

AMPK 활성화를 통한 (-)-Epigallocatechin-3-gallate의 지방세포분화 억제 효과

†김 영 화

경성대학교 식품응용공학부

Inhibitory Effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on Adipogenesis via AMPK Activation in 3T3-L1 Cells

†Younghwa Kim

School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyungsoong University, Busan 48434, Republic of Korea

Abstract

(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a major catechin found in green tea. It is reported that EGCG possesses various health benefits including anti-cancer, antioxidant, anti-diabetes, and anti-obesity. The objective of this study was to investigate the effects of EGCG on adipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway in 3T3-L1 preadipocytes. In order to determine the effects of EGCG on adipogenesis, preadipocyte differentiation was induced in the presence or absence of EGCG (0~100 μ M) for a period of 6 days. EGCG significantly inhibited fat accumulation and suppressed the expression of adipogenic specific proteins including peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ . Also, EGCG markedly increased the activation of AMPK and acetyl-CoA carboxylase (ACC) and the production of intracellular reactive oxygen species (ROS). However, any pretreatment with a specific AMPK inhibitor, compound C, abolished the inhibitory effects of the EGCG on PPAR γ expression. This study suggests that EGCG has anti-adipogenic effects through modulation of the AMPK signaling pathway and therefore, may be a promising antiobesity agent.

Key words: EGCG, AMPK pathway, 3T3-L1 cells, ROS, PPAR γ

서 론

비만은 1996년 세계보건기구에서 장기 치료가 필요한 질병으로 규정된 이래로 현재 심각한 사회·경제적인 건강문제 중 하나로 널리 인식되고 있다. 비만은 지방세포에 지방이 과도하게 축적된 상태로 심혈관계 질환, 2형 당뇨, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 등의 발병 위험을 증가시킨다(Visscher & Seidell 2001; Lee 등 2005). 지방세포는 중성지방 저장과 유리 지방산의 방출에 의해 지질대사의 항상성과 에너지 균형을 조절하는 중요한 역할을 한다. 지방세포로의 분화와 지방 축적의 양은 비만의 발생과 관련이 깊으며, 이 과정에서 다양한

전사인자와 호르몬이 관여를 한다. 지방세포 분화초기에는 CCAAT/enhancer-binding proteins(C/EBP) β , C/EBP δ , sterol regulatory element binding protein(SREBP)-1c 등이 발현되고 지방구의 형성이 촉진된다. 지방세포 분화 후기에는 C/EBP α 와 peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) γ 같은 전사인자의 발현이 증가됨으로써 지방세포의 분화가 이루어진다(Darlington 등 1998; Rosen 등 2002). 또한, C/EBP α 와 PPAR γ 는 adipocyte protein 2(aP2), lipoprotein lipase(LPL) 등의 지방합성 유전자의 발현을 유도하며, leptin과 adiponectin 등 지방합성 유전자들의 발현을 조절한다(White & Stephens 2010).

AMP-activated protein kinase(AMPK)는 지방산의 합성과

† Corresponding author: Younghwa Kim, School of Food Biotechnology and Nutrition, Kyungsoong University, Busan 48434, Republic of Korea. Tel: +82-51-663-4652, Fax: +82-51-622-4986, E-mail: younghwakim@ks.ac.kr

분해를 매개함으로써 체내 에너지 항상성 유지에서 중요한 역할을 한다(Assifi 등 2005). 활성화된 AMPK는 SREBP-1c, PPAR γ 및 fatty acid synthase(FAS)와 같은 지방세포 전사인자의 발현을 억제함으로써 지방 합성을 억제하고, acetyl-CoA carboxylase(ACC)의 비활성화와 carnitine palmitoyltransferase-1(CPT-1)의 활성화를 통해 베타 산화를 촉진 시킨다(Foretz 등 1998; Hardie DG 2003; Park 등 2015). 이와 같이 AMPK 경로는 지방 세포의 adipogenesis 과정을 조절하는 것으로 알려져 있으므로, 비만예방 및 치료를 위한 약물 타겟으로 많은 연구가 이루어지고 있다(Daval 등 2006).

