

Adipogenesis관련 유전자발현감소와 Cell Cycle Arrest를 통한 EGCG와 Glucosamine-6-Phosphate의 Anti-Obesity 효과*

김꽃별¹ · 장성희^{2†}

서울의료원 의학연구소,¹ 소아청소년과²

Anti-obesity effect of EGCG and glucosamine-6-phosphate through decreased expression of genes related to adipogenesis and cell cycle arrest in 3T3-L1 adipocytes*

Kim, Kkot Byeol¹ · Jang, Seong hee^{2†}

¹Department of Medical Research Institute, ²Pediatrics, Seoul Medical Center, Seoul 131-865, Korea

ABSTRACT

Purpose: Several studies have proven that EGCG, the primary green tea catechin, and glucosamine-6-phosphate (PGlc) reduce triglyceride contents in 3T3-L1 adipocytes. The objective of this study is to evaluate the combination effect of EGCG and PGlc on decline of accumulated fat in differentiated 3T3-L1 adipocytes. **Methods:** EGCG and PGlc were administered for 6 day for differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Cell viability was measured using the CCK assay kit. In addition, TG accumulation in culture 3T3-L1 adipocytes was investigated by Oil Red O staining. We examined the expression level of several genes and proteins associated with adipogenesis and lipolysis using real-time RT-PCR and Western blot analysis. A flow cytometer Calibar was used to assess the effect of EGCG and PGlc on cell-cycle progression of differentiating 3T3-L1 cells. **Results:** Intracellular lipid accumulation was significantly decreased by combination treatment with EGCG 60 μ M and PGlc 200 μ g/m compared with control and EGCG treatment alone. In addition, use of combination treatment resulted in directly decreased expression of PPAR γ , C/EBP α , and SREBP1. In addition, it inhibited adipocyte differentiation and adipogenesis through downstream regulation of adipogenic target genes such as FAS, ACSL1, and LPL, and the inhibitory action of EGCG and PGlc was found to inhibit the mitotic clonal expansion (MCE) process as evidenced by impaired cell cycle entry into S phase and the S to G2/M phase transition of confluent cells and levels of cell cycle regulating proteins such as cyclin A and CDK2. **Conclusion:** Combination treatment of EGCG and PGlc inhibited adipocyte differentiation through decreased expression of genes related to adipogenesis and adipogenic and cell cycle arrest in early stage of adipocyte differentiation.

KEY WORDS: 3T3-L1, EGCG, glucosamine-6-phosphate, adipogenesis, cell cycle arrest.

서론

비만은 가장 심각한 사회경제적인 건강 문제 중 하나로써 널리 인식되어져왔다. 비만은 체지방세포에 지방의 과도한 축적으로 인한 것으로 그 심각성의 정도는 제 2형 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환 등 비만과 연관된 질병의 위험도를 크게 증가

시킨다.^{1,2} 이러한 비만의 예방 및 치료를 위한 항비만 전략은 크게 4가지 카테고리로 구분되어 질 수 있다. 음식 섭취의 감소, 영양소 흡수의 억제, thermogenesis 증가, 지방 또는 단백질 대사 또는 각 각의 저장에 대한 조절 등이 그것이다.³ 전 지방세포 분화의 감소, lipogenesis 감소, lipolysis 증가와 지방세포의 apoptosis 유도⁴⁻⁷ 등은 항비만 전략들 중 지방 저장의 조절에 대한 카테고리에 들어가는 것 중 하나이다.

Received: Nov 18, 2013 / Revised: Dec 5, 2013 / Accepted: Jan 6, 2014

*This 2011 study was supported by grants from the Seoul Medical Center, Research Institute.

[†]To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-2276-7453, e-mail: shch78@hotmail.com

© 2014 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.

지방세포는 중성지방 저장과 유리지방산의 방출에 의해 지질대사의 항상성과 에너지 균형을 조절하는 중요한 역할을 하며, 지방세포 분화와 지방축적의 양은 비만의 발생과 발전에 연관되어있다.^{8,9} 이러한 이유들로 3T3-L1 지방세포를 통해 비만 관련 연구들이 많이 진행되어왔다. 3T3-L1 지방세포는 cell culture를 통해서 preadipocyte에서 mature adipocyte로 분화가 유도되며 이 과정을 adipogenesis라고 한다.¹⁰ Preadipocyte는 postconfluent 상태에서 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, 고농도 insulin (MDI differentiation medium)로 자극하면 cell-cell contact에 의해 성장 억제가 되었던 세포가 다시 증식을 시작한다.¹¹ 이를 mitotic clonal expansion (MCE)이라고 하는데, 이 MCE과정은 adipogenesis 유전자 발현 과정을 위한 DNA의 remodeling 과정이라 하고,¹² 이 과정에 이상이 생긴다면 정상적인 adipogenesis가 이루어질 수 없다.

천연물로부터 얻어진 성분을 이용하여 지방생성을 억제하는 것은 부작용을 줄이며 비만을 예방하는데 유용할 것이다.¹³ 그동안 많은 연구들에서 비만치료 또는 체중조절을 위한 건강기능성 성분을 찾기 위한 연구가 이루어져왔으며 천연식품 등에서 유래된 많은 성분들이 밝혀졌다.

녹차는 많은 질병을 예방하여 건강을 향상시키는 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있어 세계적으로 널리 음용되고 있으며, 섭취가 간편하며 섭취에 제한이 따르지 않아 오래전부터 습관처럼 일상의 음용수로 음용되어 왔다.¹⁴⁻¹⁶ 녹차는 항산화작용, 항암작용, 항염작용, 혈청콜레스테롤농도 저하기능 등에 효과가 있는 것으로 보고되어있으며 체중 조절과 에너지 소비에도 영향을 미친다고 보고된 바도 있다.¹⁷⁻²⁰ 녹차 내 GC (galocatechin), EC (epicatechin), EGC (epigallocatechin), ECG (epicatechingallate), EGCG (epigallocatechin-3-gallate)의 카테킨 (catechin)성분 중 특히 EGCG는 역학적, 임상적 연구조사에서 비만과 당뇨병에 효과가 있다는 보고가 있으며, 지방세포와 비만동물모델에서 항비만 효과를 실험한 결과에서도 지방세포의 분화와 증식에 영향을 미치며 비만동물에서는 지방합성, 지방량, 체중, 혈청 지질, 포도당, 인슐린, 렙틴 함량 감소와 지방산 산화와 체내 열 생성 증가를 보고하고 있다.²¹⁻²⁵

글루코사민은 관절염 치료제 혹은 관절염 예방제로 널리 알려져 있는 건강기능성 식품 성분으로 허브, 칼슘, 비타민 등과 함께 우리나라의 건강기능식품시장에서 선호되는 건강 기능성식품 중 하나이다.²⁶ 글루코사민은 바다의 무척추동물의 외골격에서 발견된 biopolymer인 키틴으로부터 분리할 수 있으며, Glucosamine hydrochloride, sulfated glucosamine, Phosphorylated glucosamine, N-acetyl-glucosamins과 같은 글

루코사민 유도체가 존재하며, 관절염치료제로서의 고유의 효과 뿐 아니라 새로운 기능성에 대한 연구도 보고되어있다.²⁷⁻²⁹

본 연구에서는 녹차와 글루코사민이 일상에서의 노출이 용이하고 섭취 빈도가 높다는 점에서 녹차의 카테킨 중 EGCG와 글루코사민유도체 중 시판되는 건강기능성 식품 제조에 많이 사용되는 형태인 Glucosamine 6-phosphat (PGIc)을 이용하여, 3T3-L1지방세포에서 두 가지 성분이 지방세포의 분화와 세포 내 지방 합성 및 분해 관련 인자들의 발현에 미치는 영향 뿐 아니라 cell cycle 차원에서의 접근을 통해 cell cycle arrest 유도와 그에 따른 분화 억제효과여부 등 ‘항비만 효과’를 확인하고자한다. 또한 두 성분을 병합하여 처리하였을 때 기대되어지는 항비만 효과에 대한 상승효과 (synergy effect)에 대해서도 확인하고자 한다.

