

# 3T3-L1 Adipocyte에 인삼 사포닌과 EGCG (Epigallocatechin Gallate) 처리가 Leptin, Hormone Sensitive Lipase, Resistin mRNA- 발현에 미치는 영향\*

김성옥\*\* · 황은주\*\* · 최원경\*\*\*§

경희대학교 동서의학대학원 의과학과,\*\* 김천대학 식품계열\*\*\*

## The Effects of Ginseng Saponin-Re, Rc and Green Tea Catechine; EGCG (Epigallocatechin Gallate) on Leptin, Hormone Sensitive Lipase and Resistin mRNA Expressions in 3T3-L1 Adipocytes\*

Kim, Sung Ok\*\* · Lee H, Eunjoo\*\* · Choe, Won Kyung\*\*\*§

Graduate School of East West Medical Science,\*\* Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea  
Department of Food and Nutrition,\*\*\* Gimcheon College, Gimcheon 740-704, Korea

### ABSTRACT

The purpose of this study was to find out effects of treatment of ginsenoside Re, Rc and EGCG on mRNA expressions of leptin, hormone sensitive lipase (HSL) and resistin in 3T3-L1 adipocytes. The concentrations of EGCG were treated with  $0.01 \times 10^{-7}$ ,  $0.1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-6}$  M or 100  $\mu$ g/ml ginsenoside Re, Rc in culture cell for 13 days. mRNA expression of leptin wasn't expressed in preadipocyte but according to differentiation of adipocyte, the that of mRNA expression was decreased at ginsenosids or EGCG treated cells compared with non treated adipocyte. Expression of HSL mRNA was increased in G-Re, G-Rc and EGCG treated cells compared with non treated cells. The resistin level was significantly decreased in adipocytes treated with G-Re, G-Rc and EGCG. These pattern was similar to leptin expression. These results support that treatment of ginsenosides or EGCG in 3T3-L1 adipocyte resulted to affect of leptin and resistin as well as HSL mRNA levels, accordingly, levels of leptin and HSL will be acted by signalling body fat stores to the hypothalamus which in turn regulates food intake and energy expenditure to maintain body weight homeostasis. And also regulation of resistin mRNA will prevent to diabetics attacked with obesity. In conclusion, we suggest that consumption of ginseng saponine or EGCG might prevent human diabetics or/and obesity. (Korean J Nutrition 39(8): 748~755, 2006)

KEY WORDS : 3T3-L1 cell, ginsenoside, EGCG, hormone sensitive lipase, leptin, resistin.

### 서 론

최근 우리나라 식생활의 형태가 급격히 서구화되고 경제적인 수입증대로 인하여 생활이 편리화, 자동화되고 발달된 교통수단의 영향으로 현대인들의 신체적 활동량은 과거에

비해 급격히 낮아지고 있다. 이로인하여 비만의 문제는 이제 서구 여러나라의 문제가 아니라 우리나라에서도 심각한 사회문제로 대두되고 있다.<sup>1,2)</sup>

비만은 단순히 외모상의 문제뿐만 아니라 이에 관련된 여러 성인병의 주요한 원인인자로서 작용한다. 즉 당뇨병,<sup>3)</sup> 고혈압,<sup>4)</sup> 심혈관 및 뇌혈관계질환,<sup>5)</sup> 관절염,<sup>6)</sup> 담낭질환,<sup>7)</sup> 유방암 및 대장암<sup>8)</sup> 등의 합병증을 유발하는 인자로 의학적으로는 심각한 질병으로 분류하기도 한다. 정상인에 비해 비만인의 성인병 발생 위험도는 당뇨병은 10배, 고혈압은 4배나 높고 사망률 또한 정상체중의 25%를 초과한 경우 39% 증가되어진다고 보고되었다.<sup>9)</sup> 서구지역에서는 전체 인구의 40~50%가 과체중 또는 비만으로 판정되어 질병

접수일 : 2006년 3월 9일

채택일 : 2006년 11월 1일

\*This study was supported by a grant of the Oriental Medicine R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (01-PJ9-PG1-01C001-0003) to EHL.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : wkchoe@gmail.com

치료에 대한 의료비 지출이 증가되어 심각한 사회 문제로 대두되어지고 있다.<sup>10)</sup> 더욱이 최근 우리나라 비만 발생빈도의 증가는 성인 뿐 아니라 소아비만도 현저히 증가되어 그 심각성은 더하다고 사료되어지므로 비만의 예방 및 치료를 위한 방법들이 시급히 요구되어지고 있다.