녹차는 전 세계적으로 널리 응용되는 식품으로 녹차의 꾸준한 음용은 항산화, 항암, 항염증 등의 효과가 있는 것으로 보고되어져있다(Ahmad & Mukhtar 1999; Kao 등 2000; Nagao 등 2005). 또한, 녹차는 혈청콜레스테롤 농도를 저하시키는 효과가 뛰어나며, 체중조절에도 영향을 미친다(Kim 등 2010). 녹차에는 galliccatechin(GC), epicatechin(EC), epigallocatechin(EGC), epicatechingallate(EGCG), epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등이 포함되어 있으며, 특히 EGCG는 역학적, 임상적 연구조사에서 비만과 당뇨병에 효과가 있다고 보고하였다(Graham HN 1992; Chan 등 2011). Moon 등(2007)은 3T3-L 세포에서 EGCG는 AMPK의 활성화를 유도한다는 결과를 보고하였다. 그러나 지방세포 분화억제에서 AMPK의 활성 억제제 처리에 의한 AMPK의 역할은 규명된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 EGCG의 지방세포분화 억제 효과에서 AMPK의 활성 억제제 처리에 따른 지방세포분화 전사인자의 발현을 연구하여 AMPK의 역할을 명확히 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

Dexamethasone, dimethyl sulfoxide(DMSO), EGCG, insulin, isobutylmethylxanthine(IBMx), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide(MTT), dexamethasone(Dex) 및 oil red O(ORO)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bovine serum(BS), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), Hank's balanced salt solution(HBSS), penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA는 Gibco사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blotting에 사용된 β -actin와 PPAR γ 1차 항체와 anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. AMPK, pAMPK α , ACC 및 pACC 1차 항체는 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. ECLTM 시약은 GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)로부터 구입하였고, 그 밖에 사용된 추

출용매 및 시약은 analytical 및 HPLC 등급을 사용하였다.

2. 3T3-L1 세포의 분화 유도

실험에 사용된 3T3-L1 세포는 ATCC(CL-193, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 37°C로 배양하였다. 세포 증식을 위해 10% BS, 100 units/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 사용하였다. 3T3-L1 1 \times 10⁵개의 세포를 6-well plate에 seeding한 후 세포가 confluent stage(day 0)에 도달하면 1 μ g/mL insulin, 0.5 mM IBMx, 1 μ M dexamethasone을 함유한 10% FBS DMEM 배지로 지방세포로 분화를 유도하였다. 2일 후 1 μ g/mL의 insulin을 함유한 10% FBS DMEM으로 교체하였으며(day 2), 2일이 더 지난 후(day 4) 10% FBS DMEM로 갈아주어 지방세포를 성숙시켰다(day 6).

3. 세포 독성 측정

3T3-L1 세포에서 EGCG의 독성을 알아보기 위하여 lactate dehydrogenase(LDH) assay를 실시하였다. LDH는 세포막이 손상을 입은 경우, 분비하는 효소로 알려져 있다. EGCG를 처리한 후 6일째 3T3-L1 세포에서 LDH assay kit(Roche Diagnostic System, Montclair, NJ, USA)를 이용하여 실험을 진행하였다.

4. Oil red O 염색

3T3-L1 세포의 분화 및 성숙 6일 후(day 6) 배지를 제거한 뒤 phosphate-buffered saline(PBS)로 세포를 2회 세척하였으며, 10% formalin 용액을 첨가하여 세포를 고정하였다. 세포 고정 후 Oil red O 시약을 이용하여 지방세포로 분화된 3T3-L1 세포 내의 지방구를 염색하였다. 염색된 지방구는 현미경을 이용하여 사진을 찍었으며, isopropanol로 세포 내 지방구에 염색된 Oil red O 시약을 재용해하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군의 흡광도와 비교하였다.

5. 세포내 활성산소종(ROS) 측정

ROS의 생성량은 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 이용하여 형광측정기로 측정하였다. 96-well black plate에 3T3-L1 세포를 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 IBMx, dexamethasone, insulin을 처리하여 지방세포로 분화를 유도하였다. EGCG를 함께 처리를 한 후 24시간이 지난 후에 PBS로 세포를 세 번 세척하여 25 μ M DCFH-DA를 함유한 serum-free 배지를 세포에 처리하였다. 1시간이 지난 후 세포는 다시 PBS로 3회 세척하였으며, HBSS를 처리하였다. 세포 내 ROS와 DCFH-DA가 반응하여 형성된 형광의 양은 형광측정기(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여(excitation, 485 nm; emission, 530 nm) 측정하였다

(Wang & Joseph 1999).