연구방법

재 료

Mouse embryo 3T3-L1 전지방세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockvill, VA, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM)와 bovine calf serum (BCS), antibiotics는 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 지방세포에 처리할 Glucosamine 6-phosphate와 EGCG는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo molecular technologies Inc. (Gaithersburg, MS, USA)의 제품을 사용하였다. RNA 추출은 TRIzol (invitrogen, Groningen, Netherland)을, cDNA 합성 kit는 TaKaRa (Shuzo Shiga, Japan)의 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis 제품을 이용하였다. Real time RT PCR은 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany)의 Universal ProbeLibrary Probe와 LightCycler480 Probe Master를 이용하였으며, PPAR γ , cyclin A, CDK2와 β -actin antibody 는 cell signalling (Beverly, MA, USA)에서, bovine anti-rabbit IgG-HRP와 bovine anti-gaot IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. cell cycle 분석을 위해서는 Cycletest™ Plus-DNA Reagent Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 제품을 사용하였다.

3T3-L1지방세포주의 배양과 분화유도 및 처리

Mouse embryo 3T3-L1 전지방세포주는 10% BCS, 1% antibiotics이 첨가된 Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 1×10^5 cell/mL 농도로 부유시켜 48시간동안 배양하여 confluent 상태가 되게 37°C CO₂ incubator에서 배양

한다. 분화배지 (IBMX 0.5 mM, dexametasone 1 μ M, insulin 1.7 μ M, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic DMEM medium; MDI medium)로 교체하여 2일, insulin 1.7 μ M, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic DMEM medium (INS medium)을 이용하여 2일, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic DMEM medium으로 4일 동안 분화를 유도하였다. EGCG와 Glucosamine 6-phosphate는 농도별로 배지교체시기마다 함께 처리해주었다.

생존율 측정 (CCK-8 assay)

3T3-L1 전지방세포주를 1×10^4 cell/100 μ L로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후, EGCG와 Glucosamine 6-phosphate을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 Cell Counting kit-8 (CCK-8;-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(5-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetra-zolium salt)을 10 μ L 처리하여 1시간 배양 후, 450 nm에서 SUNRISE microplate reader (TECAN Austria GmbH, Austria)를 이용하여 측정한다.

Oil Red-O 염색

Oil Red O stock solution은 0.7 g Oil Red O (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)와 200 mL의 100% iso-propanol을 섞어 여과시킨 후, 4°C에서 보관하였다. Oil Red O working solution은 4°C에서 보관된 Oil Red O stock solution과 멸균증류수를 6 : 4로 섞어 여과시킨 후 사용하였다. Dish 내의 배지를 제거한 뒤 PSB로 세정하고 10% formaldehyde 처리한 후 5분간 상온에서 방치하였다. Dish 내의 10% formaldehyde를 제거하고 새로운 10% formaldehyde를 넣은 상태에서 1시간 이상 상온에서 두었다. 다시 10% formaldehyde를 제거한 후, 60% iso-propanol로 세정하고 완전히 건조시킨다. 건조 후 dish에 Oil Red O working solution을 넣고 30분간 상온에서 incubation하였다. 30분 후 D.W로 3번 세정하고 dish를 관찰하면 지방덩어리들을 볼 수 있었다. 이때 현미경 관찰 후 이미지를 획득하고, 100% iso-propanol을 넣어 탈 염색하여 490 nm에서 SUNRISE microplate reader를 이용하여 측정한다.⁹

Real time-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assay

처리한 3T3-L1 세포에서 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출한다. 추출한 RNA를 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis kit를 이용하여 reverse transcription을 시켜 cDNA로 만들어 준다. 이렇게 합성된 cDNA는 희석하여주고, LightCycler480 Probe Master에 Table 1의 primer, Universal ProbeLibrary Probe와 함께 혼합하여 LightCycler480 Multiwell

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence
PPAR γ	Forward	5'-CAA GCC CTT TAC CAC AGT TGA-3'
	Reward	5'-CAG GTT CTA CTT TGA TCG CAC TT-3'
C/EBP α	Forward	5'-AAA CAA CGC AAC GTG GAG A-3'
	Reward	5'-GCG GTC ATT GTC ACT GGT C-3'
SREBP1	Forward	5'-AAC CAG AAG CTC AAG CAG GA-3'
	Reward	5'-TTT CAT GCC CTC CAT AGA CA-3'
Perilipin	Forward	5'-ACG AGG CTG AGA CTG AGG TG-3'
	Reward	5'-GAG CAC GTT CTC CTG CTC A-3'
FAS	Forward	5'-GCT GCT GTT GGA AGT CAG C-3'
	Reward	5'-AGT GTT CGT TCC TCG GCG TG-3'
LPL	Forward	5'-CAG AGT TTG ACC GCC TTC C-3'
	Reward	5'-AAT TTG CTT TCG ATG TCT GAG AA-3'
HSL	Forward	5'-TGC TCT TCT TCG AGG GTG AT-3'
	Reward	5'-GAT GGC AGG TGT GAA CTG G-3'
ACSL1	Forward	5'-AAA GAT GGC TGG TTA CAC ACG-3'
	Reward	5'-CGA TAA TCT TCA AGG TGC CAT T-3'
β -actin	Forward	5'-CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG-3'
	Reward	5'-ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA-3'

Plate에 분주하여 LightCycler480 (Roche Diagnostics Ltd. Rolkreuz, Switzerland) 장비를 이용하여 real time PCR 분석을 실시한다.

Western blot analysis

처리한 3T3-L1 세포에 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후 lysis buffer (100 mM Tris-HCL, 0.5% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM NaCl, 10 mM sodium fluoride, protease inhibitor cocktail)를 이용하여 cell pellet을 준비한다. 단백질 농도는 Bradford 방법 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 단백질을 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer를 한 뒤 5% (w/v) fat-free milk powder 혼합된 TBS-T로써 blocking을 실시한다. 1% (w/v) fat-free BSA가 혼합된 TBS-T에 희석시킨 primary antibody를 4°C에서 overnight 동안 반응시킨 후, HRP-conjugated secondary antibody를 상온에서 1시간 동안 처리하고, WEST-ZOL plus Western Blot Detection System (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)을 처리하여 반응을 시킨 뒤 결과를 확인한다.

유세포분석 (FACS)

3T3-L1세포를 fully confluent가 되도록 배양한 후, MDI로 교체하여 분화 유도를 시작한다. MDI로 교체를 이후 0, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 38, 48시간마다 세포를 수거하여 CycletestTM Plus-DNA Reagent Kit을 이용하여 propidium iodide (PI)로

염색한 후 유세포분석기 (FACS Calibar, BD Biosciences)를 이용하여 세포주기를 측정하였다. 이와 동일한 방법으로 EGCG와 Glucosamine 6-phosphate을 농도별로 단일 또는 병합하여 처리하고 18시간 후 세포주기를 측정하였다.²²

통계분석

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 16.0을 이용하여 분석하였다. T-test와 one-way ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였으며 모든 결과는 mean \pm SEM으로 표시하였다.

결 과

지방세포의 세포생존을 관찰

3T3-L1 preadipocyte에 EGCG와 Glucosamine 6-phosphate의 여러 농도로 처리하여 CCK-8 assay를 통해 48시간에서의 세포생존율을 측정하였다(Fig. 1). EGCG는 60 μ M 이상에서부터 유의적으로 감소하는 결과를 보였고 (60 μ M에서 18.2 \pm 4.2%, 80 μ M 25.9 \pm 5.3% 감소), Glucosamine 6-phosphate는 농도에 따른 세포생존율의 차이를 보이지 않았다 (data not shown).

