP β 및 C/EBP δ 의 발현이 분화 초기에 증가하는 반면, C/EBP α 및 PPAR γ 는 분화 후기에 발현이 촉진되어 지방세포가 분화를 일으키게 된다(Tang & Lane 2012). 이렇게 분화된 세포는 중성지방 축적으로 인한 세포의 크기 증가와 같은 형태학적 특징을 나타내며, aP2와 같은 지방세포 특이적 유전자의 발현을 증가시킴으로써 지방세포의 특징을 가진다(Tang & Lane 2012). 따라서 본 연구에서는 분화유도인자인 인슐린, dexamethasone 및 IBMX를 처리하여 분화를 유발하였을 경우, C/EBP α , PPAR γ 2 및 aP2의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 나타났으며, 이러한 분화유도 과정에서 RVT 및 EGCG를 각각 따로 처리하였을 경우 C/EBP α , PPAR γ 2 및 aP2의 발현에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 그러나, RVT와 EGCG를 혼합하여 처리한 경우에는 C/EBP α , PPAR γ 2 및 aP2의 mRNA 발현이 현저하게 감소하였음을 확인하였다. 이상의 결과를 살펴볼 때 3T3-L1 지방전구세포에서 RVT와 EGCG의 혼합 처리는 전사인자인 C/EBP α , PPAR γ 2 및 aP2의 발현을 억제함으로써 중성지방 축적을 감소시킴으로써 지방세포로의 분화를 억제시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요약 및 결론

최근 비만 및 대사증후군이 급격히 증가함에 따라 식음식을 비롯한 다양한 기능성 소재 탐색에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 항비만 소재로 알려진 RVT와 EGCG 각각의 효과보다 혼합하였을 경우의 시너지 효과를 알아보고자 하였다. 3T3-L1 지방세포에 RVT와 EGCG를 처리했을 때 세포독성은 나타나지 않았고, 지방세포 내 지방구 함량은 유의적으로 감소하였다. 그리고, 3T3-L1 지방세포에 RVT 6.25 μ M과 EGCG 12.5 μ M를 혼합하거나 RVT 25 μ M과 EGCG 50 μ M를 혼합하여 처리하였을 경우, 렙틴 농도는 유의적으로 감소하였고, 아디포넥틴 농도는 유의적으로 증가하였다. 또한, 지방세포 분화 관련 유전자인 C/EBP α , PPAR γ 2 및 aP2 유전자의 발현을 측정된 결과, RVT 6.25 μ M과 EGCG 12.5 μ M를 혼합하거나, RVT 25 μ M과 EGCG 50 μ M를 혼합하여 처리하였을 경우에 모두 유의적으로 감소하였다. 결론적으로 RVT와 EGCG가 각각 처리하였을 때보다 혼합하여 처리하였을 때 시너지 효과로 인해 C/EBP α , PPAR γ 2 및 aP2 mRNA 발현을 감소시켜 지방세포 분화를 억제함으로써 항비만 효과를 나타냄을 보여주고 있다.

참고문헌

Ahima RS, Flier JS. 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62:413-437

- Alegre VdeS, Barone JM, Yamasaki SC, Zambotti-Villela L, Silveira PF. 2010. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. *Toxicon* 56: 402-410
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17:4-12
- Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. 2008. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 138:1677-1683
- Cottrell EC, Mercer JG. 2012. Leptin receptors. *Handb Exp Pharmacol* 209:3-21
- Gustafson B, Jack MM, Cushman SW, Smith U. 2005. Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun* 308:933-939
- Jang GH, Ahn BY, Kwon YJ, Choi DS. 2001. Antimutagenic effect of Resveratrol on Trp P-1 in *Salmonella typhimurium* TA98. *Korean J Food & Nutr* 14:329-332
- Karbowska J, Kochan Z. 2012. Leptin as a mediator between obesity and cardiac dysfunction. *Postepy Hig Med Dosw* 66:267-274
- Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. 2011. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol* 81:1343-1351
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx, J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-1122
- Lai CY, Yang JY, Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S, Lewis RD, Hamrick MW, Hartzell DL, Baile CA. 2011. Preventing bone loss and weight gain with combinations of vitamin D

- and phytochemicals. *J Med Food* 14:1352-1362
- Langin D, Holm C, Lafontan M. 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc Nutr Soc* 55:93-109
- Lasa A, Miranda J, Churruga I, Simón E, Arias N, Milagro F, Martínez JA, Portillo MP. 2011. The combination of resveratrol and CLA does not increase the delipidating effect of each molecule in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Hosp* 26:997-1003
- Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obes Res* 13:982-990
- Masuno H, Okuda H. 1995. Glycosylation and secretion of lipoprotein lipase by 3T3-L1 adipocytes: effects of brefeldin A. *J Atheroscler Thromb* 2:46-52
- MHWFA & KCDC (Ministry for Health, Welfare and Family Affairs & Korea Centers for Disease Control and Prevention). 2010. Korea Health Statistics 2009: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV-3). pp.48-49
- Moon HS, Chung CS, Lee HG, Kim TG, Choi YJ, Cho CS. 2007. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring)* 15:2571-2582
- Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Islam AH, Keno Y, Kobatake T, Nagai Y, et al. 1994. Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis* 107:239-246
- Park HJ, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Baile CA. 2008. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 11:773-783
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. 2006. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 40:1054-1065
- Pyrzak B, Ruminska M, Popko K, Demkow U. 2010. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome in children and adolescents. *Eur J Med Res* 15(Suppl 2):147-151
- Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. 2011. Synergism between resveratrol and other phytochemicals: implications for obesity and osteoporosis. *Mol Nutr Food Res* 55:1177-1185
- Rayalam S, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Baile CA. 2008. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 22:1367-1371
- Son GM, Bae SM, Chung JY, Shin DJ, Sung TS. 2005. Antioxidative effect on the green tea and puer tea extracts. *Korean J Food & Nutr* 18:219-224
- Surh YJ. 2002. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol* 40:1091-1097
- Tang QQ, Lane MD. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81:715-736
- Trujillo ME, Scherer PE. 2005. Adiponectin—journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 257:167-175
- Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. 2009. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 54:1847-1856
- Wu BT, Hung PF, Chen HC, Huang RN, Chang HH, Kao YH. 2005. The apoptotic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the Cdk2 pathway. *J Agric Food Chem* 53:5695-5701
- Zhang F, Chen J. 2008. Leptin protects hippocampal CA1 neurons against ischemic injury. *J Neurochem* 107:578-587

접 수 : 2012년 10월 12일
 최종수정 : 2012년 11월 13일
 채 택 : 2012년 11월 14일