6. Western blot

PPAR γ 와 AMPK, ACC의 발현을 알아보기 위하여 지방세포로 분화가 유도된 3T3-L1 세포를 PBS로 3회 세척한 후 원심 분리하여 세포를 얻었다. 얻어진 세포는 얼음 위에서 lysis buffer(iNtRON Biotech, Seongnam, Korea)에 30분간 방치한 후, 14,240 g으로 30분 동안 원심분리를 한 후 상등액을 모았다. 모은 상등액은 BCA protein assay kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질 10 μ g을 sample buffer와 섞어 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 불활성화 시켜 10% SDS polyacrylamide gel에 전기 영동하였다. 전기 영동된 SDS polyacrylamide gel은 nitrocellulose membrane으로 transfer한 후, 5% non-fat dry milk 용액에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체는 1:1,000의 비율로 상온에서 1시간 부착시켰으며, 그 후 Tween-20/Tris buffered saline(TTBS)으로 10분간 3번 세척하였다. 세척한 membrane은 1:2,000의 비율로 희석한 2차 항체에 1시간 동안 상온에서 부착시킨 후 TTBS buffer로 10분간 3번 세척하였고, ECL(Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)을 처리한 membrane을 암실에서 X-ray film에 감광시켜 현상하였다. 현상을 통해 얻어진 단백질 band의 density는 Image J software(NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량하였다.

7. 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 SAS, version 9.0(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 모든 실험 결과는 평균 \pm standard error로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 세포독성과 지방구 생성 억제 효과

실험에 사용된 EGCG의 농도별 세포 독성 여부를 알아보기 위해 3T3-L1 세포를 지방세포로 분화시킨 6일째 LDH assay를 실시하였다. 측정 결과, EGCG는 실험에 사용된 모든 농도(0-100 μ M)에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1A). 또한 분화를 유도하면서 EGCG를 다양한 농도로 처리하여 중성지방 축적 억제효과를 알아보았다. Oil red O staining을 통해 지방세포의 lipid droplet을 확인한 결과, EGCG에 의해 농도 의존적인 지방구 형성 감소를 나타내었다(Fig. 1B). 그리고 염색된 지방구에 iso-propanol을 처리하여 oil red O 염료를 용출하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방구 생성의

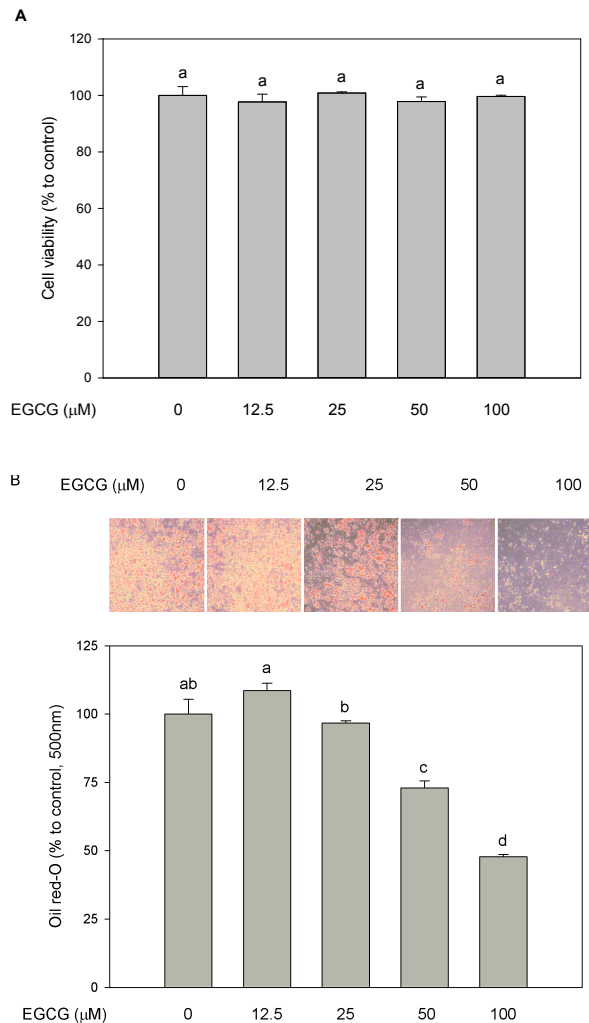


Fig. 1. Effects of EGCG on cell viability(A) and lipid accumulation(B) in differentiated 3T3-L1 cells on day 6. Each value is expressed as a mean \pm standard error (n=3). ^{a-d} Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) compared to control.