지방세포 내 중성지방 축적 억제

Oil Red O staining을 통해 지방세포의 Lipid droplet을 확

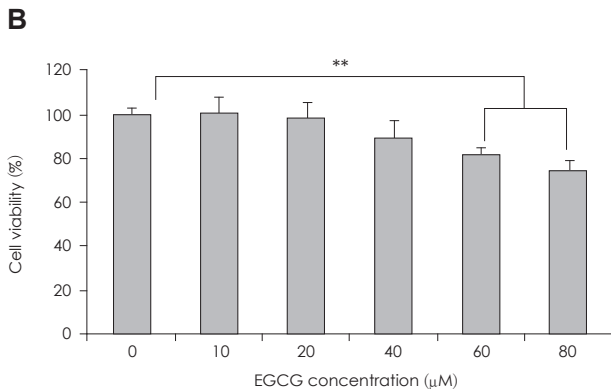
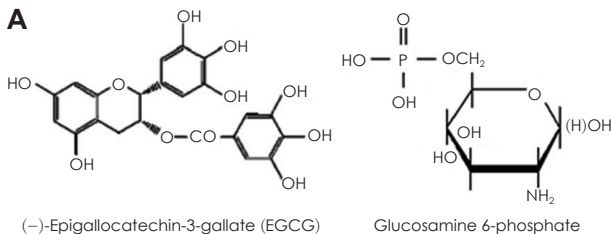


Fig. 1. A: Structure of EGCG and Glucosamine 6-phosphate. B: The change of cell viability in 3T3-L1 preadipocyte in condition of EGCG of serial concentrations. Value represent the mean \pm SEM. **: $p < 0.001$, vs. EGCG 0 μ M.

인하고, iso-propanol로 Oil Red O dye를 용출하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 2).

Oil Red O staining 결과에서 EGCG의 경우는 농도가 높아질수록 Lipid droplet이 감소됨을 확인할 수 있었다. 특히 EGCG 40 μ M에서 45.6 \pm 1.6% 감소, EGCG 60 μ M에서 67.3 \pm 3.2% 감소되어 아무것도 처리하지 않고 분화만 유도한 fully differentiation된 지방세포 (control)와 비교했을 때 통계적으로도 유의적으로 감소되었다. Glucosamine 6-phosphate를 처리한 경우 Lipid droplet은 control과 거의 비슷하였다 (Fig. 2B).

EGCG와 Glucosamine 6-phosphate을 병합하여 처리 결과를 보면 (Fig. 2C), EGCG는 60 μ M과 Glucosamine 6-phosphate 200 μ g/mL을 병합한 경우 control보다 75.8 \pm 0.9% 유의적으로 감소하였다. 또한 EGCG는 60 μ M만 단독으로 처리한 경우 (67.3 \pm 3.2% 감소)보다 약 8.5%정도 더 감소되었으며 통계적으로도 유의하게 지방축적 감소효과가 상승됨을 확인하였다.

Adipogenesis와 adipogenic 및 lipolytic gene의 mRNA 발현

지방세포 내 지방축적의 감소 결과를 보였던 EGCG 40 μ M, 60 μ M, glucosamine 6-phosphate 200 μ g/mL의 단독 또는 병합처리 시 adipogenesis 및 lipogenic, lipolytic 관련 유전자의 발현을 확인하였다.

Fully differentiation된 지방세포에서의 PPAR γ 와 C/EBP α , SREBP1 발현을 real time PCR과 western blot을 통해 분석하였다 (Fig. 3). Adipogenesis관련 유전자인 PPAR γ 와 C/EBP α , SREBP1의 mRNA level에서의 발현은 EGCG를 60 μ M로 단독처리 (PPAR γ 29.6 \pm 3.5%, C/EBP α 33.7 \pm 0.2%, SREBP1 36.4 \pm 0.2%감소)와 EGCG 60 μ M + Glucosamine 6-phosphate 200 μ g/mL로 병합처리 (PPAR γ 18.8 \pm 4.9%, C/EBP α 46.6 \pm 0.004%, SREBP1 50.8 \pm 0.001% 감소)에서 감소되었다. 비록 PPAR γ mRNA 발현은 EGCG를 단독처리에서 좀 더 높은 감소를 보였지만, Western blot을 통한 protein level에서의 PPAR γ 발현을 확인한 결과 (Fig. 3B)에서는 control과 비교하여 EGCG 60 μ M 단독처리에서 44.5% 감소, EGCG 60 μ M + Glucosamine 6-phosphate 200 μ g/mL 병합처리에서 52.9% 감소로 병합처리에서 더 높은 감소를 나타냈다.

EGCG 40 μ M의 경우에는 PPAR γ 와 C/EBP α , SREBP1의 mRNA level 발현이 증가하는 경향을 보이기도 하였으나, protein level에서의 PPAR γ 2 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 4의 A에서 adipogenic target 유전자인 FAS, ACSL1, LPL의 발현 역시 PPAR γ 와 C/EBP α , SREBP1과 비슷한

