

진세노사이드 Rd의 AMPK 및 PPAR 감마의 신호전달경로를 통한 항비만효과

김명선 · 이명수 · 김순희 · 김성희 · 김현진 · 성미정 · 김혜영 · 권대영 · †황진택
한국식품연구원 식품 융·복합본부, 기능성연구단
(접수 : 2007. 8. 8., 게재승인 : 2007. 10. 23.)

Anti-obesity Effects of Ginsenoside Rd via AMPK and PPAR Gamma

Myung Sunny Kim, Myoung Soo Lee, Soon Hee Kim, Sung Hee Kim, Hyun Jin Kim, Mi Jeong Sung,
Hye Young Kim, Dae Young Kwon, and Jin-Taek Hwang†
Food Function Research Center, Food Convergence Technology Division,
Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea
(Received : 2007. 8. 8., Accepted : 2007. 10. 23.)

Obesity is a major obstacle for human health, which induces various diseases such as cardiac injury and type 2 diabetes. Ginsenosides, active components of ginseng extract, exert various physiological effects. However, There are still no evidence for their anti obesity effects. In this study, we investigated the effects of ginsenoside Rd on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Our data show that ginsenoside Rd (80 uM) was effective in adipocyte differentiation inhibition. These inhibitory effects of ginsenosides on adipocyte differentiation were accompanied by PPAR gamma inhibition in rosiglitazone-treated cells. We also tested whether AMP-activated protein kinase (AMPK) activation was involved in the effects of these ginsenosides. AMPK is a master target for obesity. ginsenoside Rd significantly activated AMPK. Taken together, these results suggest that the anti obesity effects of ginsenoside Rd involve the AMPK signaling pathway and PPAR-gamma inhibition.

Key Words : Anti-obesity, ginsenoside, AMP-activated protein kinase, PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor), 3T3-L1 adipocyte

서 론

서구화된 식습관에서 비롯된 비만은 다양한 질병을 유발하고 현대사회에 있어서 극복해야 할 가장 큰 과제로 나타나고 있다. 특히 다양한 소재로부터 비만을 극복하기 위한 여러 가지 물질들을 탐색하고 있으나 현재까지 뚜렷한 개선점을 보이지 못하고 있다. 최근에는 세포 내 수준에서 비만관련 단백질 제어를 통해 비만을 제어할 수 있는 몇 가지의 방법들이 제공되고 있으나 그것의 정확한 기작에 대한 연구가 미미한 실정이다.

진세노사이드는 인삼의 구성물로서 최근에 그것의 생리

학적 중요성이 대두되고 있다. 특히 진세노사이드는 암을 예방할 수 있음이 보고가 되었으며(1), 최근엔 혈당을 흡수할 수 있어 당뇨병의 개선효과를 나타낼 수 있음을 보고하였다(2). 그럼에도 불구하고 진세노사이드의 항비만 효과에 대한 연구는 현재까지 보고된 바가 없다.

이에 본 연구에서 진세노사이드 Rd의 알려진 항암작용, 부신피질호르몬촉진작용에 더하여 항비만 효과를 가지고 있는지 아닌 지를 알아보기 위해 다양한 실험을 진행하였는데 특히 에너지 대사의 촉진에 있어서 중요한 단백질인 AMP-activated protein kinase의 활성을 측정하였으며, 항비만 효과를 다시 구체화하기 위해 PPAR 감마의 활성화에 대한 실험을 진행하였다.

AMPK는 세포내 AMP를 감지하여 활성화되는 단백질로서 ATP를 소모하는 신호전달경로를 억제하고 ATP를 합성하는 신호전달경로를 활성화하여 외부 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 대표적인 단백질이다(3). 최근

† Corresponding Author : Food Function Research Center, Food Convergence Technology Division, Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

Tel : +82-31-780-9315, Fax : +82-31-709-9876

E-mail : jthwang@kfri.re.kr

에 다양한 AMPK의 기능이 보고가 되고 있으며 특히 항비만의 타겟분자로 AMPK의 중요성이 대두 되고 있다(4). 한편 PPAR감마는 지방세포의 분화가 진행되면서 발현과 활성이 증가하는 또 하나의 대표적 항비만의 마커가 되고 있는데 이것의 활성을 억제하면 항비만 효과를 나타내는 것으로 잘 알려져 있다(5).

