

3T3-L1 지방세포주에서 Epigallocatechin gallate가 세포증식 및 분화에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 생리학교실

박재형 · 배재훈 · 박원균 · 송대규

Effect of Epigallocatechin Gallate on Cell Proliferation and Differentiation in 3T3-L1 Adipocytes

Jae Hyung Park, M.D., Jae Hoon Bae, M.D., Won Kyun Park, M.D., Dae Kyu Song, M.D.

*Department of Physiology, Keimyung University School of Medicine,
Daegu, Korea*

Abstract : Green tea extracts contain many biologically-active materials, including catechins. The major water extractable component is epigallocatechin gallate (EGCG). (–)-Catechin at a higher concentration (50 μ M) is also reported to be beneficial against obesity, by increasing adiponectin secretion from adipocytes. However, readily-achievable dose of EGCG in human blood after regular daily oral ingestion is around 1 μ M, and (–)-catechin concentration is known to be further less than EGCG. Therefore, this study was designed to see whether they are real positive effecters against obesity at physiological blood levels, using a mouse adipocyte cell line, 3T3-L1.

3T3-L1 preadipocytes in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) media were differentiated by a serial 2-day addition method of isobutylmethylxanthine (IBMX), dexamethasone and insulin solution (Day 1 & 2) and insulin solution (Day 3 & 4). Each EGCG and (–)-catechins at concentrations between 0.1–10 μ M was applied everyday from Day 1. Mitotic clonal expansion and expression level of C/EBP β were measured at day 2, 2 days after the MDI treatment. Oil red-O staining was performed at Day 7, 8, 11. Adiponectin secretion measurement and Western blot for adiponectin and PPAR γ were done at Day 8.

EGCG and (–)-catechins were not influential in clonal expansion and C/EBP β protein

교신저자: 송대규, 700-712 대구광역시 중구 달성로 216, 계명대학교 의과대학 생리학교실

Dae Kyu Song, M.D., Department of Physiology, Keimyung University School of Medicine
216, Dalseongno, Jung-gu, Daegu, 700-712 KOREA

Tel: +82-53-250-7490 E-mail: dksong@dsmc.or.kr

expression. Triglyceride accumulation in mature adipocytes tended to increase in EGCG-treated group, but not in (-)-catechins group. Adiponectin secretion was not modified in EGCG and (-)-catechin-treated groups. In addition, the two catechins did not significantly change the protein expression level of adiponectin and PPAR γ .

These may suggest that there is no direct evidence that EGCG has a mechanism in adipocytes, applicable to preventing from obesity by a daily regular consumption.

Key Words : Adipocytes, Adiponectin, Epigallocatechin gallate, Obesity, PPAR γ

서론

녹차는 다양한 생리활성물질들을 포함하고 있으며, 그중에는 다양한 폴리페놀류, 카페인, 비타민 C와 카로틴 등이 있다. 폴리페놀류 중에서는 catechin 성분이 30%로써 가장 많으며, (-)-catechin, (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) 등이 대표적이다.

EGCG는 녹차성분 중 가장 많은 카테킨으로서 녹차의 생물학적 효과를 대변한다고 할 수 있다. 그 중 최근까지 녹차는 항암효과[1], 항산화효과[2] 그리고 항균효과[3, 4] 뿐만 아니라 혈중 콜레스테롤의 감소[5,6], 체중감량[7,8] 및 지방감소 효과[9], 혈중 포도당의 감소효과[10,11]가 주장되고 있어, 대사성 질환의 예방에 도움을 줄 것으로 기대되어 관심이 증가되고 있다. 그러나 녹차 복용이 당뇨병이나 비만의 예방 및 치료에 있어, 유익하다는 명백한 증거가 특히 사람에서는 없는 실정이다. 그 이유는 실험 방법의 다양성, 실험 동물간의 위장관 흡수율의 차이[12] 및 실험해석의 차이에서 일부 비롯될 수도 있다. 실험 방법에 있어 녹차 또는 EGCG의 투여 농도나 투여 경로가 녹차의 효능을 증명하는데 문제가 될 수도 있다. 생쥐(mice)에 있어 EGCG의 위장관 흡수율은 25% 정도로 높지만[13], 쥐(rat)에서는 0.1%로 생체이용률이 상당히 낮다[14]. 사람에서 EGCG의 위장관 흡수율은 쥐에서의 EGCG 위장관 흡수율과 비슷할 것으로 생