인삼은 전통적으로 동양에서 건강증진을 위한 약용으로 오래전부터 사용되어져 오고 있을뿐아니라 인삼차로도 널리 응용되고 있다. 이러한 인삼 또한 면역, 심혈관, 중추신경계, 내분비계 관련 질환에 약리적 효과가 있는것으로 보고 되어지고 있다.<sup>11)</sup> Xie 등은 ob/ob mice에 protopanaxatriol 계의 Re와 ginseng berry 추출액 투여가 체중증가 감소하는 것으로 보고하였다.<sup>12)</sup> Wang 등은 인삼추출액 투여에 따른 지방분해를 보고<sup>13)</sup> 하였고 Liu과 Xiao의 인삼관련 연구보고에서도 인삼의 항비만 효과에 대해 보고하였다.<sup>14)</sup> 인삼의 주요한 약용인자는 인삼사포닌으로 기본 구조는 17개 탄소원자로 된 4개의 링구조를 가지는 gonane steroid nucleus로 이루어져있다. 각 인삼사포닌의 생물학적 특징은 C-3, C-6에 결합하는 sugar moieties의 형태, 위치 그리고 숫자에 따라 각각 달라진다.<sup>15)</sup> 인삼 사포닌은 크게 protopanaxadiol계와 protopanaxatriol계로 분류 되어지는데 주요 인삼사포닌은 protopanaxadiol계에는 Rb1, Rb2, Rc, Rd 그리고 Rh2가 포함되어있으며 protopanaxatriol계에는 Re, Rf, Rg1, Rg2 그리고 Rh1이 각각 포함되어있다.<sup>16)</sup> 본실험에서는 ginseng root의 인삼사포닌으로 protopanaxadiol계의 Rc와 ginseng berry의 인삼사포닌으로 protopanaxatriol계의 Re를 각각 지방세포에 처리하였다.

또한 일상의 음용수로 섭취가 간편하며 섭취에 제한이 따르지 않는 녹차의 섭취에 관심이 높아지고 있는데 녹차는 항산화 작용,<sup>17,18)</sup> 항암작용,<sup>19,20)</sup> 항염증작용,<sup>21)</sup> 혈청 콜레스테롤 농도의 저하 기능<sup>22)</sup> 등에 효과가 있는것으로 보고 되어있으며, 또한 체중과 에너지 소비에도 영향을 미친다고 보고된 바도 있다.<sup>23)</sup> Dulloo 등은 caffeine과 녹차의 polyphenols을 포함하는 녹차 추출물을 섭취한 젊은 남성에서 24시간 에너지 소비와 지방 산화가 증가되었다고 보고하였다.<sup>24)</sup> 녹차내의 polyphenol 성분은 hydroxyl groups, aromatic rings의 숫자와 분자량 그리고 galloy group 존재의 유무에 따라 epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG) 4가지로 분류되어진다. Kao 등은 녹차 카테킨류중 특히 EGCG가 역학적 그리고 임상적 연구조사에서 비만과 당뇨병에 효과가 있는것으로 보고하였다.<sup>25)</sup> Wolfram 등은 EGCG의 항비만 효과를 세포배양과 비만동물모델에서 실험한 결과 EGCG가 지방세포의 분화와 증식에 영향을 미치며

비만동물에서는 지방합성, 지방량, 체중, 혈청 지질, 포도당, 인슐린, 렙틴함량 감소와 지방산 산화와 체내열생성 증가를 보고하였다.<sup>26)</sup> 녹차 폴리페놀은 체중을 감소시키며 특히 실험동물에 EGCG를 공급한결과 실험동물의 식이섭취의 감소를 야기시키므로 체중의 감소효과가 있었음을 보고 하였다.<sup>27,28)</sup>

최근 여러가지 건강관련 문제들 대부분이 체지방량과 밀접한 관계를 가지는 것으로 많은 연구보고가 있다.<sup>1,2,7-10)</sup> 지방조직은 체지방 저장역활뿐만 아니라 내분비기관의 역할도 하여 다양한 signaling molecular factors 즉 interleukin-6, angiotensinogen, leptin, resistin, hormone sensitive lipase, tumor necrosis factor alpha 등을 분비하는 것으로 알려져있으며 이러한 물질들은 체지방량 조절과 관련이 있다고 보고 한다.<sup>29)</sup>

Leptin은 지방세포에서 분비되는 유사 cytokine hormone으로 중추신경계를 통해 식욕과 체중조절을 유도하는것으로 알려져있다.<sup>30)</sup> 또 체지방량은 circulating leptin 양에 따라 영향을 받는다고 보고하였다.<sup>31)</sup> 백색지방세포는 신체의 가장 큰 에너지 저장기관이다. 95% 이상의 체지방이 triacylglycerol형태로 지방세포에 존재하며 소량은 간과 근육에 존재한다.<sup>32)</sup> 지방세포의 지질대사는 호르몬과 영양상태, 운동에 의해 조절되며 이런 일련의 과정은 지방세포대사와 체중 항상성 유지에 필수적이다. 반면 이런 조절과정의 부조는 비만, 인슐린저항성, 제2형 당뇨병같은 병리적상태 유발에 중요한 역할을 한다. 인슐린과 카테콜라민의 영향으로 작용하는 hormone sensitive lipase (HSL)는지방조직 triglyceride의 가수분해하는 제한효소이다. 효소활성은 phosphorylation에 의해 조절된다.<sup>33)</sup> HSL은 rat 지방조직에서 주로 발견되며 84 kDa 단백질로 768개의 아미노산으로 구성되어져있다.<sup>34)</sup> Osuga 등은 HSL 결핍 마우스의 백색지방세포 크기가 매우 커지는 것을 보고 하였을뿐만 아니라 지방세포, 근육그리고 고환에 diacylglycerol축적을 관찰 보고하였다.<sup>35)</sup> Resistin은 11개의 cysteine잔기를 포함하는 94개의 아미노산으로 구성된 12.5 kDa 단백질로 지방세포에서 분비되는 호르몬으로 최근에 발견 되어졌다.<sup>36)</sup> 현재까지도 연구자간의 의견차이가 있기는 하지만 비만에 의해 지방세포에서의 resistin의 분비는 증가되어지는 것으로 알려져있다.<sup>37)</sup> 이 등은 다양한 비만 murine model에서 순환 resistin 수준이 대조군에 비해 증가되어짐을 보고하였다.<sup>38)</sup> Stepan 등은 순환 resistin 수준이 지방, 포도당 그리고 인슐린 수준과 정의 상관관계를 나타낸다고 보고하였다.<sup>39)</sup> Savage 등은 인체의 지방조직에서 resistin 발현이 증가 됨을 보고하였다.<sup>40)</sup>