이에 본 연구에서 진세노사이드 Rd가 비만억제 효과가 있는지를 알아보고 이에 더하여 비만의 마커가 되는 AMPK와 PPAR 감마의 transcriptional activity를 측정하여 데이터의 신뢰도를 높이고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 재료

3T3-L1 pre-adipocyte cell은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 3T3-L1세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum에서 배양하였다. AMPK Thr¹⁷², β -actin antibody는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), Insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and dexamethasone은 sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

지방분화

3T3-L1-preadipocyte cell은 12-well plate에 seeding하였다. 이틀 후에 adipocyte differentiation은 hormone cocktail containing 1 M dexamethasone, 5 g/mL insulin, and 0.5 mM IBMX과 함께 유도하였다. 이틀 후에, medium은 normal medium containing insulin (5 g/mL)으로 바꿔주었다.

단백질 추출 및 웨스턴 블롯팅

세포는 ice-cold phosphate-buffered saline (PBS)에 두 번 washing하였다, 그 후 lysis buffer (50 Tris - HCl [pH 7.4], 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 NaCl, 1 EDTA, 1 PMSF, 1sodium orthovanadate, 1 NaF, 1 g/mL aprotinin, 1 g/mL leupeptin, and 1 g/mL pepstatin)를 이용하여 세포를 모은 후 단백질 발현을 western blot으로 확인하였다.

지방 염색

완전한 지방분화 후에 세포는 3.5% formaldehyde로 20분 동안 고정 후 Oil Red O dye (Sigma)를 이용하여 2시간 동안 염색한 후 세포를 washing후에 Fat droplets는 현미경으로 관찰하였다.

PPAR감마 전사활성측정

HEK 293세포는 PPAR- γ , RXR α , β -galactosidase and α luciferase reporter plasmid, PPAR response element (PPRE)와 함께 transfection하였다. 24시간 후에, 세포를 각각 시료처리 후 lysis하여 Cell lysate를 Luciferase assay reagent (Promega, Madison, WI)와 mix하였다. Luciferase activity는 ELISA로 측정하였다.

Statistical analysis

Data는 적어도 3번 반복한 실험으로 mean \pm S.E.M으로 나타내었다(P values < 0.05).

결과 및 고찰

진세노사이드 Rd의 지방분화 억제 효과

여러 가지 진세노사이드 중 Rd의 지방분화 억제효과를 알아보기 위해서 3T3-L1 adipocytes에 각각 40 μ M, 80 μ M의 ginsenoside Rd를 처리하였다(day 0), 그리고 같은 조건에서, 지방세포분화를 hormonal cocktail을 가지고 실시하였다. 6일 후에, 지방세포분화를 마치고 세포의 지방을 Oil Red O staining방법으로 실시하였다. Fig. 1에서 보여주듯 3T3-L1 지방세포에 ginsenoside Rd를 처리할 경우 지방의 생성이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이들의 결과로 ginsenoside Rd는 3T3-L1세포에서 효과적으로 지방분화를 억제하는 것을 알 수 있었으며 항비만 효과의 가능성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