각되며[15,16], EGCG 단독 투여 시 보다 녹차 전체를 복용하였을 때 혈중 EGCG의 제거율에도 변화가 온다[16]. 이렇듯 다양한 실험방법의 동원에도 불구하고, 일치된 실험결과가 현재까지 나오지 않고 있어 녹차의 여러 성분들의 다양한 생물학적 효과가 기대되며, 국민건강 증진을 위해서도 질병별 녹차의 효능에 대해서 상세한 연구가 필요하다고 하겠다.

보통 녹차 잎으로 우려낸 차 한 잔을 마셨을 때, 포함되는 EGCG의 함량은 약 100 mg이며, 인체의 혈중으로 흡수되는 EGCG의 농도는 약 100 nM이다[15]. 그러므로 공복에 차 서너잔, 식후에 차 10잔을 마시면, 1 μ M의 EGCG 혈중농도에 도달할 수 있다. 그러나 대부분의 실험은 혈중농도 10 μ M이상의 EGCG를 실험동물 또는 세포배양액에 투여해 그 효과를 관찰한 결과이므로 생리학적 인 의미가 약하다. EGC와 EGCG가 α -amylase나 sucrase 같은 위장관계 효소의 활성을 감소시켜, 포도당의 위장관 흡수율을 떨어뜨려 녹차가 비만과 당뇨 억제효과가 있다는 보고가 있으나[17] 이는 일반적으로 복용하는 녹차 양의 수십 배에서 나타나는 효과이므로, 실제 일상 생활에서의 음용량으로 나타나는 효과로 보기는 어렵다. 이러한 위장관 내에서의 녹차효과와 혈중으로 흡수된 후 EGCG가 각 조직에 미치는 효과가 함께 표현되어 실험 해석에 어려움이 있는 것도 사실이다. 더욱이, 녹차가 혈중에 도달한 후 특히 지방세포에 미치는 직접적인 작용에 대해서는 알려진 바가 드문 실정이다. 최근 EGCG가 아닌 (-)-catechin이 고농도(50 μ

M)에서 지방세포 유래 호르몬이며, 인슐린 저항성을 개선하는 것으로 알려진 adiponectin 분비 증가를 유도한다는 보고가 있으나[18] 이 또한 농도가 생리적 내성 범위를 벗어난다.

백색 지방 조직(white adipose tissue, WAT)은 인체의 중요한 에너지 저장소로서 다량의 중성지방(triglyceride, TG)을 저장하고 있다가 필요시 TG를 지방산으로 분해하여 혈중으로 유리한다. 최근 WAT의 체중 대비 현저한 증가를 특징으로 하는 비만 환자가 증가되고 있는 바, 이는 지방세포수의 증가 및 지방세포 크기의 증가로 나타난다. 비만은 다양한 성인병과 연결되어 있음이 밝혀졌으며[19,20], 대표적으로 제2형 당뇨병, 고혈압[21], 악성 종양[22,23], 담낭관련 질환[24], 동맥경화[25] 등이 있다. 지방세포 증식과 함께 지방조직의 면역학적 염증 반응도 다양한 지방세포 유래 호르몬(adipokine)들의 분비체계를 변화시키며, 이것이 체내에서 다양한 질환을 유발[26]하는 것으로 나타난다. 그러므로 성인 지방조직에서도 발생하는 지방전구세포(preadipocyte)의 성숙지방세포로의 분화과정을 연구하고, 이때 나타나는 지방적(fat droplet)의 축적정도 및 관련되는 분자생물학적 현상을 관찰하는 것은 의미있는 일이라 하겠다. 또한 이런 연구가 부작용의 가능성을 되도록 줄이는 일상 녹차 복용의 수준에서 조사되는 것이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 녹차의 주성분인 EGCG와 최근 고농도에서 인슐린 저항성 개선에 효과가 있을 것으로 알려진 (-)-catechin이 비만을 비롯한 대사성 질환에 효과가 있는지를 보기 위하여, 3T3-L1 지방세포주를 이용하여 실제 음용시의 농도인 생리학적 범위의 농도(0.1-10 μ M)에서 지방세포분화 및 증식에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

지방세포 배양에 사용된 Dulbecco's Modified

Eagles 배양액(DMEM), fetal calf serum (FCS), fetal bovine serum (FBS)과 penicillin/streptomycin 항생제 용액은 GibcoBRL사(Carlsbad, CA, USA)의 제품이었으며, 그 외 시약들은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 분화유도를 위한 MDI 배양액은 0.5 mM IBMX 용액, 5 μ g/mL 인슐린, 0.5 μ M의 dexamethasone을 혼합하여 제조하였으며, 인슐린 배양액은 5 μ g/mL 인슐린으로 제조되었다.