정도를 수치화하였다. 특히 EGCG 100 μ M에서는 지방구의 형성이 대조군에 비하여 약 50% 억제되었으며, 이는 통계적으로 유의적인 차이를 나타냈다. 본 결과는 3T3-L1 세포에 EGCG를 처리하여 지방분화 억제를 확인하였던 기존 실험과 마찬가지로 지방분화가 대조군에 비하여 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Kim & Lee, 2016). 따라서 다음 실험에서 EGCG에 의한 3T3-L1 세포의 지방세포 분화 억제에 관련된 여러 전사인자의 발현을 알아보려고 하였다.

2. EGCG의 PPAR γ 발현 억제 측정

PPAR γ 는 지방세포의 분화를 조절하는 대표적인 전사인자로 알려져 있으며, 특히 PPAR γ 는 지방구 형성을 유도하는 중

요한 인자이다. 따라서 본 연구에서는 EGCG에 의한 지방세포 분화과정에서 PPAR γ 의 발현을 알아보았다. 지방세포 분화 6일째 세포의 단백질을 얻어 PPAR γ 의 발현량을 측정한다. 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 측정 결과, EGCG의 가장 높은 처리 농도인 100 μ M을 처리한 군은 대조군에 비해 PPAR γ 의 유의적인 발현억제를 나타내었다. 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화된다. 3T3-L1 세포가 지방세포를 형성하는 과정에 관여하는 중요한 인자는 PPAR γ 와 C/EBP α 등이 있고, 분화 초기, 중기, 후기의 단계별로 발현되는 전사인자들의 복잡한 상호작용으로 지방세포로 분화된다. 분화 후기에 유도되는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현은 분화 초기에 발현되는 C/EBP β 등에 의해 발현이 조절됨으로써 지방세포 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Darlington 등 1998; Rosen 등 2002). 특히 분화가 완료된 세포는 백색 지방세포처럼 중성지방의 축적과 PPAR γ , FAS, SREBP-1c, lipoprotein lipase 및 aP2 등과 같은 지방세포 특이적인 유전자의 발현이 유발되는 생화학적 특징을 가진다(Choi 등 2013). 이전 연구에서 EGCG는 지방세포분화 억제와 지방세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다(Lin 등 2005; Liu 2006). 이 결과로 EGCG는 지방세포 분화 시 PPAR γ 의 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

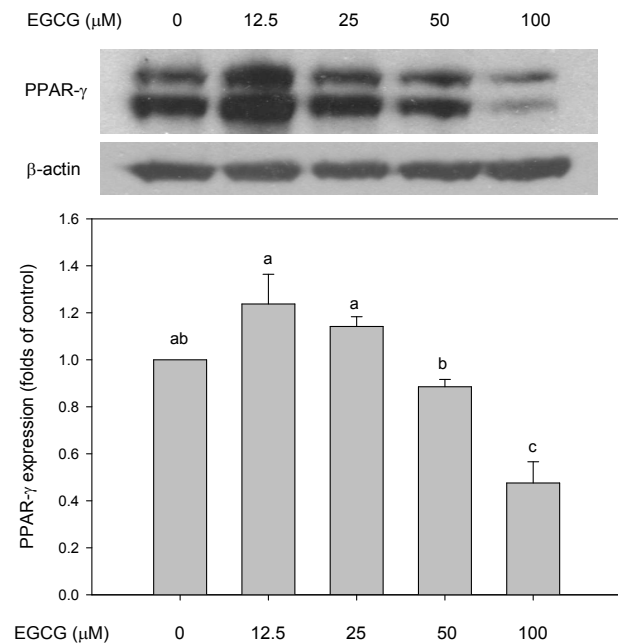


Fig. 2. Effects of EGCG on PPAR γ expression in differentiated 3T3-L1 cells. Each value is expressed as a mean \pm standard error (n=3). Blots are representative of at least 3 independent experiments. ^{a-c} Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) compared to control.