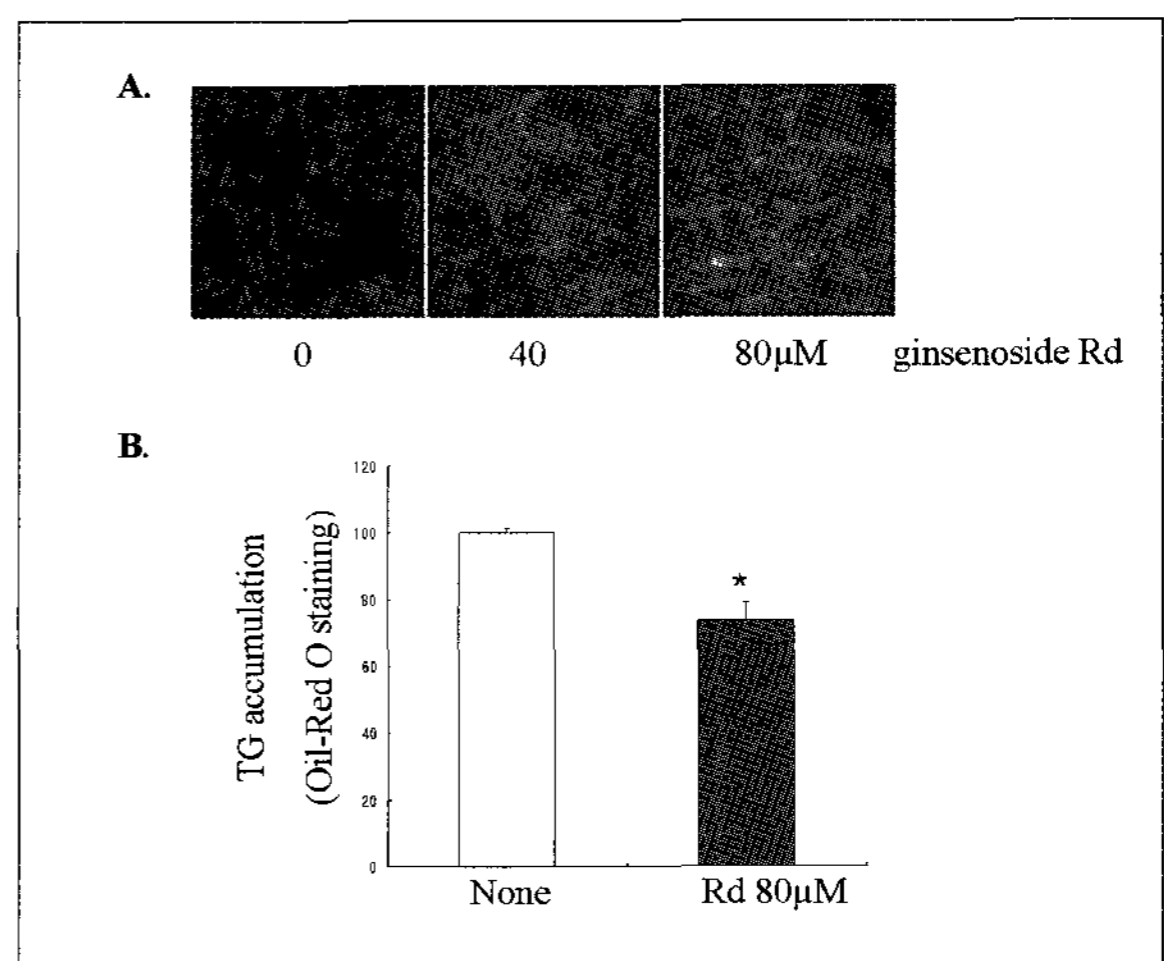


Figure 1. The effects of ginsenoside Rd on adipocyte differentiations 3T3-L1 cells were treated with ginsenoside Rd (40, 80 μ M). After 6 days from differentiation initiations, lipid accumulations were stained with Oil Red O staining and morphological changes were detected by microscope (A). In the same conditions, Oil-Red O stained lipids were washed with isopropanol, then the amount of lipid was determined by ELISA Reader (510 nm) (B). *significant at $P < 0.05$

AMPK활성화에 대한 진세노사이드 Rd의 효과

최근의 보고에 따르면 AMPK는 세포내 대사중심 단백질로서 활성화 되었을 때, 지방 분화과정 같은 단백질합성신호전달 경로를 억제하는 것으로 나타나고 있다(6). 이에 우리는 다음으로 진세노사이드 Rd의 지방분화 억제효과에 있어서 AMPK 신호전달경로를 통하는지 아닌지를 알아보기 위해 웨스턴 블롯팅을 이용하여 그 효과를 관찰하였다. 이를 위하여 세포를 분화한 후 진세노사이드 Rd를 각각 처리한 후 AMPK활성화를 측정하였다(Fig. 2). Fig. 2에서 보여주는 것처럼 AMPK의 활성화는 농도의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수가 있었다. 이들 결과가 나타내는 것

은 진세노사이드 Rd의 지방분화억제효과에 있어서 AMPK 신호전달경로의 활성화가 필요함을 알 수 있었다.