2. 3T3-L1 지방세포주의 배양과 분화 유도

3T3-L1 지방전구세포(ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 10% fetal calf serum (FCS)이 첨가된 DMEM 배양액이 든 T75 flask내에서 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 배양액을 이틀에 한번씩 교환하였으며, 70% 이하의 세포밀도를 유지하였다. Passage는 1:10의 세포농도로 분주하였다. 성숙 지방세포로 분화시키기 위해 10% FCS와 DMEM이 첨가된 60 mm plate에 9 x 10⁴ 세포를 깔고, 이틀간 증식시켰다 (Fig. 1). 분화 1일째, 배양액에 분화유도 물질인 MDI 배양액을 첨가하고 이틀간 유지하였다. 분화 3일째, 인슐린 배양액만을 첨가하고, 이틀간 유지하였다. 분화 5일째, fetal bovine serum (FBS)과 DMEM 배양액으로 교체하고, 이틀에 한번씩 배양액을 교환하였다. EGCG와 (-)-catechin 군은 mitotic clonal expansion (MCE)을 보기위해서 분화 1일째부터 이틀간 매일 주었고, 분화관련성을 보기위해서 분화 3일째부터 매일 배양액에 투여하였다. 대조군, EGCG와 (-)-catechin 군은 분화 3일째와 4일째에만 인슐린 배양액을, 인슐린 대조군은 계속적으로 인슐린 배양액을 공급하였다.

3. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 cell count assay와 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue

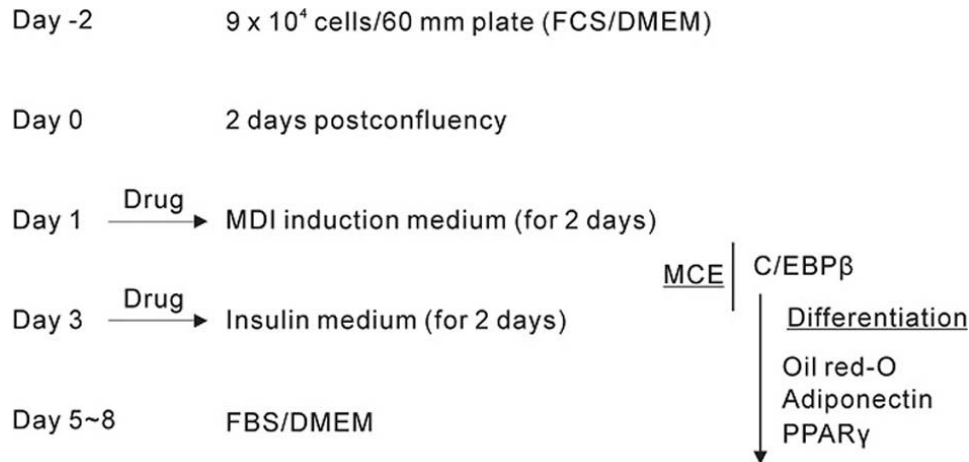


Fig. 1. 3T3-L1 adipocyte differentiation protocol. Mitotic clonal expansion (MCE) was measured at day 3. FCS: fetal calf serum; FBS: fetal bovine serum.

Tetrazolium Bromide) cell assay로 측정하였다. 570 nm 흡광도에서 ELISA법으로 측정하였다.