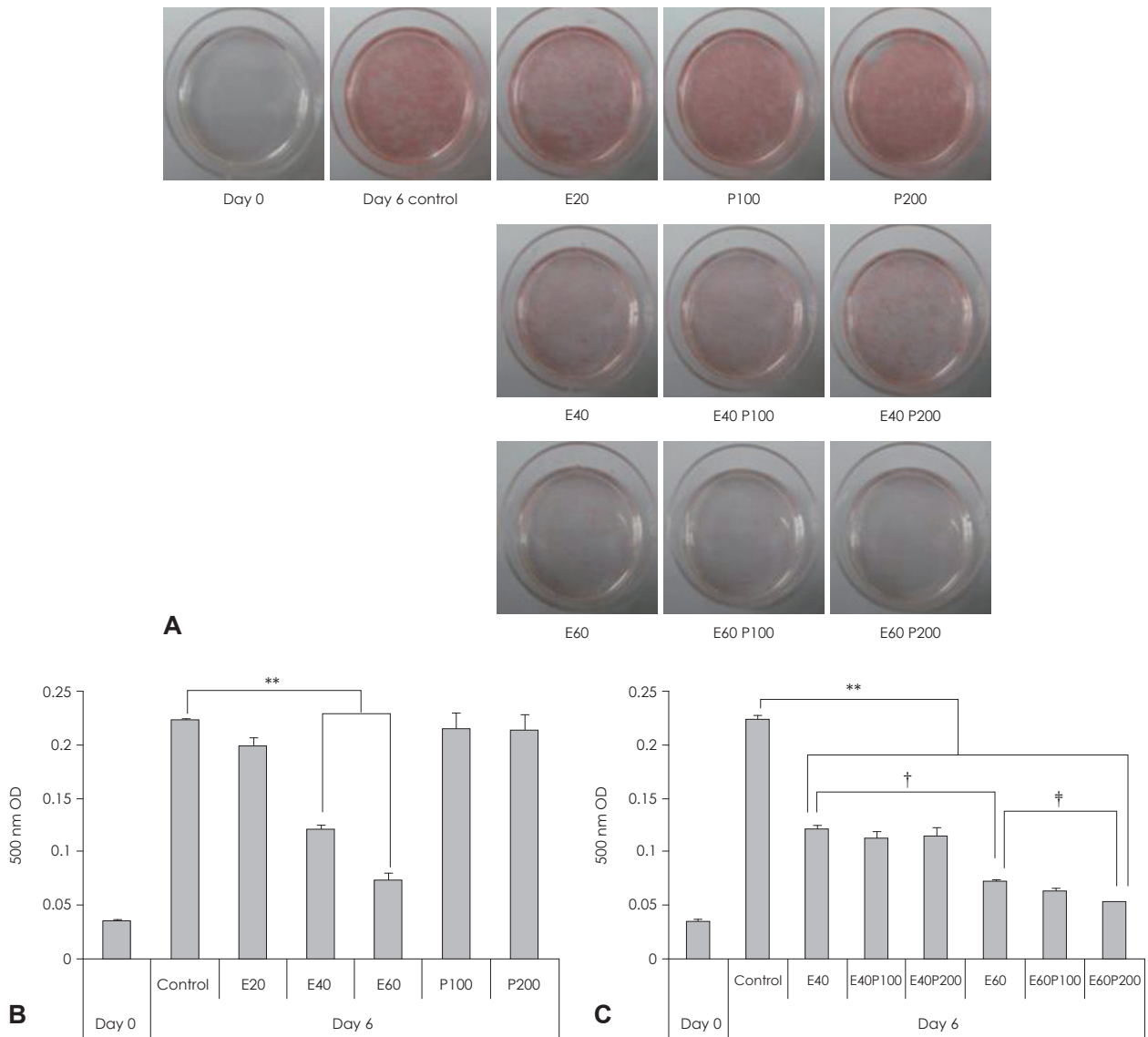


Fig. 2. Effect of EGCG & Glucosamine 6-phosphate on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. A: Cell were subjected to Oil Red O staining B, C: These cells were then subjected to quantitative analysis of interacellular lipid accumulation. Value represent the mean \pm SEM. **: $p < 0.001$, vs. control. † : $p < 0.05$, E40 vs. E60. ‡ : $p < 0.05$, E60 vs. E60P200. E: EGCG, P: Glucosamine 6-phosphate.

양상으로 EGCG 60 μ M 단독처리 (FAS $35.6 \pm 0.05\%$, ACSL1 $13.3 \pm 2.8\%$, LPL $47.2 \pm 11.6\%$ 감소) 및 EGCG 60 μ M + Glucosamine 6-phosphate 200 μ g/mL와의 병합처리 (FAS $42.2 \pm 1.1\%$, ACSL1 $11.1 \pm 3.4\%$, LPL $46.8 \pm 4.0\%$ 감소)에서 발현이 감소했다.

Fig. 3과 Fig. 4A에서 EGCG와 glucosamine 6-phosphate가 지질분해 (Lipolysis)에는 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. EGCG와 glucosamine 6-phosphate 처리에 따른 HSL의 발현은 control에서의 발현과 비슷하거나 증가하였다. 반면 perilipin의 발현은 control과 비교했을 때 EGCG 60 μ M 단독 처리에서 $42.2 \pm 0.001\%$ 감소, EGCG 60 μ M + Glucosa-

mine 6-phosphate 200 μ g/mL 병합처리에서 $61.3 \pm 0.001\%$ 감소하여 두 그룹 모두에서 감소하였으며, 특히 병합처리에서 더 낮은 발현을 나타냈다 (Fig. 4B).

MCE 단계에서 cell cycle arrest

3T3-L1 preadipocyte를 confluent 상태가 되도록 배양하여 성장을 억제시킨 후, 48시간동안 MDI 배지에 노출 시켜 분화를 유도했을 때 mitotic clonal expansion (MCE) 단계를 거치는데 이때 cell cycle 변화를 관찰하였다 (Fig. 5). FACS를 통해 얻어진 히스토그램을 통해 분화가 진행됨에 따라 G0/G1 phase에서 S phase로, S phase에서 G2/M phase로 cell cycle이 변화하며, 약 38시간 무렵에서 cell cycle이 0시간에서의

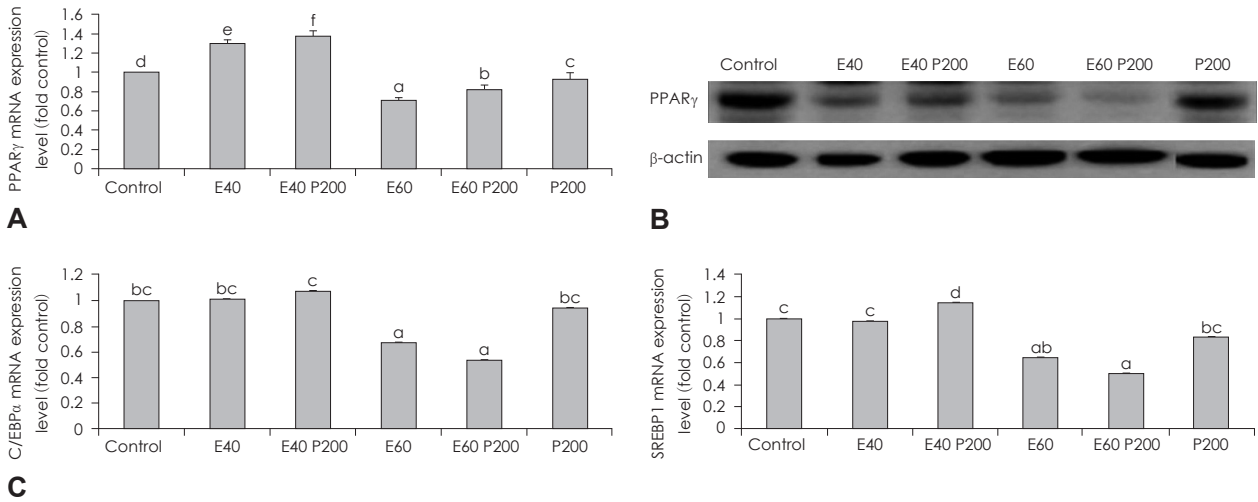


Fig. 3. Effect of EGCG & Glucosamine 6-phosphate on adipogenesis transcription factors. PPAR γ expression in 3T3-L1 cells as examined by real time PCR (A) and western blot (B) analysis. C/EBP α and SREBP1 expression in 3T3-L1 cells as examined by real time PCR (C). Confluent 3T3-L1 preadipocytes in medium with or without differentiation concentrations of GCG & Glucosamine 6-phosphate for 6 days (from day 0 to day 6) were differentiated into adipocytes. Value represent the mean \pm SEM. Means with different letters (a-f) at each mRNA are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Control: fully differentiated control adipocytes, E: with EGCG, P: Glucosamine 6-phosphate.

상태로 돌아옴을 확인하였다. 그리고 이렇게 시간별로 관찰한 결과를 바탕으로 cell cycle 단계의 분포를 그래프로 나타낸 결과를 통해서도 분화가 진행됨에 따른 cell cycle의 변화를 확실하게 확인할 수 있다 (Fig. 5B).

지방세포의 분화유도과정인 MCE 단계에서 정상적인 cell cycle변화에 대하여 EGCG와 Glucosamine 6-phosphate가 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 MDI medium에 두 가지 물질을 단독 또는 병합으로 처리하여 cell cycle을 관찰하였다. 대부분 분화 중인 세포는 지방세포의 분화 유도 18시간 이후에 cell cycle은 S phase로 들어간다고 알려져 있고,³¹ Fig. 5의 결과에서 18시간에서 cell cycle의 변화가 두드러졌기 때문에 18시간에서의 처리 결과를 관찰하였다. 이때 G1/S transition에 대한 확인을 위해 cyclin A, CDK2와 같은 cell cycle 조절자의 발현의 변화를 함께 확인하였다 (Fig. 6).

Fig. 6A와 B의 결과에서 control과 비교했을 때 EGCG 농도가 높아질수록 G0/G1 phase 단계의 세포의 수가 증가되고 (control 43.2%, EGCG 40 μ M 58.1%, EGCG 60 μ M 62.0%), S phase (control 34.0%, EGCG 40 μ M 22.8%, EGCG 60 μ M 21.7%)와 G2/M phase (control 22.3%, EGCG 40 μ M 18.3%, EGCG 60 μ M 15.7%)의 세포 수가 감소되었다. 이러한 G0/G1 phase 증가와 S phase, G2/M phase 감소의 변화는 EGCG 60 μ M와 Glucosamine 6-phosphate 200 μ g/mL 병합처리에서 가장 컸다 (G0/G1 phase 67.8%, S phase 20.0%, G2/M phase 11.2%).