3. EGCG의 ROS 생성과 AMPK pathway 활성화

본 연구에서는 지방세포 내에서 중성지방의 축적 억제가 ACC와 AMPK의 활성화 증가에 의한 것인지를 western blot을 실시하여 알아보았다. EGCG의 처리에 의해서 지방합성 효소의 활성을 억제하는 AMPK 및 ACC의 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 특히 100 μ M의 EGCG는 대조군에 비해 AMPK와 ACC의 인산화를 약 3배 가까이 증가시켰다. 중성지방의 형성은 acetyl-CoA carboxylase(ACC)

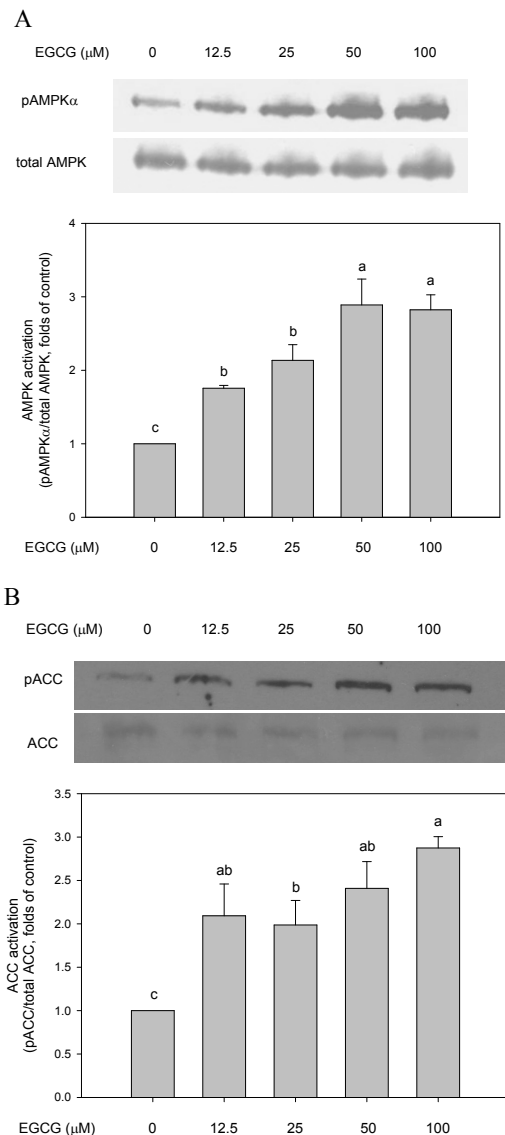


Fig. 3. Effects of EGCG on the AMPK activation(A) and ACC(B) phosphorylation in 3T3-L1 cells. Each value is expressed as the mean \pm standard error (n=3). Blots are representative of at least 3 independent experiments. ^{a-c} Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$) compared to control.

및 FAS 등에 의해 합성된다(Sullivan 1994). 또한, AMPK는 세포의 에너지 대사에 관여하는 여러 가지 효소들의 인산화를 조절함으로써 포도당 이동, 지방산 합성, 콜레스테롤 합성 등의 다양한 생리작용에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(Carling 등 2011). EGCG는 AMPK와 ACC의 인산화를 활성화시켰으며, 이는 지방산 합성과 지방 축적을 감소하는 과정과 관련이 있는 생각되어진다.

세포 내 적절한 농도의 ROS는 세포의 증식 조절, 유전자의 발현, 신호 유도 등 세포 내 신호전달을 하는 역할을 수행한다(Oakley 등 2009). 뿐만 아니라, 최근 ROS는 AMPK의 upstream 조절자라는 연구결과가 있다(Hwang 등 2007). 본 연구에서도 지방세포로 분화하는 과정에서 EGCG에 의한 ROS 생성량을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 분화 유도 24시간 후, EGCG에 의한 ROS의 양은 증가하는 경향을 나타내었다. Han 등(2010)이 보고한 결과에 따르면 AMPK의 활성화는 세포 내 ROS의 증가를 동반하는 것을 특징으로 한다고 한다. 또한 genistein, capsaicin, esculletin 등의 천연화합물은 AMPK를 증가시키며, 세포 내 ROS의 생성량을 증가시킨다고 보고하고 있다(Hwang 등 2005; Kim & Lee 2015). 그러므로 본 결과를 통해 ROS의 생성량 증가는 지방세포 분화과정에서 AMPK의 활성화와 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

4. EGCG의 AMPK 활성화 억제에 따른 지방세포분화 조절

AMPK의 활성화가 PPAR γ 의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 compound C(6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)를 3T3-L1 세포에 처리하였다. Compound C는 AMPK 선택적 억제제로 AMPK의 활