4. 지방세포내 지질 저장량(지방적 크기)의 비교

지방세포내 지방적의 크기는 Oil red-O (ORO)로 염색 후 측정하였다. 지방세포가 든 배양액을 제거하고, 10% 포르말린을 첨가한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 포르말린으로 한번 더 세척을 하고, 1시간 이상 반응시켰다. 작은 transfer pipette으로 포르말린을 제거한 후 60%의 isopropanol을 2 mL 첨가하고, 완전히 건조시켰다. ORO 용액 1 mL를 첨가 후 10분 기다리고, 이후 ORO 제거 후 즉시 dH₂O를 첨가하고, 증류수로 2-3회 더 세척을 하였다. 완전히 건조시킨 후, 100% isopropanol 3 mL를 첨가하여 ORO를 다시 씻고, 10분간 방치하였다. 흡광도는 500 nm에서 0.5초간 읽었으며, blank로는 100% isopropanol을 사용하였다.

5. Adiponectin 분비량

Mouse Adiponectin Immunoassay Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)를 사용하여, 제조

사의 protocol에 따라 ELISA법으로 측정하였다.

6. Western blot

차가운 PBS buffer로 세척한 세포를 RIPA buffer [150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH 8.0)] 로 용해시켜 10분 동안 4℃에 방치한 후 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 단백질을 90 μ g으로 표준화하여 12% SDS-PAGE로 전기영동 시킨 후, PVDF (Polyvinylidene Fluoride) transfer membrane으로 이동시켰다. 5% skim milk 용액으로 membrane을 blocking한 후 일차 항체(PPAR γ , C/EBP β , adiponectin; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 12-16시간 동안 4℃에서 shaking incubation을 통해 비특이적 결합을 제한하였다. 다음으로 PBS buffer로 4회 세척하여 이차 항체(goat-anti-rabbit conjugate with horseradish peroxidase; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 2시간 동안 상온에서 부착시킨 후, Chemiluminescence detection kit (ECL, Amersham, UK)을 사용하여 암실에서 필름 현상하였다(Fig. 1).

7. 통계분석

실험의 유의성은 ANOVA를 시행하였고, $p < 0.05$ 수준을 유의한 것으로 해석하였다.

성적

1. Mitotic clonal expansion (MCE)

지방전구세포의 성숙지방세포로의 분화 초기 관찰되는 MCE에 미치는 EGCG와 (-)-catechin의 영향을 보기 위해 이틀간 MDI 배양액 투여시의 세포 증식능을 관찰한 결과, EGCG나 (-)-catechin 모두 10 μM 이하의 농도에서는 유의한 영향을 보여주지 않았다(Fig. 2). EGCG 농도 100 μM 에서 MCE의 감소가 관찰되었으나 이것은 고농도에 의한 세포독성으로 생리학적인 의미는 없을 것으로 보인다. Clonal expansion을 담당하는 것으로 보이는 C/EBP β 단백질의 발현정도를 Western blot으로 관찰한 결과, EGCG에 의해서는 변화가 없었고, (-)-catechin에 의해서는 전 농도 범위에서 약간의 감소 경향을 보였다(Fig. 3).

2. 지방적 축적 정도

각 군에서 분화 7일째, 8일째, 및 11일째에 관찰된 지방적 ORO 염색의 분석결과는 각각 Fig. 4, 5 및 6과 같으며, Fig. 7은 분화 8일째에서의 ORO 염색의 현미경 소견이다. 예상대로 인슐린 계속 투여군에서는 일관적인 지방세포 분화 증가가 관찰되었으며, EGCG는 7일째부터 고농도 군에서, 11일째에는 모든 농도에서 지방적 증가가 관찰되었다. 한편, (-)-catechin에 의해서는 7일째에 지방적 크기가 10 μM 농도에서 감소 경향을 보였으나, 8일 이후에는 모든 농도에서 대조군과 큰 변화없이 유지되었다.

3. 성숙 지방세포에서 PPAR γ 및 adiponectin 단백질 발현

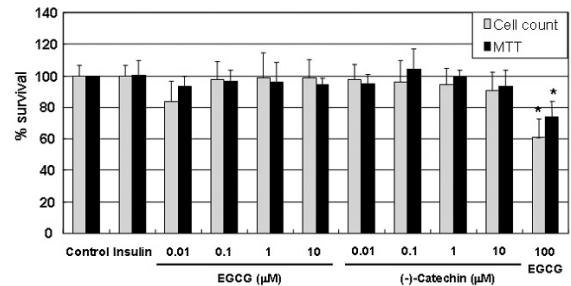


Fig. 2. Mitotic clonal expansion during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Cell count (Left bars, $n=4$) and MTT assay (Right bars, $n=4$) were performed at day 2. Each drug was applied for 2 days. * $p < 0.05$ compared to control. Data represent Mean $\pm$ SEM.