또한 cyclinA와 CDK2의 단백질 발현 변화 관찰에서 Fig. 6C의 결과와 같이 control과 비교하여 EGCG 60 μ M 단독처

리의 경우에서 각각 20.9%와 37.9% 감소되었고, EGCG 60 μ M + Glucosamine 6-phosphate 200 μ g/mL 병합처리 한 경우에서 각각 37.7%와 35.7%로 발현이 감소되었다. EGCG 60 μ M 단독처리와 EGCG와 Glucosamine 6-phosphate 병합처리 한 결과를 비교해보면 cyclinA 발현은 16.8% 더 감소하였으며 CDK2 발현은 거의 비슷한 수준이었다.

고 찰

본 실험에서 지방세포를 분화시키는 동안에 EGCG와 PGlc를 농도별로 처리하여 지방세포 내 지방축적 정도를 확인한 결과에서, 낮은 EGCG 농도 (20 μ M)에서는 control과 차이가 없었지만 40 μ M과 60 μ M에서는 지방축적이 감소하였다. 이러한 EGCG에 의한 지방축적 감소는 농도가 높아질수록 더 많이 감소하였다 (40 μ M < 60 μ M). 선행연구들^{22,32,33}의 결과에서도 EGCG 10 μ M 농도 이상에서 지방축적이 감소하기 시작하며 50 μ M 이상에서는 유의적인 지방축적 감소를 보였고 농도가 높아질수록 지방축적 감소의 정도가 컸다. 또한 Lin 등의 연구¹⁶에 의하면 EGCG 50~200 μ M로 처리하였을 때 apoptosis가 유도되며 이로 인한 세포 수의 감소는 지방축적을 감소시킨다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 EGCG농도 증가에 따른 cytotoxicity 및 apoptosis 정도를 측정하지는 않았으나, EGCG 농도가 높아질수록 세포생존율이 감소하는 Fig. 1B의 결과를 통해 EGCG 농도와 지방축적 감소와의 관계에 있어 세포생존율감소가 관련이 있다고 생각된다.

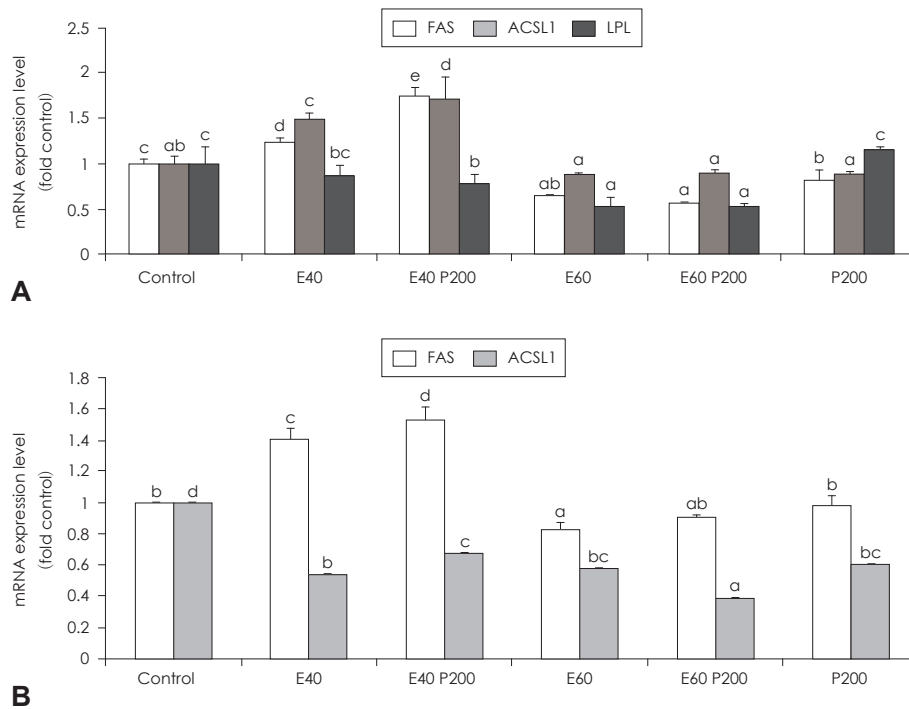


Fig. 4. Effect of EGCG & Glucosamine 6-phosphate on FAS, ACSL1 and LPL expression (A) and HSL and perilipin expression (B) as examined by real time PCR analysis. Confluent 3T3-L1 preadipocytes in medium with or without differentiation concentrations of GCG & Glucosamine 6-phosphate for 6 days (from day 0 to day 6) were differentiated into adipocytes. Value represent the mean \pm SEM. Means with different letters (a-d) at each mRNA are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Control: fully differentiated control adipocytes, E: with EGCG, P: Glucosamine 6-phosphate

이러한 EGCG의 지방축적 효과에 반해, PGlc는 단독적으로는 lipid droplet 감소에 영향을 미치지 못하는 듯하였다. Kong 등의 연구²⁸에 따르면 PGlc는 그 농도가 높아질수록 지방세포의 지방축적이 감소되었으나, 본 연구에서는 PGlc의 단독효과를 확인할 수 없었다. 그러나 EGCG 60 μ M과 PGlc 200 μ g/mL 병합 처리했을 때에는 감소효과를 약간 상승시켰다.

지방세포의 분화는 특정 유전자 발현에 대한 프로그램된 변화의 연속에 의해 유도되며, 지방세포가 분화되는 동안 유전자 발현은 adipogenesis를 위한 중요한 활성자로 알려져 있고 초기에 변화를 보인다.²⁸ PPAR γ 와 C/EBP α , SREBP1과 같은 전사인자는 지방세포가 분화되는 동안 adipogenesis를 위한 중요한 활성자로 알려져 있다. 이 전사인자 (transcription factors)의 과발현은 지방세포의 분화를 가속화시킬 수 있다.³⁴⁻³⁶ PPAR γ 와 C/EBP α 는 대부분 지방세포 특정 유전자의 전사활성을 유도하고, SREBP1은 PPAR γ 에 결합하는 리간드를 활성화시키고 lipogenesis와 지방산 탈포화에 관여하는 효소의 발현을 조절한다.³⁷ 이러한 분화전사인자들의 발현에 있어 EGCG의 고농도에서는 EGCG의 영향력이 강하게 나타났지만, PGlc 200 μ g/mL과의 병합처리가 분명한 상승효과를 준다고 할 수 있다 (Fig. 3). 다시 말해 EGCG 60 μ M의 단독처리와 PGlc 200 μ g/mL와의 병합처리를 통해서 지방세포의 분화가 가속화되

는 것을 억제한다고 할 수 있다.

PPAR γ , C/EBP α , SREBP1은 aP2, FAS, ACSL1, LPL, Lep τ in과 같은 adipocyte specific gene promoter을 상승적으로 활성화시킨다.³⁰ FAS (fatty acid synthase)는 지방산합성효소로 지방세포분화의 terminal marker로 알려져 왔으며, 활성화된 PPAR γ 와 SREBP1이 FAS의 발현과 FAS promoter의 cross-activate를 가능하도록 이끈다.³⁸ 혈중 중성지방은 지방세포에서 중성지방 합성을 위한 유리지방산으로 대사되는데 이때 중성지방의 가수분해작용을 촉매작용을 하는 것이 LPL (lipoprotein lipase)이라는 지방분해 효소이다. 지방조직 LPL은 fat cell에서 중성지방 저장의 정도와 관련되고 지방세포에서 LPL 활성의 high regulation은 비만과 밀접한 연관이 있다.³⁹ 그리고 ACSL1은 acyl Co-A synthetase (long chain family member)로 중성지방합성을 위한 acyl Co-A를 제공하는 효소이다. 본 연구결과에서 EGCG 60 μ M을 단독 또는 PGlc 200 μ g/mL와 병합처리 하였을 때 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1의 발현이 감소되었을 뿐 아니라 이러한 분화전사 인자들과 매개되어 FAS, ACSL1, LPL과 같은 adipogenic target 유전자의 발현도 감소시키는 경향을 보였다. 즉, adipogenesis 관련 전사인자들의 발현에만 영향을 주는 것이 아닌, 이와 매개된 adipogenic target 유전자에 대한 발현 억제를 통해 지방세포 내 지

방생성 및 축적을 억제하는 효과도 나타낸다고 볼 수 있다.