따라서 지금까지 인삼의 사포닌과 녹차내의 polyphenol 성분 생리활성 효과에 대한 실험은 주로 동물실험이 대부분이며 인삼사포닌과 녹차 카테킨을 지방세포에 처리하여 같이 비교한 실험은 최근까지 보고 된 바 없다. 그리고 인삼 부위별 사포닌을 선택하여 실험에 이용하므로 in vitro 결과가 향후 in vivo 실험에 좋은 기초 자료가 될것이라 생각한다. 따라서 본 실험에서는 지방세포 3T3-L1을 분화 배양하여 2종류의 인삼 사포닌, 100  $\mu\text{g/ml}$  Rc, Re, 과 녹차 카테킨 EGCG를  $0.01 \times 10^{-7}$ ,  $0.1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  M 농도로 각각 처리하여 지방세포로부터 leptin, hormone sensitive lipase, resistin의 mRNA 수준을 확인하여 인삼 사포닌과 녹차카테킨의 비만 관련 인자에 대한 영향을 비교 확인하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 세포배양

본 실험에 사용한지방세포 3T3-L1 배양액은 DMEM 에 1% penicillin-streptomycin, 10% fetal bovin serum 을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 confluent cells (미분화 지방세포, preadipocyte)이 되면, 지방세포로 분화시키기 위해서 배양액에 100 nM insulin (Sigma), 0.25  $\mu\text{M}$  dexametason (Sigma) 그리고 500  $\mu\text{M}$  isobutylmethylxanthine (Sigma)을 섞어서 이틀간 배양하여 분화를 유도 (분화 지방세포, differentiation adipocyte)한 후 100 nM insulin만을 포함하는 DMEM 배양액으로 바꾸어 13일간 배양 (성숙 지방세포, mature adipocyte)하였으며 이틀마다 100  $\mu\text{g/ml}$  인삼 사포닌 Re, Rc (sigma)와 EGCG (epigallocatechin gallate, sigma)를  $0.01 \times 10^{-7}$ ,  $0.1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  M 농도로 각각 3T3-L1 비만 세포에 처리하였다.

### 2. 총 RNA분리

3T3-L1 비만세포에서총 RNA분리를 위해서 trizol reagent (invitrogen Co.) 1 ml을 처리하여 세포를 분리한 후 chloroform을 첨가하여 12,000  $\times$  g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 isopropanol을 가한다.  $-20^\circ\text{C}$ 에서 1시간 방치후 다시 12,000  $\times$  g에서 20분간 원심분리하여 총 RNA를 분리하였다. 이렇게 분리한 RNA는 희석하여 분광광도계로 260/280 nm에서 농도를 측정하였다.

### 3. 역전사중합연쇄반응 (RT-PCR; Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction)

분리한 RNA에 reverse transcriptase를 넣어 cDNA를

**Table 1.** Primers and expected sizes of PCR products with each primer pair

Gene		Primer	Size (bp)
GAPDH <sup>a</sup>	Sens	5'-atcccatcaccatcttccag-3'	576
	Antisens	5'-acctgcttacaccacctcttg-3'	
Leptin	Sens	5'-acatttcacacacgcagctcg-3'	318
	Antisens	5'-ctcaaagccaccacctctg-3'	
HSL <sup>b</sup>	Sens	5'-gtcgccttctcctgatgac-3'	410
	Antisens	5'-cttgctgcttctcttggtc-3'	
Resistin	Sens	5'-cttcaactcctgtttccaa-3'	395
	Antisens	5'-aagatgtgtgctgtgtgtg-3'	

a: Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, b: Hormone Sensitive lipase

합성하였고 Reverse-Transcription반응 과정에서 일차적으로 생성된 cDNA에 sens와 antisens primer를 사용하여 PCR을 시행하여 대량으로 증폭시켰다. 총RNA용액과 RT primer, reverse-transcriptase, 10 mM dNTP를 첨가하여  $42^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. PCR은 PCR 자동화기계에서 template로 cDNA, Taq polymerase, dNTP, primer, 10x buffer 및 d-H<sub>2</sub>O를 첨가하여 총 반응액을 20  $\mu\text{l}$ 로 하여 실험하였다. PCR 조건은 deneturation  $94^\circ\text{C}$  45초 (1 cycle), annealing  $53^\circ\text{C}$  45초, extension  $72^\circ\text{C}$  90초 (29 cycles)으로 사용하였다. 세포내 표준물질로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA를 PCR하여 leptin, hormone sensitive lipase, resistin 유전자 발현정도를 보정하였다. 각유전자의 primer는 Genome Primercenter program을 이용하여 제작하였고 각 유전자의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

### 4. 전기영동

유전자의 발현을 확인하기 위해서 1% agrose gel에 증폭된 DNA 시료를 loading하여 50 mvolt로 전기영동한 후 Et-Br용액으로 10분간 염색하고 3차 증류수로 10분간 destening하여 유전자의 발현을 확인하였다. 그리고 각각의 band intensity는 image analysis software (ImageMaste TotalLab; Pharmacia)가 있는 image documentation system (ImageMaster VDS; Pharmacia)을 사용하여 정량하였다.