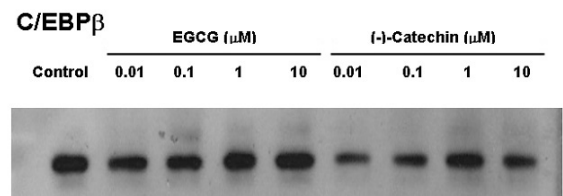


Fig. 3. Western blot of EGCG or (-)-catechin on C/EBP β , protein expression during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Western blot was performed at day 3.

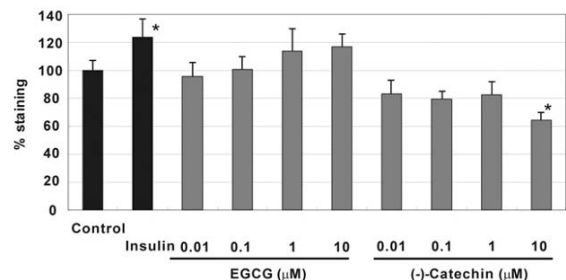


Fig. 4. Effects of EGCG or (-)-catechin on triglyceride accumulation during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Oil red-O staining was performed at day 7. * $p < 0.05$ compared to control. Data represent Mean $\pm$ SEM. $n=3$.

예상대로 인슐린 투여군에서는 adiponectin의 단백질 발현이 감소하여, 인슐린이 adiponectin 발현과 분비를 억제시킨다는 보고[27-29]와 일치하였

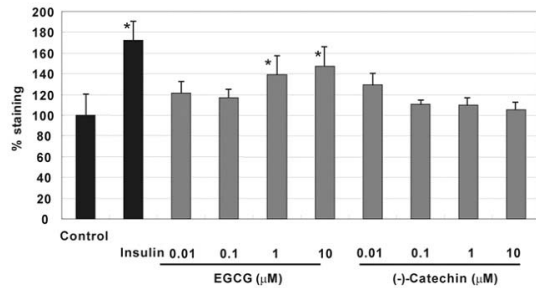


Fig. 5. Effects of EGCG or (-)-catechin on triglyceride accumulation during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Oil red-O staining was performed at day 8. * $p < 0.05$ compared to control. Data represent Mean $\pm$ SEM. $n=3$.

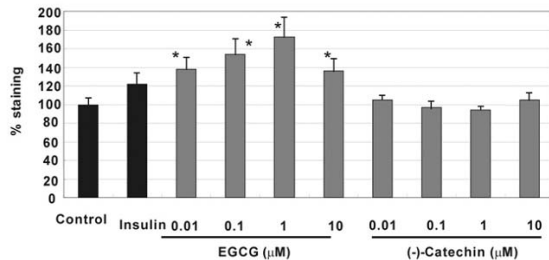


Fig. 6. Effects of EGCG or (-)-catechin on triglyceride accumulation during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Oil red-O staining was performed at day 11. * $p < 0.05$ compared to control. Data represent Mean $\pm$ SEM. $n=3$.

다. 그러나 EGCG 및 (-)-catechin군에서는 10 μ M 이하 농도에서 adiponectin의 단백 발현의 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 8). PPAR γ 단백 발현은 인슐린에 의해서는 조금 증가되었으나, EGCG나 (-)-catechin에 의해서는 대조군에 비해 유의한 발현의 증가는 관찰되지 않았다.

4. Adiponectin 분비량

각 군의 지방세포에서 adiponectin의 분비량은 분화 8일째에 측정하였다. 모든 군에서 adiponectin 분비량은 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 9).

고 찰

최근 비만의 증가로 비만 관련 질환들의 유병률이 급격히 커지고 있다. 이에 따라 비만 예방 및 치료를 위해 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 천연물을 이용한 신약개발 연구가 급증하고 있다. 그러므로 보다 정확한 정보가 국민 건강을 위해 필요하며, 과장되거나 근거 없는 잘못된 정보가 사람들에게 알려지고 있어 이는 사회적 문제라 할 수 있다.