지질 분해 (lipolytic)는 perilipin의 인산화와 lipid droplet으로의 HSL translocation과 같은 중요한 과정에 의해 유도된다.⁵ Perilipin은 중성지방에서 지방산과 글리세롤의 가수분해를 매개하는 HSL과 같은 천연 지방분해효소로부터 지방세포에서 lipid droplets을 보호하는 하는 단백질이다.⁸ 그렇기 때문에 분화과정동안의 perilipin과 HSL의 발현을 확인을 통해서 lipolytic response를 확인할 수 있다.⁴⁰ Perilipin의 mRNA 발현은 fully differentiation된 지방세포에서의 발현보다 모두 낮았고 특히 EGCG 60 μ M + PGlc 200 μ g/mL에서 가장 낮았다. 그러나 HSL의 mRNA 발현은 EGCG 40 μ M와 EGCG 40 μ M + PGlc 200 μ g/mL에서 증가한 결과를 보였다. Lee 등의 연구⁴¹에 따르면 지방세포에 EGCG 10 μ M을 처리했을 때 HSL 유전자 발현의 직접적인 up-regulation을 통해 lipolytic effect를 가지며 이로 인해 지방축적을 억제한다고 보고하고 있다. 또한 Kong 등의 연구²⁸에서 Glucosamine 6-phosphat에 의해 up-regulation된 HSL mRNA 발현을 통해 지방축적 억제 작용을 한다고 보고하고 있다. 즉 HSL의 발현 증가를 통해 lipolytic effect가 증가하고 이것이 곧 지방축적 억제로 이

어진다는 것이다. 그러나 본 연구 결과에서 EGCG 40 μ M에서와 EGCG 40 μ M + PGlc 200 μ g/mL에서 HSL 유전자 발현이 증가하는 것으로 보아 두 물질이 lipolytic effect를 가진다는 것은 확인할 수는 있었으나, 앞의 결과 (Fig. 3, 4A)에서 효과를 보였던 EGCG 60 μ M와 EGCG 60 μ M + PGlc 200 μ g/mL에서는 오히려 HSL 유전자의 낮은 발현을 나타냈으므로 해당 농도에서 HSL을 통한 lipolytic effect는 감소한다고 할 수 있다. 비록 EGCG 60 μ M와 EGCG 60 μ M + PGlc 200 μ g/mL에서 지방세포의 지질분해를 촉진하는 HSL의 발현은 비록 감소하였지만, lipid droplets을 보호하는 perilipin의 발현 억제를 통해 부분적인 lipolytic effect를 가진다고 할 수 있다.

그리고 지방세포의 분화와 지방축적 감소에 대한 cell cycle arrest측면에서의 접근을 위해 중요한 개념이 mitotic clonal expansion (MCE)이라는 과정이다. Preadipocyte의 분화과정은 몇 가지 단계를 거친다. 고농도의 IGF-1이나 insulin, dexamethason, 3-isobutyl-1-methylxanthine과 같은 호르몬 자극 직후, postconfluent G0 3T3-L1 preadipocytes는 mitotic clonal expansion (MCE)이라 불리는 cell cycle의 과정으로 다시 들어간다. Terminal adipocyte differentiation을 유도하기

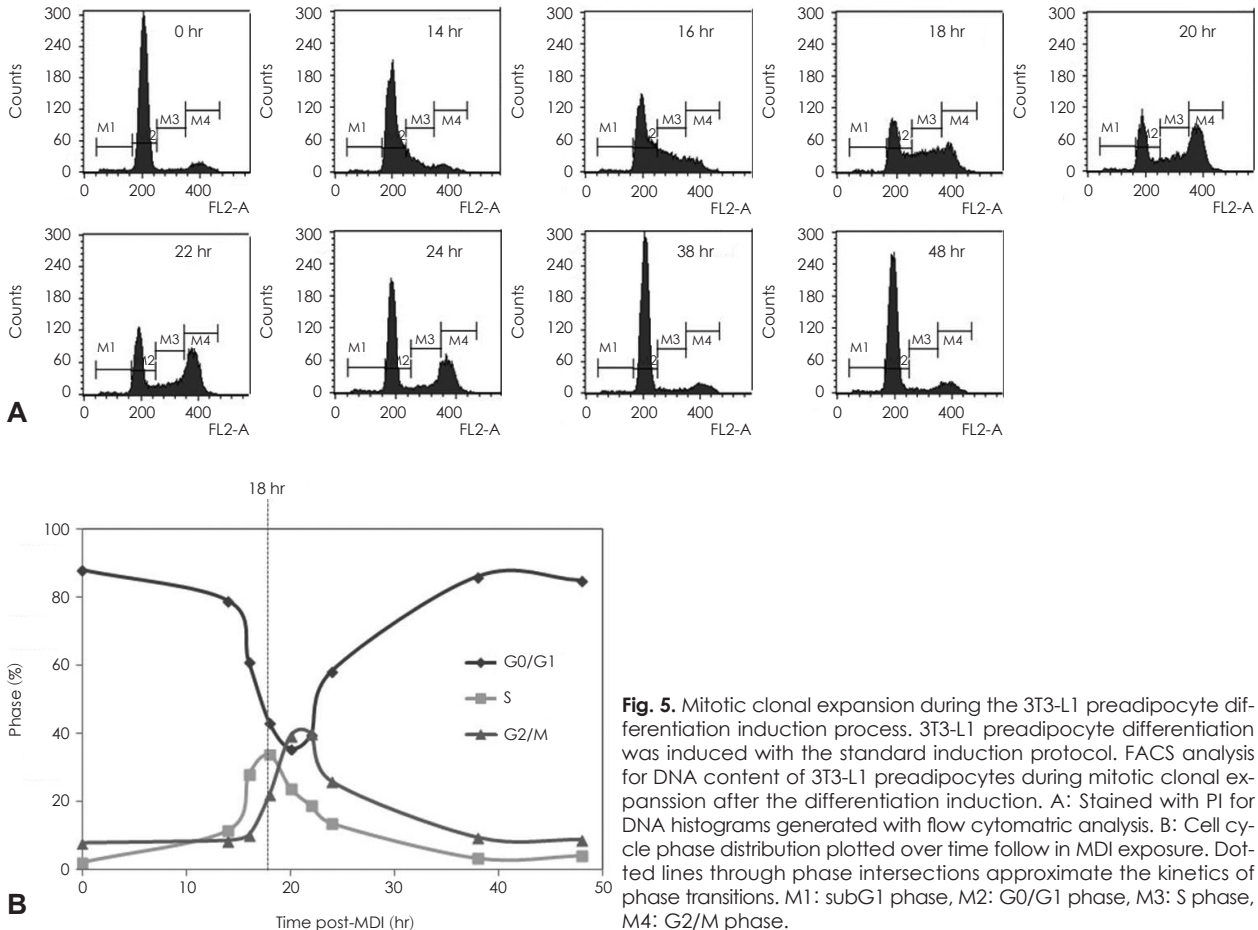


Fig. 5. Mitotic clonal expansion during the 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction process. 3T3-L1 preadipocyte differentiation was induced with the standard induction protocol. FACS analysis for DNA content of 3T3-L1 preadipocytes during mitotic clonal expansion after the differentiation induction. A: Stained with PI for DNA histograms generated with flow cytometric analysis. B: Cell cycle phase distribution plotted over time follow in MDI exposure. Dotted lines through phase intersections approximate the kinetics of phase transitions. M1: subG1 phase, M2: G0/G1 phase, M3: S phase, M4: G2/M phase.