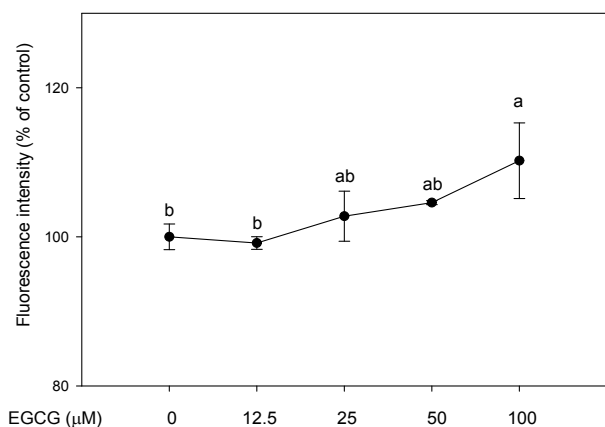


Fig. 4. Effects of EGCG on the ROS production in differentiated 3T3-L1 cells. Each value is expressed as a mean± standard error (n=3). ^{a-b} Means with different letters are significantly different ($p<0.05$) compared to control.

성을 억제하기 위해 사용하였다. 3T3-L1세포에서 EGCG는 PPAR γ 의 발현을 감소시켰으나, compound C를 함께 처리하면 PPAR γ 의 발현 억제 효과가 사라지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 본 실험을 통해 EGCG에 의해 활성화된 AMPK는 3T3-L1 세포의 지방세포 분화를 억제하는 것에 관여하는 것임을 알 수 있었다. Habinowski와 Witters(2001)의 연구에 따르면 AMPK의 활성화를 유도하는 5-aminoimidazole-4-carboxamide-riboside(AICAR)는 지방구의 형성과 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 억제한다고 보고하였다. 또한, AMPK는 지방세포로의 분화에 관여하는 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 조절한다고 알려져 있다(Daval 2006). 감글류에 존재하는 nobiletin, esculletin 등의 천연물질은 AMPK의 활성화를 유도하여 지방형성 억제를 제시한 결과는 본 연구 결과와 일치한다(Kim & Lee 2015; Choi 2011). 본 결과, AMPK의 활성을 억제하는 compound C를 처리하면 EGCG의 처리에도 불구하고, 지방세포로의 분화를 나타내는 PPAR γ 의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 AMPK의 활성화가 지방세포 분화 억제에 관여하는 것임을 알 수 있었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 AMPK 경로를 통한 EGCG의 지방세포 분화 억제 효과를 알아보기 위해 3T3-L1 세포를 이용하여 실험하

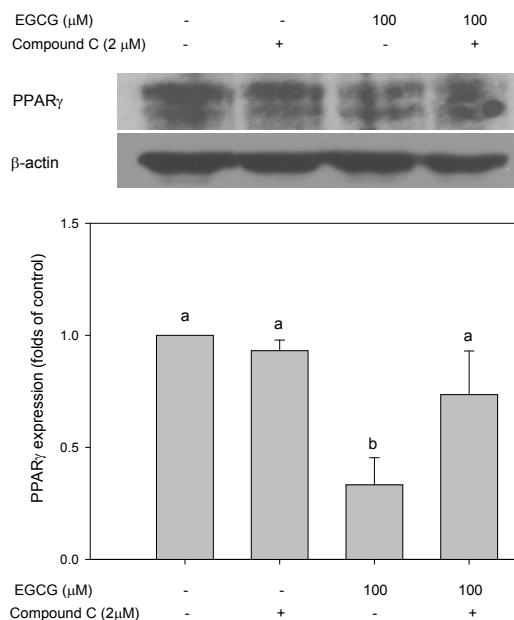


Fig. 5. Effects of EGCG on the ROS production in differentiated 3T3-L1 cells. Each value is expressed as a mean± standard error (n=3). ^{a-b} Means with different letters are significantly different ($p<0.05$) compared to control.