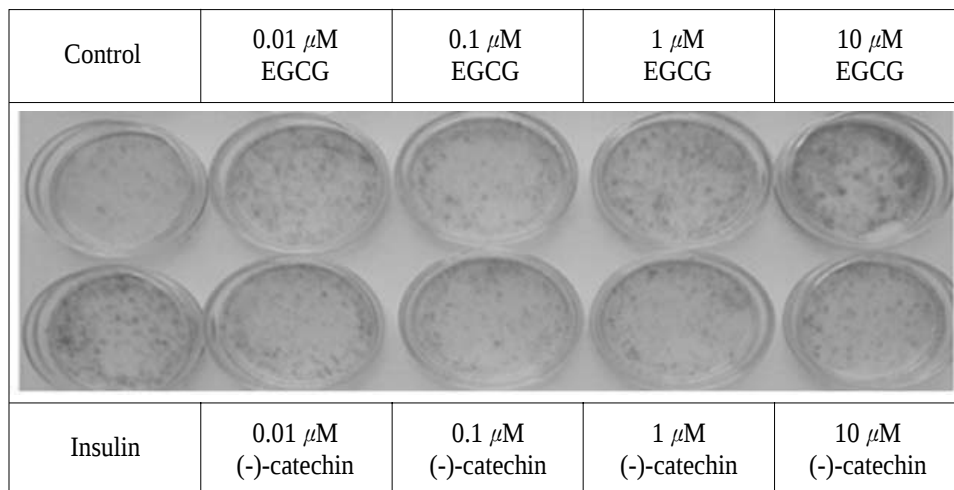


Fig. 7. Gross findings of EGCG or (-)-catechin on triglyceride accumulation during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Oil red-O staining was performed at day 8. Higher staining is seen by greater lipid storage.

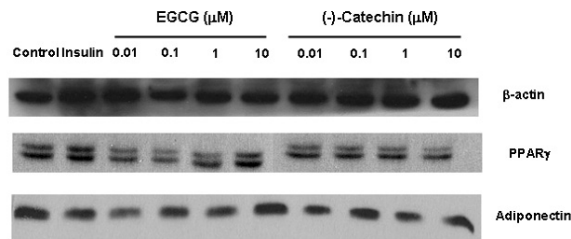


Fig. 8. Western blot of EGCG and (-)-catechin on PPAR γ and adiponectin protein expression during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Western blot was performed at day 8.

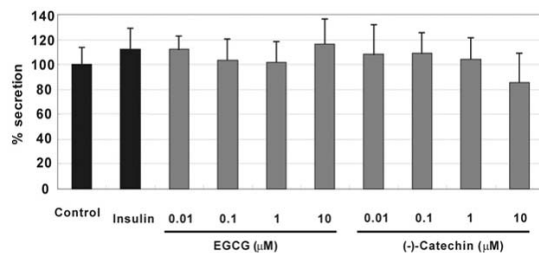


Fig. 9. Changes in adiponectin secretion by EGCG or (-)-catechin during 3T3-L1 adipocyte differentiation. Sample collection was performed at day 8.

이러한 시점에서 각종 천연물들의 특정 질병에 대한 효과를 보다 정확하고 근거 있는 과학적 결과로서 알리는 것은 의미가 있다.

비만과 당뇨병은 현재 우리나라에서 급증하는 추세이므로 더욱 그렇다. 어떤 천연물이 특정 질환에 효과가 있다고 해서, 모든 질환에 유익하다고 보는 것은 잘못된 시각이다. 본 실험은 비만과 당뇨병에 효과가 있다고 일반적으로 알려져 있는 녹차의 주 성분 중의 하나인 EGCG와 (-)-catechin을 사용하여 [17] 지방세포의 분화과정에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 사람이 상시적으로 음용하여 특별한 부작용 없이 혈중에 도달할 수 있는 농도 범위 안에서 EGCG는 지방전구세포로부터 지방세포 분화와 지방적 축적을 촉진시켰으며, 인슐린 저항성 개선에 효과가 있다고 알려진 지방세포의 PPAR γ 발현증가나 adiponectin 발현증가의 효과는 관찰되지 않았다. 이보다 더 높은 농도인 100 μ