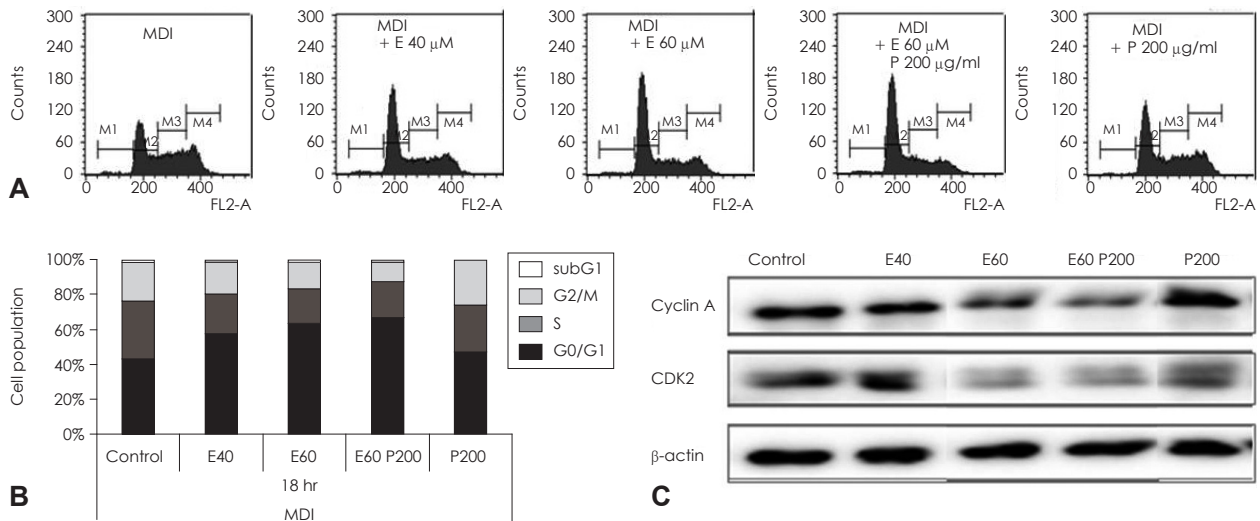


Fig. 6. Cell cycle analysis of EGCG and glucosamine-6-phosphate treated 3T3-L1 cell during the MCE process of adipocyte differentiation. Two day postconfluent 3T3-L1 cells were induced with the adipogenic cocktail in the presence or absence of various concentrations and alone or combination of EGCG and glucosamine-6-phosphate. After 18 hr of treatment, differentiating cells were stained with propidium iodide (PI). These cells were then subjected to flow cytometric cell-cycle analysis (A) and quantitative analysis of cells in different phases in cell cycle (B). Data were analyzed using CellQuest Pro software. (C) The protein levels of cyclin A and CDK2 in these cells were detected by immunoblot assay using their specific antibody, β -actin was used as a loading control. M1: subG1 phase, M2: G0/G1 phase, M3: S phase, M4: G2/M phase. Control: fully differentiated control adipocytes, P: with Glucosamine 6-phosphate.

위한 유전자 발현과정은 MCE 기간 동안이나 그 이후에 개시된다.^{42,43} 지방세포의 분화유도과정인 MCE 단계에서 정상적인 cell cycle 변화에 대하여 EGCG와 PGlc가 어떠한 영향을 미치는지 확인하였을 때 EGCG 농도가 높아질수록 G0/G1 phase 단계의 세포의 수가 증가되고 S phase와 G2/M phase의 세포 수가 감소되었으며, 이러한 변화는 EGCG 60 μ M와 PGlc 200 μ g/mL 병합처리에서 가장 컸다. 이는 다시 말해 EGCG 단독처리 농도가 높아질수록 그리고 PGlc 200 μ g/mL와 병합처리 한 경우에서 더욱 G0/G1 phase의 세포주기 정지가 증가하였고, S phase로의 세포주기 이행은 물론 M phase로의 이행도 방해가 되었음을 뜻한다. 즉, EGCG 60 μ M + PGlc 200 μ g/mL 병합처리를 통해 MCE 단계에서의 세포증식이 억제되는 것을 확인할 수 있는 결과였다.

또한 FACS 분석결과에 대한 정확한 기전을 확인하기 위하여 G1/S transition에 필수적인 세포주기 조절자로 알려져 있는⁴⁴⁻⁴⁶ cyclinA와 CDK2의 발현 변화를 관찰했을 때, EGCG 60 μ M을 단독으로 처리한 경우와 EGCG 60 μ M + PGlc 200 μ g/mL 병합처리 한 경우에서 cyclinA와 CDK2의 발현이 감소되었다. 특히 EGCG 60 μ M + PGlc 200 μ g/mL 병합처리에서 더 낮은 발현을 나타낸 것으로 보아 병합처리에 의한 세포주기의 억제 효과가 강한 것을 확인하였다. 즉, G0/G1 phase 단계의 정지로 인한 S phase와 G2/M phase로의 이행이 억제되고, 이러한 MCE 단계에서의 세포증식이 원활히 이루어지지 않아 지방세포의 분화가 억제되고 지방 세포내 지방축적이 감소되는 것으로 볼 수 있다. Kim 등¹³의 연구와 Kim 등⁴³의

연구 결과에서도 지방세포 축적이 감소하고 지방세포분화 관련 유전자의 발현이 감소했던 vitisinA와 curcumin 처리 농도에서 G0/G1 phase의 세포주기 정지하고 S phase로의 이행이 방해되는 결과를 보였고, 이때 cyclinA와 CDK2 발현도 감소되는 결과를 보였다. 이는 본 연구에서 EGCG와 PGlc에 의한 cell cycle arrest가 지방세포의 분화와 지방축적을 억제하는 기전 중 하나라는 것을 뒷받침한다고 할 수 있다.

결론적으로 EGCG와 PGlc의 병합처리는 adipogenesis 전사인자의 직접적인 발현 억제 뿐 아니라 adipogenic target 유전자의 발현 감소를 통해 지방세포의 분화와 지방축적을 억제와 lipolytic 유전자의 발현 조절을 통한 부분적인 지방분해 효과에 있어 단독처리보다 효과적이었다. 또한 MCE과정 중 G0/G1 phase 단계에서 cell cycle 정지와 S phase 및 G2/M phase로의 세포주기 이행을 방해 하여 지방세포의 분화진행을 억제하는 효과에서도 두 물질의 병합처리에 의한 상승효과를 볼 수 있었다. 이로써 EGCG와 글루코사민의 병합처리는 항비만 효과에 대한 상승효과를 가진다는 것을 확인하였다. 그러나 글루코사민의 효과에 비하여 EGCG의 효과의 영향력이 상대적으로 컸던 것을 감안하면, 보다 강력한 상승효과를 가지는 또 다른 기능성성분과의 병합처리에 대하여 추가적인 연구가 뒷받침될 필요가 있다고 사료된다.