### 5. 통계처리

본 실험에 표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation)를 산출하였으며 통계적 유의성이  $p < 0.05$  내에서 검증된 결과를 표시하였다.

## 결 과

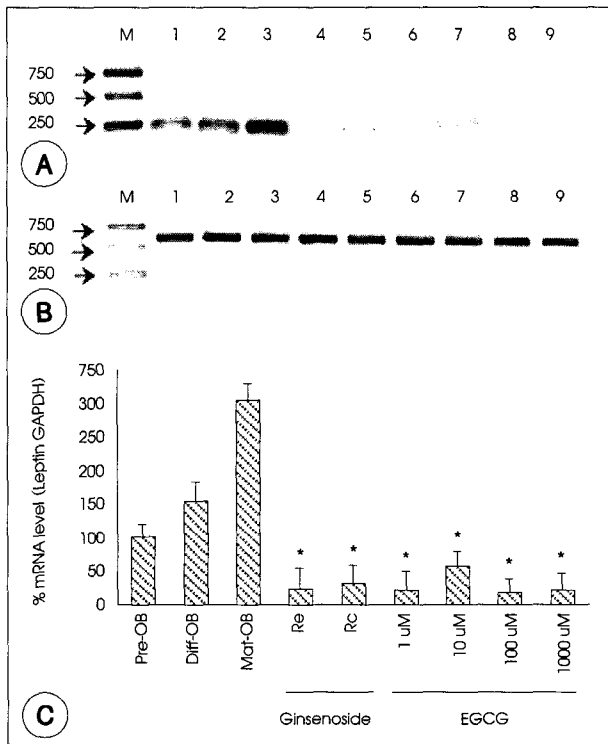
### 1. 3T3-L1 지방세포의 leptin mRNA 발현 비교

완전 분화 지방세포에서 분비되어지는 호르몬인 leptin 농도에 미치는 100  $\mu\text{g/ml}$  인삼 사포닌 Re, Rc와 농도별 EGCG의 영향을 Fig. 1에 나타냈다. Preadipocyte상태의 3T3-L1 세포에서 완전한 성숙 비만세포로 분화되면서 leptin mRNA가 증가 되어짐을 보여 3T3-L1세포의 지방세포 분화가 정상적으로 이루어짐을 알 수 있었다. 본 실험에서는 완전한 지방세포로 분화한 3T3-L1 세포에 인삼 사포닌류와 농도별 EGCG를 각각 처리한 세포에서 처리하지 않은 세포에 비해 leptin mRNA 발현이 90% 이상의 유의적 감소 ( $p < 0.05$ )를 나타내었고 인삼 사포닌 종류에 따른 유의적 차이는 보이지 않았다. 농도별 EGCG 처리 세

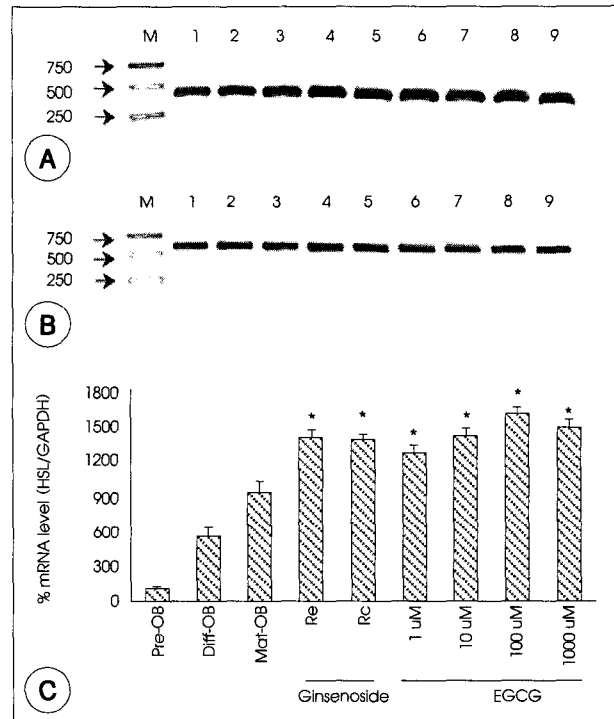
포에서는  $1 \times 10^{-7}$  M농도 처리 세포에서 leptin mRNA의 발현이 95%의 감소로 가장 낮게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 따라서 이러한 결과는 인삼 사포닌과 녹차의 카테킨 모두 성숙 지방세포에서의 leptin 농도에 영향을 미칠수 있을것으로 사료된다.