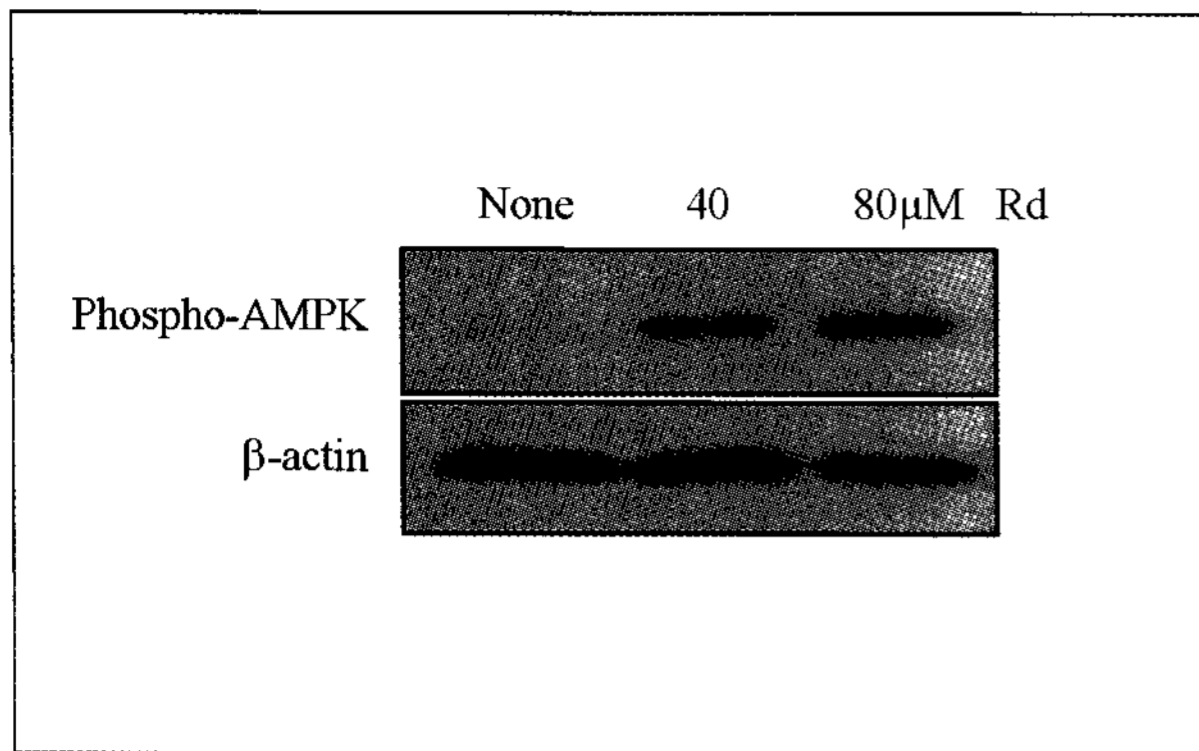


Figure 2. The effect of ginsenosides on AMPK activation in differentiated 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with ginsenoside Rd for 1 h in a dose dependent manner and then cells were lysed with cell lysis buffer. Western blotting was performed.