요 약

널리 응용되고 있는 녹차의 EGCG과 우리나라 국민의 상당

수가 복용하고 있는 건강기능성 식품 성분인 글루코사민은 이전의 연구들을 통해서 지방세포의 분화를 억제하는데 효과가 있다고 보고되어왔다. 이 두 물질의 병합치리로 기대되어지는 지방세포에서의 adipogenesis 및 지방축적감소에 대한 상승효과는 검증된 바 없으며, 효과에 대한 cell cycle 차원에서의 접근은 없었다. 본 연구 결과에서 EGCG와 Glucosamine 6-phosphate는 adipogenesis 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1에 대한 직접적인 발현 억제 뿐아니라, PPAR γ , C/EBP α , SREBP1와 매개된 FAS, ACSL1, LPL과 같은 adipogenic target 유전자의 발현 감소를 통하여 지방세포의 분화와 지방세포 내 지방축적을 감소시키는 효과를 나타냈다. 그리고 HSL과 perilipin의 발현조절을 통해 부분적인 lipolytic effect도 나타났다. 또한 지방세포의 분화가 개시되는데 있어 중요한 DNA의 remodeling 과정인 mitotic clonal expansion (MCE) 과정 중 G0/G1 phase 단계에서 cell cycle 정지 유도과 그로인한 S phase 및 G2/M phase로 세포주기이행의 방해를 통해 지방세포가 분화되는 것은 억제하였다. 이러한 효과들은 EGCG 농도가 높아질수록, 그리고 EGCG를 단독으로 처리한경우보다 Glucosamine 6-phosphate와 병합하였을 때 효과적이었다. 따라서 EGCG 단독처리 및 glucosamine 6-phosphate와의 병합치리는 지방세포에서 adipogenesis와 adipogenic관련 유전자들의 발현 억제 및 MCE 단계의 cell cycle arrest를 통해 지방세포의 분화를 억제하고 지방축적을 감소시켜 항비만 효과를 나타냈으며, 이러한 효과는 두 성분의 병합치리에서 조금 더 효과적이었다고 할 수 있다. 비록 두 성분의 병합치리가 기대했던 만큼은 아니었으나 항비만 효과에 대한 상승효과가 있다고 볼 수 있다.

References

1. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 2001; 22: 355-375.
2. Lee WJ, Koh EH, Won JC, Kim MS, Park JY, Lee KU. Obesity: the role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in body weight regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(11): 2254-2259.
3. Bray GA, Tartaglia LA. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* 2000; 404(6778): 672-677.
4. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001; 104(4): 531-543.
5. Ardévol A, Bladé C, Salvadó MJ, Arola L. Changes in lipolysis and hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(3): 319-324.
6. Balkau B, Valensi P, Eschwège E, Slama G. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2007; 33(6): 405-413.
7. Giri S, Rattan R, Haq E, Khan M, Yasmin R, Won JS, Key L, Singh AK, Singh I. AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1 and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. *Nutr Metab (Lond)* 2006; 3: 31.
8. Jeon T, Hwang SG, Hirai S, Matsui T, Yano H, Kawada T, Lim BO, Park DK. Red yeast rice extracts suppress adipogenesis by down-regulating adipogenic transcription factors and gene expression in 3T3-L1 cells. *Life Sci* 2004; 75(26): 3195-3203.
9. Chon JW, Sung JH, Hwang EJ, Park YK. Chlorella methanol extract reduces lipid accumulation in and increases the number of apoptotic 3T3-L1 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 183-189.
10. Qiu Z, Wei Y, Chen N, Jiang M, Wu J, Liao K. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J Biol Chem* 2001; 276(15): 11988-11995.
11. Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280(4): C807-C813.
12. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 345-373.
13. Kim SH, Park HS, Lee MS, Cho YJ, Kim YS, Hwang JT, Sung MJ, Kim MS, Kwon DY. Vitisin A inhibits adipocyte differentiation through cell cycle arrest in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(1): 108-113.
14. Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr* 2004; 134(12 Suppl): 3431S-3440S.
15. Liao S, Kao YH, Hiipakka RA. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam Horm* 2001; 62: 1-94.
16. Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obes Res* 2005; 13(6): 982-990.
17. Ahmad N, Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* 1999; 57(3): 78-83.
18. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 2000; 141(3): 980-987.
19. Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y, Tokimitsu I. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1): 122-129.
20. Kim JD, Lee BI, Jeon YH, Bak JP, Jin HL, Lim BO. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of green tea mixture and dietary fiber on liver of high fat diet-induced obese rats. *Korean J Med Crop Sci* 2010; 18(4): 224-230.
21. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 1992; 21(3): 334-350.
22. Chan CY, Wei L, Castro-Muñozledo F, Koo WL. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression. *Life Sci* 2011; 89(21-22): 779-785.
23. Nagao T, Meguro S, Hase T, Otsuka K, Komikado M, Tokimitsu I, Yamamoto T, Yamamoto K. A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17(2): 310-317.
24. Kim SO, Lee HE, Choe WK. The effects of ginseng saponin-Re, Rc and green tea catechine; ECGC (Epigallocatechin gallate) on leptin, hormone sensitive lipase and resistin mRNA expressions in 3T3-L1 adipocytes. *Korean J Nutr* 2006; 39(8): 748-755.
25. Moon HS, Lee HG, Choi YJ, Kim TG, Cho CS. Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. *Chem Biol Interact* 2007; 167(2): 85-98.
26. Lee CS. Health functional food technology and research status in domestic and foreign. *Bull Food Technol* 2005; 18(4): 38-54.
27. Kong CS, Kim JA, Kim SK. Anti-obesity effect of sulfated glu-

- cosamine by AMPK signal pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(10): 2401-2406.
28. Kong CS, Kim JA, Eom TK, Kim SK. Phosphorylated glucosamine inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 2010; 21(5): 438-443.
 29. Kim MM, Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Glucosamine sulfate promotes osteoblastic differentiation of MG-63 cells via anti-inflammatory effect. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17(7): 1938-1942.
 30. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998; 78(3): 783-809.
 31. Tang QQ, Lane MD. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev* 1999; 13(17): 2231-2241.
 32. Kim H, Sakamoto K. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses adipocyte differentiation through the MEK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Cell Biol Int* 2012; 36(2): 147-153.
 33. Sung HY, Hong CG, Suh YS, Cho HC, Park JH, Bae JH, Park WK, Han J, Song DK. Role of (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell viability, lipogenesis, and retinol-binding protein 4 expression in adipocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; 382(4): 303-310.
 34. Latasa MJ, Moon YS, Kim KH, Sul HS. Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(19): 10619-10624.
 35. Luong A, Hannah VC, Brown MS, Goldstein JL. Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 2000; 275(34): 26458-26466.
 36. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73(1): 31-34.
 37. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000; 14(11): 1293-1307.
 38. Palmer DG, Rutter GA, Tavaré JM. Insulin-stimulated fatty acid synthase gene expression does not require increased sterol response element binding protein 1 transcription in primary adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291(3): 439-443.
 39. Bulló M, García-Lorda P, Peinado-Onsurbe J, Hernández M, Del Castillo D, Argilés JM, Salas-Salvado J. TNFalpha expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26(5): 652-658.
 40. Kim SK, Kong CS. Anti-adipogenic effect of dioxinohydroecolol via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *Chem Biol Interact* 2010; 186(1): 24-29.
 41. Lee MS, Kim CT, Kim IH, Kim Y. Inhibitory effects of green tea catechin on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* 2009; 23(8): 1088-1091.
 42. Reichert M, Eick D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* 1999; 18(2): 459-466.
 43. Kim CY, Le TT, Chen C, Cheng JX, Kim KH. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *J Nutr Biochem* 2011; 22(10): 910-920.
 44. Li X, Kim JW, Grønberg M, Urlaub H, Lane MD, Tang QQ. Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBP-beta during adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(28): 11597-11602.
 45. Kim SI, Park CS, Lee MS, Kwon MS, Jho EH, Song WK. Cyclin-dependent kinase 2 regulates the interaction of Axin with beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317(2): 478-483.
 46. Auld CA, Fernandes KM, Morrison RF. Skp2-mediated p27 (Kip1) degradation during S/G2 phase progression of adipocyte hyperplasia. *J Cell Physiol* 2007; 211(1): 101-111.