### 2. 3T3-L1 지방세포의 hormone sensitivity lipase (HSL) mRNA 발현 비교

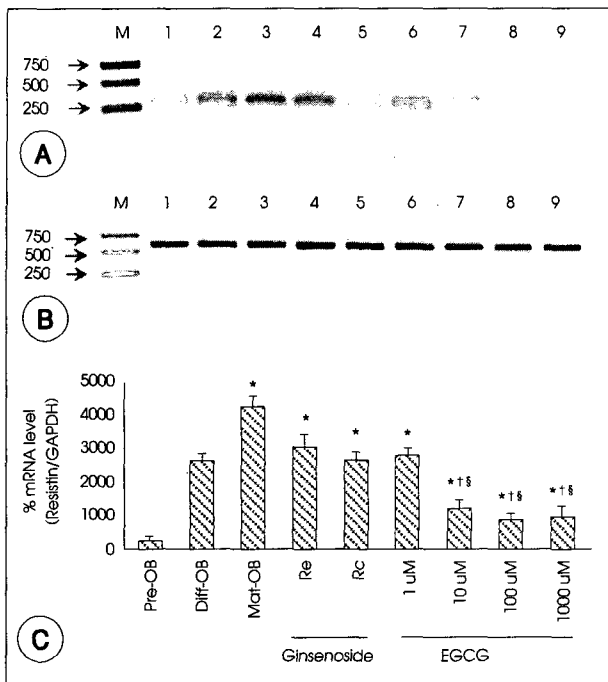
지방세포의 HSL (hormone sensitivity lipase) mRNA의 인삼 사포닌과 농도별 EGCG (epigallocatechin gallate)가 미치는 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 완전 분화세포에 비해 인삼 사포닌 처리 세포에서 HSL mRNA 발현이 52%, 49% 씩 각각 유의적 증가 ( $p < 0.05$ ) 하였고 EGCG를 농도별로 3T3-L1 지방세포에 처리한 결과 37%, 53%, 73%, 60% 씩 각각 증가하였으며  $1 \times 10^{-7}$  M을 처리했을때 73% HSL mRNA 발현의 유의적 증가를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1.** Effects of herbal medicines, ginsenoside Re, RC and EGCG, on gene expression of leptin in 3T3-L1 adipocytes. Lane 1, preadipocyte (Pre-OB); lane 2, differentiation adipocyte (Diff-OB); lane 3, mature adipocyte (Mat-OB); lane 4, 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginsenoside-Re; lane 5, 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginsenoside-Rc; lane 6, 0.01  $\times 10^{-7}$  M EGCG; lane 7, 0.1  $\times 10^{-7}$  M EGCG; lane 8, 1  $\times 10^{-7}$  M EGCG; lane 9, 1  $\times 10^{-6}$  M EGCG (A). Leptin, 319 bp (B), GAPDH, 579 bp (C). The data represents the mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments expressed as a percentage of the control value. The data were evaluated for statistic significance with a one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. The means with \* was statistically different compared with Mat-OB. A p value  $< 0.05$  was considered significant.



**Fig. 2.** Effects of herbal medicines, ginsenoside Re, RC and EGCG, on gene expression of hormone sensitive lipase (HSL) in 3T3-L1 adipocytes. Lane 1, preadipocyte (Pre-OB); lane 2, differentiation adipocyte (Diff-OB); lane 3, mature adipocyte (Mat-OB); lane 4, 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginsenoside-Re; lane 5, 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginsenoside-Rc; lane 6, 0.01  $\times 10^{-7}$  M EGCG; lane 7, 0.1  $\times 10^{-7}$  M EGCG; lane 8, 1  $\times 10^{-7}$  M EGCG; lane 9, 1  $\times 10^{-6}$  M EGCG (A). HSL 410 bp (B), GAPDH, 579 bp (C). The data represents the mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments expressed as a percentage of the control value. The data were evaluated for statistic significance with a one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. The means with \* was statistically different compared with Mat-OB. A p value  $< 0.05$  was considered significant.



**Fig. 3.** Effects of herbal medicines, ginsenoside Re, Rc and EGCG, on gene expression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. Lane 1, preadipocyte (Pre-OB); lane 2, differentiation adipocyte (Diff-OB); lane 3, mature adipocyte (Mat-OB); lane 4, 100 µg/ml Ginsenoside-Re; lane 5, 100 µg/ml Ginsenoside-Rc; lane 6, 0.01 × 10<sup>-7</sup> M EGCG; lane 7, 0.1 × 10<sup>-7</sup> M EGCG; lane 8, 1 × 10<sup>-7</sup> M EGCG; lane 9, 1 × 10<sup>-6</sup> M EGCG (A). Resistin, 395 bp (B), GAPDH, 579 bp (C). The data represents the mean ± s.d. of three independent experiments expressed as a percentage of the control value. The data were evaluated for statistic significance with a one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. The means with \* was statistically different compared with Mat-OB. † compared with ginsenoside Re. § compared with ginsenoside Rc. A p value < 0.05 was considered significant.

이러한 결과는 각각의 인삼사포닌 처리와 EGCG 처리가 완전 분화세포의 성숙에 영향을 미치는 지방 축적을 저해하는 효과를 가지는 것으로 사료된다. 그리고 인삼 사포닌의 종류나 EGCG의 농도별 처리에 따른 농도 의존적인 차이는 보이지 않았다.