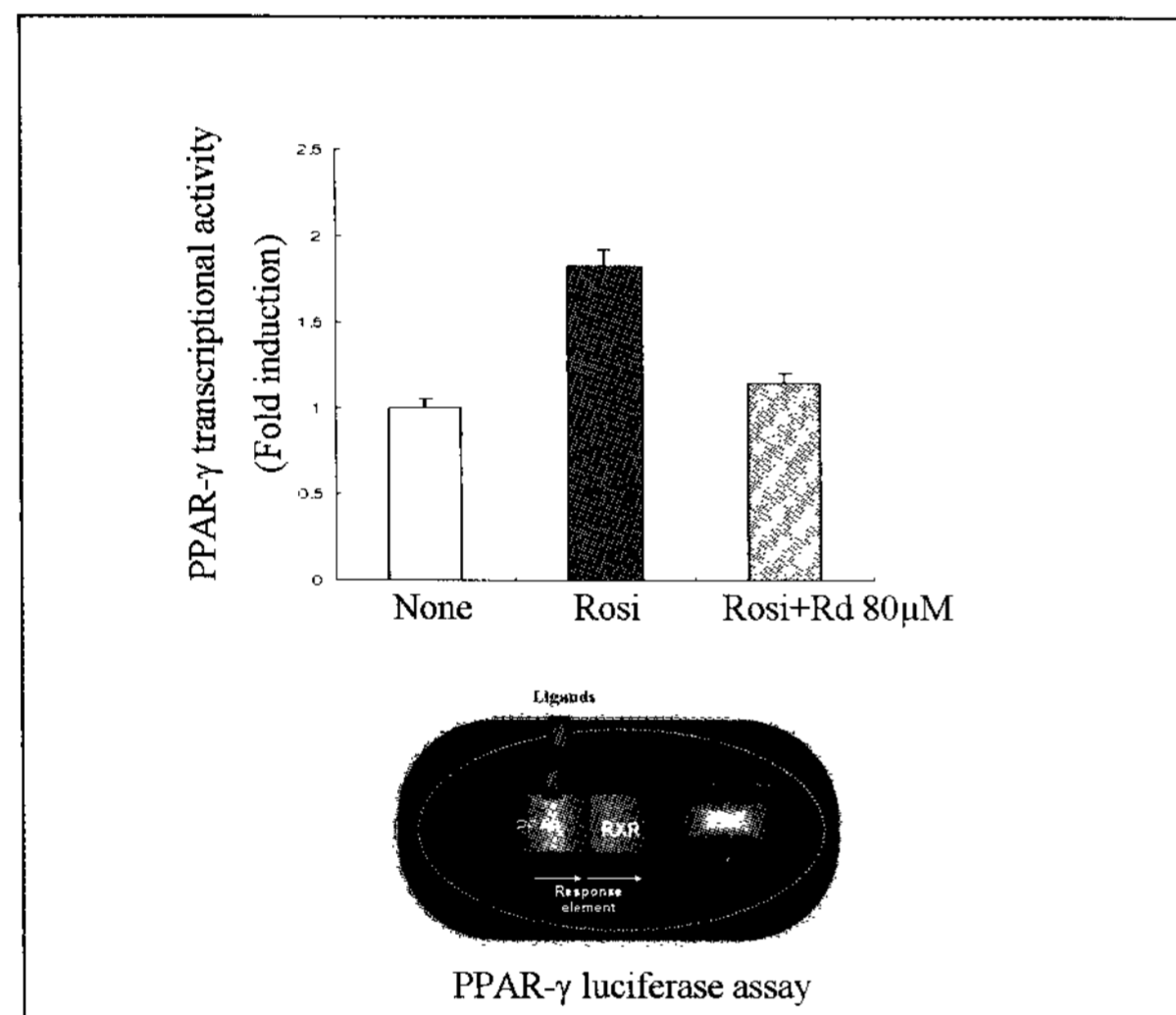


Figure 3. Ginsenoside Rd significantly inhibits PPAR gamma transcriptional activity HEK293 cells were co-transfected with PPAR-g expression vector and the PPRE-luc vector. After 24 h, cells were exposed to ginsenoside Rd (80 μM) in absence or presence rosiglitazone. Luciferase activity was measured with luciferase assay kit (Promega).