였다. 연구 결과, EGCG는 지방구의 형성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 대조군과 유의한 차이를 보여주었다. 또한, 세포독성은 실험에 사용한 모든 농도(12.5~100 μ M)에서 보이지 않았다. 또한, 지방세포 분화 6일째 EGCG는 지방생성 전사인자인 PPAR γ 의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰으며, 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내었다. EGCG는 AMPK의 활성화를 증가시켰고, ACC의 인산화 또한 증가하였다. AMPK 활성화는 ROS의 생성증가에 의해 유도되는 것으로 보고되어져 있으며, 본 연구에서도 분화초기 EGCG는 ROS의 생성증가를 유도하였다. AMPK pathway의 지방세포 분화억제 작용을 연구하기 위하여 AMPK 활성 억제제인 compound C를 처리하여 확인한 결과, EGCG를 처리하였음에도 불구하고 지방세포 전사인자인 PPAR γ 의 발현이 억제되지 않는 것을 할 수 있었다. 따라서 EGCG는 3T3-L1 세포에서 AMPK의 활성화를 통해 지방세포 분화 억제를 유도하며, 이는 ROS의 생성증가와 관련이 있을 것으로 사료되어진다. 본 연구 결과는 비만의 예방 및 치료를 위한 전략에서 EGCG의 항비만 작용에 대한 정보를 제공함으로써 추후 산업적 응용을 위한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 경성대학교 신입교수정착연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Ahmad N, Mukhtar H. 1999. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* 57:78-83
- Assifi MM, Suchankova G, Constant S, Prentki S, Saha AK, Ruderman NB. 2005. AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *Am J Physiol Endoc M* 289:E794-800
- Carling D, Mayer FV, Sanders MJ, Gamblin SJ. 2011. AMP-activated protein kinase: Nature's energy sensor. *Nat Chem Biol* 7:512-518
- Chan CY, Wei L, Castro-Munozledo F, Koo WL. 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression. *Life Sci* 89:779-785
- Choi JH, Park YH, Lee IS, Lee SP, Yu MH. 2013. Antioxidant activity and inhibitory effect of *Aster scaber* Thunb. extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J Food Sci Technol* 45:356-363
- Choi Y, Kim Y, Ham H, Park Y, Jeong HS, Lee J. 2011. Nobiletin suppresses adipogenesis by regulating the expression of adipogenic transcription factors and the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Agric Food Chem* 59:12843-12849
- Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273:30057-30060
- Daval M, Foufelle F, Ferre, P. 2006. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* 574:55-62
- Foretz MD, Carling D, Guichard C, Ferre P, Fougelle F. 1998. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 273:14767-14771
- Graham HN. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21:334-350
- Habinowski SA, Witters LA. 2001. The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 286:852-856
- Han Y, Wang Q, Song P, Zhu Y, Zou MH. 2010. Redox regulation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS ONE* 5: e15420
- Hardie DG. 2003. The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144: 5179-5183
- Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, Kim YM. 2007. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett* 247:115-121
- 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
- Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. 2000. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 141:980-987
- Kim JD, Lee BI, Jeon YH, Bak JP, Jin HL, Lim BO. 2010. 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* 18:224-230
- Kim Y, Lee J. 2015. Esculetin, a coumarin derivative, suppresses adipogenesis through modulation of the AMPK pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Funct Foods* 12:509-515
- Kim Y, Lee J. 2016. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on

- anti-inflammatory response via heme oxygenase-1 induction during adipocyte-macrophage interactions. *Food Sci Biotechnol* 25:1767-1773
- Lee WJ, Koh EH, Won JC, Kim MS, Park JY, Lee KU. 2005. Obesity: The role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in body weight regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2254-2259
- 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
- Liu HS, Chen YH, Hung PF, Kao YH. 2006. Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Am J Physiol. Endoc M* 290:E273-E281
- 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* 15:2571-2582
- Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y, Tokimitsu I. 2005. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr* 81:122-129
- Oakley FD, Abbott D, Li Q, Engelhardt JF. 2009. Signaling components of redox active endosomes: The redoxosomes. *Antioxid Redox Signal* 11:1313-1333
- Park YB, Lim JH, Seo EW. 2015. Anti-obesity effect of by-product from soybean on mouse fed a high fat diet. *Korean J Plant Res* 28:168-177
- Rosen ED, Hsu CH, Wang S, Sakai X, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2002. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR: a unified pathway. *Genes Dev* 16:22-26
- Sullivan JE, Brocklehurst KJ, Marley AE, Carey F, Carling D, Beri RK. 1994. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett* 353:33-36
- Visscher TL, Seidell JC. 2001. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 22:355-375
- Wang H, Joseph JA. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27:612-616
- White UA, Stephens JM. 2010. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318:10-14

Received 27 July, 2017

Revised 30 August, 2017

Accepted 12 September, 2017