### 3. 3T3-L1 지방세포의 resistin mRNA 발현 비교

지방세포에 인삼사포닌과 농도별 EGCG 처리에 따른 resistin mRNA 발현을 나타내었다 (Fig. 3). Preadipocyte에서 resistin mRNA 발현은 매우 낮게 나타났으며 분화되어 완전히 성숙한 지방세포에서 현저한 증가를 나타내었으나 인삼 사포닌을 각각 처리한 세포에서는 resistin mRNA 발현이 29%, 38% 씩 각각 감소되었다. 농도별 EGCG 처리한 세포에서는 34%, 71%, 81%, 77% 씩 각각 감소하였다. 인삼사포닌 처리 세포에 비해 EGCG 처리세포에서 resistin 발현이 유의적인 감소를 보였다 (p < 0.05). 이러한 결과는 정상인에 비해 비만인과 당뇨병환자의 혈청과 adi-

pose tissues에서 더 많이 발현되는 resistin mRNA에 인삼사포닌과 녹차카테킨인 EGCG가 영향을 미치는 것을 보여줌으로써 인삼사포닌과 EGCG가 비만뿐만 아니라 비만과 관련한 제2형 당뇨와 관련된 resistin 발현을 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

## 고 찰

본 실험의 목적은 3T3-L1 지방세포에서 분비되는 leptin, hormone sensitive lipase (HSL), resistin mRNA 유전자 발현에 인삼사포닌 ( Rc, Re )과 농도별 EGCG 처리에 따른 영향을 알아보기 위해 실험하였다. 지방조직은 다양한 기능을 가지는 여러 종류의 signaling molecular factors인 leptin, HSL, resistin, tumor necrosis factor α (TNF-α) 등을 분비하는 것으로 알려져 있다.<sup>29,41,42)</sup>

최근 인간과 설치류의 성숙한 지방조직에서 분비되는 대표적인 peptide hormone인 leptin은 167개의 아미노산으로 구성된 단백질이다. 렙틴은 뇌의 중추신경계를 통하여 식욕, 에너지 균형을 조절하여 체지방과 이상체중의 항상성 피드백을 유지하는 물질로 보고되고 있다.<sup>30,43)</sup> 김 등은 고지방식이 유도 비만 흰쥐에 의이인 추출액의 hypolipidemic 영향에 대한 실험에서 정상식이군에 비해 8주간 고지방식이군에서 식이섭취량과 에너지소비를 증가시키는 leptin mRNA 발현이 유의적으로 증가하였으며 백색지방세포 크기 및 지방조직량과 정의상관 관계를 나타내었다고 보고하였다.<sup>44)</sup> Maffei 등은 작은 크기의 지방세포보다 큰 지방세포에서 leptin mRNA 수준이 높다고 보고하였다.<sup>45)</sup> 김 등은 5주간 고지방식이 유도 비만 흰쥐에 200 mg/kg 홍삼 조사포닌을 3주간 투여 하였을 때의 효과를 연구한 실험에서 체중, 식이섭취량 감소와 식욕조절 관련 시상하부의 neuropeptide Y 발현과 혈중 leptin 량의 감소를 보고하였다.<sup>46)</sup> 본 실험에서 미분화 지방세포에 비해 완전분화 지방세포에서 leptin mRNA 발현량의 현저한 증가를 보였을 뿐만 아니라 완전분화 지방세포 비해 100 µg/ml 인삼사포닌 처리 세포에서 90%, 폴리페놀릭 프라보노이드인 녹차 카테킨 처리 세포 (1 × 10<sup>-7</sup>)에서는 거의 95%의 유의적 감소를 각각 보였다. 이러한 결과는 인삼사포닌과 녹차 카테킨이 호르몬 유도 분화로 완전 분화 지방세포에서 HSL의 phosphorylation을 유도하여 활성화하여 지방분해를 증가시키므로써 free fatty acid의 분비가 증가되고 저장 지방은 감소되어 지방세포의 크기의 감소 또는 세포의 proliferation을 억제하므로 leptin mRNA 발현을 감소 시키는 것으로 사료된다. 따라서 인삼사포닌과 녹차 카테킨은 지방세포에 저장되어진

중성지방을 가수분해하여 체지방량 감소와 지방세포의 크기를 감소 시키므로 과도한 체지방양으로 초래되는 비만을 감소시킬수 있다고 사료된다.

지방세포의 지질대사에 중요한 역할을 하는 hormone sensitive lipase (HSL)는 체지방조직 (백색지방세포, 갈색지방세포), 심근조직 및 골격근에서 주로 존재하며 저장 triacylglycerol 가수분해에 관여 체지방량과 체중조절에 중요한 역할을 한다.<sup>47,48)</sup> Hung 등은 EGCG가 미분화 3T3-L1에서 phosphor-ERK (extracellularsignal-regulated kinase)1과 phosphor-ERK2 수준을 감소 시키므로 지방세포에서 ERK signaling pathway를 억제하므로써 지방합성 감소를 초래한다고 보고하였다.<sup>49)</sup> O'Rourke 등은 3T3-L1 지방세포에서 고농도의 포도당 상태에서 인슐린에 의해 HSL이 증가한다고 보고 하였다.<sup>50)</sup> 본 실험의 결과 완전 분화 지방세포 비해 100 µg/ml 인삼사포닌을 처리한 완전 분화 지방세포에서 50%의 HSL mRNA 증가를 그리고 농도별 EGCG를 처리한 완전 분화 지방세포에서는 37%, 53%, 73%, 60% 씩 각각 증가를 나타내었다. 따라서 인삼사포닌과 녹차 카테킨이 HSL mRNA를 조절하여 지방세포에서 signaling pathway에 영향을 미치거나 지방산화를 증가시켜 지방조직의 저장지방의 분해를 촉진하여 체지방량을 감소시키므로 체중조절에 영향을 미칠것으로 사료된다.