진세노사이드 Rd의 PPAR감마 전사활성에 대한 효과

PPAR감마의 전사활성 또한 지방세포분화과정에 필수적인 것으로서 이것의 억제가 항비만 효과에 중요한 타겟이 됨이 보고가 되어 있다(7). 이에 우리는 다음으로 진세노사이드 Rd가 PPAR감마의 전사활성 억제에 효과를 줄 수 있는지 아닌지를 test 하기 위해 다음실험을 진행하였다. 이를 위하여 HEK293 cells을 normal배지에 배양한 후 70% confluent할 때 세포에 각각의 지시된 plasmid를 transfection 하였다. 그 후 PPAR-activation 은 luciferase activity assay에 의해 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 PPAR- transcriptional activity는 PPAR감마의 agonist인 rosiglitazone에 의해 활성화 되는데 진세노사이드 Rd가 이것의 전사활성을 억제하는 것으로 관찰하였다. 이들 결과로 유추할 수 있는 것은

항 비만의 타겟이 되는 PPAR 감마의 전사활성 또한 진세노사이드 Rd가 효과적으로 억제하는 것으로 보아 진세노사이드 Rd는 비만억제에 효과가 탁월함을 알 수 있었다.

고찰

인삼의 다양한 효능은 동양권 나라에서 예로부터 잘 알려져 있으며 여러 가지 유효성분들이 계속하여 보고가 되어지고 있다. 최근 연구에 따르면 인삼의 배당체인 진세노사이드 역시 다양한 인체 내 생리학적 역할이 소개되고 있으며 특히 항암 및 혈압강하 그리고 당뇨효과는 비교적 잘 알려져 있다. 그러나 비만억제 효과 및 정확한 기작에 대한 연구는 미미한 실정이다.

최근에 우리는 다양한 식품 속에 존재하는 genistein, EGCG, 그리고 capsaicin이 AMPK를 농도 의존적으로 증가시키고 이로서 지방의 생성을 억제한다는 것을 보고하였다(8). 이로서 AMPK 신호전달경로가 다양한 식품소재에 의한 항비만 효과에 있어서 중요함을 알 수 있었다. 이런 선행연구를 바탕으로 하여 지방세포의 분화억제 효과가 있는 하나의 식품소재인 진세노사이드 역시 AMPK 신호전달 경로에 영향을 줄 것으로 예상하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 진세노사이드 Rd의 비만억제효과는 AMPK 활성화를 통하여 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과가 시사하는 것은 진세노사이드가 세포내 에너지중심 단백질인 AMPK를 활성화시킬 수 있으며, 이는 세포내 AMPK로부터 시작되는 다양한 신호전달경로 단백질들을 조절할 가능성을 보여준 것이라 할 수 있다(9, 10).

최근 보고에 따르면 알려진 바와 같이 AMPK는 스트레스에 반응하여 활성화되고 세포내 스트레스에 반응하여 활성화되는 P38단백질을 조절할 수 있다는 보고가 있는데 이것으로 미루어 볼 때 세포 내 지방의 산화에는 일종에 스트레스를 유발할 수 있는 소재가 필요할 것이고, 이런 일시적 스트레스에 반응하여 항상성을 유지하기 위해 AMPK가 활성화되며 여러 가지 스트레스 관련 단백질을 조절하여 세포 사멸로부터 세포를 보호하는 역할을 하고 있음을 추정할 수 있다(11).

다른 한편 PPAR감마는 (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) 지방의 분화 시에 활성이 증가하는 대표적인 단백질로서 당뇨 및 지방, 그리고 더 나아가 최근엔 암세포의 성장과 밀접한 관계가 있음이 밝혀지고 있다(12, 13). 이에 다양한 PPAR감마의 agonist또는 antagonist가 개발 중에 있으며, rosiglitazone으로 대표되는 이들 PPAR감마 agonist가 당뇨병 환자에 있어 임상적으로 탁월한 효과를 나타내고 있고 antagonist들은 비만 억제 효과를 나타내고 있다(14). 우리의 데이터가 보여주는 것은 진세노사이드 Rd는 PPAR 감마를 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었으며 이것은 PPAR 감마의 antagonist로서 작용할 수 있는 가능성을 보여준 것이라 할 수 있다. 이에 천연물의 지방 효과탐색에 있어 AMPK신호전달 및 PPAR 감마의 dual screening system을 이용한다면 비만억제효과를 빠르고 간단하게 알 수 있을 것이라 예상된다.