지방축적과 인슐린 저항성을 유도한다고 알려진 resistin은 비만뿐만아니라 비만과 관련된 당뇨병과도 관련이 있다고 보고되어지고 있다.<sup>51)</sup> McTernan 등은 인체의 다른 지방조직보다 복부지방조직에서 resistin 발현이 증가 됨을 보고 하였다.<sup>52)</sup> Zhang 등은 혈청 resistin과 체지방량이 정의 상관관계를 가진다고 보고하였다.<sup>37)</sup> 몇몇 연구자들은 resistin이 포도당 생성과 이동, 인슐린 저항 그리고 지방세포의 지방합성을 조절한다고 보고한다.<sup>39,52-54)</sup> Liu 등은 녹차 카테킨 EGCG가 3T3-L1 비만세포에서 ERK 경로 의존적으로 resistin 발현을 조절한다고 보고 하였다.<sup>28)</sup> Xie 등은 *ob/ob* 마우스에서 인삼사포닌 Re 투여후 마이크로 어레이를 이용하여 유전자의 변화를 조사한 결과 지방대사 관련 유전자, lipoprotein lipase, stearyl-CoA desaturase, fatty acid synthase 발현의 감소와 lipid catabolic gene phospholipase A2 group VII와 myosin heavy polypeptide 8의 발현의 증가를 나타내었다고 보고하였다.<sup>55)</sup> 본 실험에서도 EGCG와 인삼사포닌을 각각 처리한 세포에서 위의 실험결과들과 동일한 resistin mRNA 발현 감소를 나타내었다. 따라서 녹차 카테킨과 인삼사포닌이 지방세포에서의 ERK signaling pathway, Cdk2 pathway 또는 지방대사 관련 유전자 등의 발현에 영향을 미쳐 resistin mRNA 발

현을 감소시키므로 비만 뿐만아니라 비만으로 인한 당뇨병의 인슐린 저항성 개선에도 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

## 요약 및 결론

이상을 종합하면 3T3-L1 지방세포에 100 µg/ml 인삼사포닌과 농도별 녹차 카테킨 (1~1,000 µM EGCG)을 각각 처리한 결과 HSL 발현이 증가 하였고, leptin은 유의적으로 감소하였으며, resistin mRNA 발현은 유의적 감소를 나타내었다. 인삼 사포닌 종류에 따른 차이는 볼수 없었고 100 µM EGCG 농도 처리가 각 지표들의 mRNA 발현에 유의적 차이를 나타내었다. 결론적으로 인삼사포닌과 폴리페놀릭 프라보노이드인 녹차 카테킨 EGCG가 지방세포에서 leptin, HSL, resistin mRNA 발현에 영향을 끼쳐 지방대사 조절 즉 중성지방 분해 및 지방산화 촉진하여 체지방 분해를 증가시키므로써 체지방 감소로 비만개선 효과가 있을것으로 사료된다.

## Literature cited

- 1) Popkin BM, Doak CM. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev* 56: 106-114, 1998
- 2) Korea Ministry of Health and Social Affairs. National Nutrition Survey Report, 2000
- 3) Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-481, 2000
- 4) Neuhaus ML, Miller DL, Kristal AR, Barnett MJ, Cheskin LJ. Diet and exercise habits of patients with diabetes, dyslipidemia, cardiovascular disease or hypertension. *J Am Cell Nutr* 21: 394-401, 2002
- 5) Hennig B, Toborek M, McClain CJ. High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J Am Cell Nutr* 20: 97-105, 2001
- 6) Gelber AC. Obesity and hip osteoarthritis: the weight of the evidence is increasing. *Am J Med* 114: 158-159, 2003
- 7) Torgerson JS, Lindroos AK, Naslund I, Peltonen M. Gallstones, gallbladder disease, and pancreatitis: cross-sectional and 2-year data from the Swedish Obese Subjects (SOS) and SOS reference studies. *Am J Gastroenterol* 98: 1032-1041, 2003
- 8) Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res* 10: 97-104, 2002
- 9) Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 39-47, 1998
- 10) Kuczmarski RJ, Carroll MD, Flegal KM, Troiano RP. Varying body mass index cutoff points to describe overweight prevalence among U.S. adults: NHANES III (1988 to 1994). *Obes Res* 5: 542-548, 1997

- 11) Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 58: 1685-1693, 1999
- 12) Xie JT, Zhou YP, Dey L, Attele AS, Wu JA, Gu M, Polonsky KS, Yuan CS. Ginseng berry reduces blood glucose and body weight in db/db mice. *Phytomedicine* 9: 254-258, 2002
- 13) Wang H, Reaves LA, Edens NK. Ginseng extract inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro by activating phosphodiesterase 4. *J Nutr* 56: 337-342, 2006
- 14) Liu CX and Xiao PG. Recent advances on ginseng research in China. *J Ethnopharmacol* 36: 27-38, 1992
- 15) Liu WK, Attele AS, Kyle JW, Yuan C. Voltage-dependent inhibition of brain Na<sup>(+)</sup> channels by American ginseng. *Eur J Pharmacol* 413: 47-54, 2001
- 16) Han KL, Jung MH, Sohn JH, Hwang JK. Ginsenoside 20(s)-protopanaxatriol (PPT) activates peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) in 3T3-L1 adipocytes. *Biol Pharm Bull* 29: 110-113, 2006
- 17) Liao S, Kao YH, Hiipakka RA. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. *Vitam Horm* 62: 1-94, 2001
- 18) Weinreb O, Mandel S, Youdim MBH. cDNA gene expression profile homology of antioxidants and their antiapoptotic and proapoptotic activities in human neuroblastoma cells. *FASEB J* 17: 935-937, 2003
- 19) Ahmad N, Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* 57: 78-83, 1999
- 20) Lin JK, Liang YC, Lin-Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 58: 911-915, 1999
- 21) Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK, Mukhtar H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4524-4529, 1999
- 22) Yeh CW, Chen WJ, Chiang CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of fatty acid synthase in MCF-7 breast cancer cells by tea and tea polyphenols: a possible mechanism for their hypolipidemic effects. *Pharmacogenomics J* 3: 267-276, 2003
- 23) Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of obesity by a green tea catechin. *Am J Clin Nutr* 72: 1232-1241, 2000
- 24) Dulloo AG, Duret C, Rohrer D, Girardier L, Mensi N, Fathi M, Chantre P, Vandermander J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 70: 1040-1045, 1999
- 25) Kao YH, Chang HH, Lee MJ, Chen CL. Tea, obesity, and diabetes. *Mol Nutr Food Res* 50: 188-210, 2006
- 26) Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res* 50: 176-87, 2006
- 27) Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: interaction between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 252-258, 2000
- 28) Liu HS, Chen YH, Hung PF, Kao YH. Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E273-E283, 2006
- 29) Li J, Yu X, Pan W, Unger RH. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: 1334-1341, 2002
- 30) Isaia GC, D'Amelio P, Di Bella S, Tamone C. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Endocrinol Invest* 28: 61-65, 2005
- 31) Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Kawada T, Fushiki T, Nakao K. Augmented expression of the obese gene in the adipose tissue from rats fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 355-358, 1995
- 32) Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lip Res* 35: 177-193, 1994
- 33) Langin D, Holm C, Lafontan M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proceed Nutr Soc* 55: 93-109, 1996
- 34) Holm C, Davis RC, Osterlund T, Schotz MC, Fredrikson G. Identification of the active site of hormone-sensitive lipase by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 344: 234-238, 1994
- 35) Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 787-792, 2000
- 36) Levy JR, Davenport B, Clore JN, Stevens W. Lipid metabolism and resistin gene expression in insulin-resistant Fischer 344 rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E-626-E623, 2002
- 37) Zhang J, Qin Y, Zheng X, Qiu J, Gong L, Mao H, Jia W, Guo J. The relationship between human serum resistin level and body fat content, plasma glucose as well as blood pressure. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82: 1609-1612, 2002
- 38) Lee JH, Bullen Jr JW, Stoyneva VL, Mantzoros CS. Circulating resistin in lean, obese and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E625-E632, 2005
- 39) Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature (London)* 409: 307-312, 2001
- 40) Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-g action in humans. *Diabetes* 50: 2199-2202, 2001
- 41) Akmaev IG, Sergeev VG. Neuroimmunoendocrinology of the fat tissue. *Usp Fiziol Nauk* 33: 3-16, 2002
- 42) Flier JS. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell* 80: 15-18, 1995
- 43) Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161, 1995
- 44) Kim SO, Yun SJ, Jung B, Lee EH, Shim I, Lee HJ. Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. mayuen) in obesity rat fed high fat diet: Relations of TNF- $\alpha$  and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sci* 75: 1391-404, 2004
- 45) Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Nègre R, Ailhaud G, Friedman JM. Increased expression in

- adipocytes of ob RNA in mice with lesions of hypothalamus and with mutations at the ob locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6957-6960, 1995
- 46) Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. *J Pharmacol Sci* 97: 124-131, 2005
  - 47) Masuno H, Okuda H. Glycosylation and secretion of lipoprotein lipase by 3T3-L1 adipocytes: effects of brefeldin A. *J Atheroscler Thromb* 2: 46-52, 1995
  - 48) Inoue M, Wu CZ, Dou DQ, Chen YJ, Ogihara Y. Lipoprotein lipase activation by red ginseng saponins in hyperlipidemia model animals. *Phytomedicine* 6: 257-265, 1999
  - 49) Hung PF, Wu BT, Chen HC, Chen YH, Chen CL, Wu MH, Liu HC, Lee MJ, Kao YH. Antimitogenic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1094-108, 2005
  - 50) O'Rourke L, Gronning LM, Yeaman SJ, Shepherd PR. Glucose-dependent regulation of cholesterol ester metabolism in macrophages by insulin and leptin. *J Biol Chem* 277: 42557-42562, 2002
  - 51) Hartman HB, Hu X, Tyler KX, Dalal CK, Lazar MA. Mechanisms regulating adipocyte expression of resistin. *J Biol Chem* 277: 19754-19761, 2002
  - 52) McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2407-2410, 2002
  - 53) Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, and Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198, 2004
  - 54) Kim KH, Zhao L, Moon Y, Kang C, Sul HS. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6780-6785, 2004
  - 55) Xie JT, Mehendale SR, Li X, Quigg R, Wang X, Wang CZ, Wu JA, Aung HH, A Rue P, Bell GI, Yuan CS. Anti-diabetic effect of ginsenoside re in ob/ob mice. *Biochim Biophys Acta* 1740: 319-325, 2005