그러나 우리의 실험에서 진세노사이드 Rd의 지방억제 효과에 있어서 AMPK와 PPAR gamma와의 직접적인 상관

성을 아직 밝혀내지 못하였다. 향후 이들의 직접적인 조절 기작 및 upstream 및 downstream 분자의 탐색이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다. 다만 AMPK와 PPAR 감마의 활성화는 진세노사이드 Rd의 지방억제효과에 있어 필요함을 알 수 있었다.

요 약

진세노사이드 Rd가 지방세포분화에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 진세노사이드 Rd는 3T3-L1 지방세포모델에 있어 효과적으로 지방분화를 억제한다.

2. 진세노사이드 Rd는 세포내 에너지대사의 필수 단백질인 AMPK를 활성화시키고 또한 지방분화과정에 발현 및 활성이 증가하는 PPAR 감마의 활성을 효과적으로 억제한다.

이상의 결과로 진세노사이드 Rd는 세포내 에너지대사를 촉진하여 지방축적 억제에 탁월한 효과를 보일 것으로 사료된다.

감 사

이 연구는 한국식품연구원의 Top brand사업연구비 (E070803) 및 대한민국 국가과학기술연구회 산하 산업기술연구회 소관기관 협동연구사업 프로그램의 지원을 받아 수행한 연구결과로, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Yun, T. K. (2003), Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds, *Mutat. Res.* **524**, 63-74.
2. Shang, W., Y. Yang, B. Jiang, H. Jin, L. Zhou, S. Liu, and M. Chen (2006), Ginsenoside Rb1 promotes adipogenesis in 3T3-L1 cells by enhancing PPARgamma2 and C/EBPalpha gene expression, *Life Sci.* **80**, 618-25.
3. Towler, M. C. and D. G. Hardie (2007), AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling, *Circ. Res.* **100**, 328-41.
4. Yin, W., J. Mu, and M. J. Birnbaum (2003), Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* **278**, 43074-80.
5. Kudo, M., A. Sugawara, A. Uruno, K. Takeuchi, and S. Ito (2004), Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation, *Endocrinology* **145**, 4948-56.
6. Hardie, D. G., S. A. Hawley, and J. W. Scott (2006), AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept, *J. Physiol.* **574**, 7-15.
7. Wagatsuma, A. (2006) Upregulation of gene encoding adipogenic transcriptional factors C/EBPalpha and PPARgamma2 in denervated muscle, *Exp. Physiol.* **91**, 747-53.
8. Hwang, J. T., I. J. Park, J. I. Shin, Y. K. Lee, S. K. Lee, H. W. Baik, J. Ha, and O. J. Park (2005), Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 694-9.
9. Zang, M., S. Xu, K. A. Maitland-Toolan, A. Zuccollo, X. Hou, B. Jiang, M. Wierzbicki, T. J. Verbeuren, and R. A. Cohen (2006), Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice, *Diabetes* **55**, 2180-91.
10. Hong, S. P., F. C. Leiper, A. Woods, D. Carling, and M. Carlson (2003), Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 8839-43.
11. Cheng, Z., T. Pang, M. Gu, A. H. Gao, C. M. Xie, J. Y. Li, F. J. Nan, and J. Li (2006), Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK, *Biochim. Biophys. Acta.* **60**, 1682-9.
12. Nedergaard, J., N. Petrovic, E. M. Lindgren, A. Jacobsson, and B. Cannon (2005), PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation, *Biochim. Biophys. Acta.* **40**, 293-304.
13. Lee, S. Y., G. Y. Hur, K. H. Jung, H. C. Jung, S. Y. Lee, J. H. Kim, C. Shin, J. J. Shim, K. H. In, K. H. Kang, and S. H. Yoo (2006), PPAR-gamma agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression, *Lung Cancer* **51**, 297-301.
14. Nakano, R., E. Kurosaki, S. Yoshida, M. Yokono, A. Shimaya, T. Maruyama, and M. Shibasaki (2006), Antagonism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma prevents high-fat diet-induced obesity in vivo, *Biochem. Pharmacol.* **72**, 42-52.