M 농도에서는 지방세포수를 줄이는 반응을 나타내었지만, 이 농도에서는 인체가 상당한 부작용을 느낄 수 있는 농도임으로 생명을 위협하는 질환이 아닌 한 이처럼 과다 복용하는 게 무리가 된다. 또한 (-)-catechin 역시 50 μ M 농도에서 성숙 지방세포로부터 adiponectin의 분비를 증가시킨다고 보고되었으나 [18], 본 실험에서 10 μ M 이하에서는 그러한 효과가 관찰되지 아니하였다. (-)-Catechin의 녹차내의 함량은 EGCG에 비해 극히 낮으므로, 50 μ M 농도에서의 효과라는 것은 아무런 의미가 없다. 이렇듯 *in vitro* 고농도에서만 보일 수 있는 효과를 일반 음용 시에도 나타날 수 있는 효과로 해석하는 것은 문제가 있다. 본 실험에서 adiponectin 분비가 EGCG 10 μ M에서 증가하는 것으로 보이지만, 원래 인슐린이 adiponectin 분비를 감소시키는 것으로 해석을 할 때, 이는 실험오차 범위 안에 있으며, 유의한 변화는 아니다. 이것은 adiponectin 단백 발현의 결과로도 추론이 가능하다.

성인에서도 지방조직은 많은 수의 지방전구세포를 가지고 있으며, 이들은 여러 가지 전사인자의 활성 변화에 의해서 지방적을 함유하는 성숙 지방세포로 분화될 수 있다 [30]. 그중 Pref-1의 하향조절이 유발되면 전구지방세포의 증식이 멈추며 분화를 시작하는 신호가 되고, 이어 C/EBP- β 나 C/EBP- δ 등에 의해 mitotic clonal expansion 과정을 한번 더 거친다. 이어 C/EBP- α 나 PPAR- γ 등의 전사 인자에 의해 지방분화가 촉진된다 [31]. 본 실험에서 지방분화 정도를 세포내 지방적의 크기로 판단하였다. 그리고 (-)-catechin에 의해서는 지방적의 증가가 대조군에 비해 유의하지 않았지만 EGCG에서는 지방적이 유의하게 증가하였다. 그러나 이는 PPAR- γ 단백 발현의 증가와는 동반되지 않았다. 이는 EGCG가 지방적의 저장을 증가시키는 다른 신호전달 기전을 촉발하거나, 지방 분해기전을 억제하는 신호전달 경로를 자극할 것으로 추측되며, 여기에 대한 추후 실험이 진행되어야 할 것으로 보인다. 한편 EGCG는 성숙 지방세포로의 분화는 촉진되는데 비해 지방세포 호르몬인 adiponectin의 발현이나 분비는 증가시키지 않음

으로써 비만 또는 대사장애 개선에 도움을 주는 것으로는 생각하기가 힘들다. Adiponectin은 지방세포에서 분비되는 호르몬으로서, 특히 수용체인 AdipoR1과 AdipoR2를 통해 AMPK를 활성화시켜 인슐린 저항성을 개선하고[32], 복부지방을 감소시키며 HDL의 혈중농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다[24,25]. 혈관을 확장시켜 혈압을 떨어뜨리고[21], 근육의 지방 축적을 감소시키고[33], 포도당 이용률을 증가시킨다[34]. 심근의 ischemia/reperfusion injury를 감소시키며[35], 지방 상피세포의 암화과정을 억제하는 것으로 알려져 있다[23]. 면역계의 효율도 증가시키는 것으로 생각되나 유일하게 뇌의 식욕중추에 작용하면 식욕은 증가시키는 것으로 밝혀졌다[32]. 이와 연관되어, 당뇨병이나 비만, 그리고 심혈관 질환 환자의 혈중 adiponectin이 감소하는 것은 특이한 사항이다. Adiponectin 발현의 가장 큰 자극원이 PPAR (peroxisome proliferator-activator receptor)- γ 의 활성화증가인데[36-38], 본 실험에서 EGCG나 (-)-catechin에 의해 PPAR- γ 의 활성화증가가 뚜렷이 관찰되지 않았다. PPAR- γ 는 유전자의 발현을 조절하는 핵수용체 단백질의 하나로서 내인성 리간드로서는 지방산이나 eicosanoids가 대표적이며, retinoid X receptor (RXR)와 결합하여 특정 유전자 전사를 조절한다. 지방세포에서는 주로 지방세포 분화에 관련되는 유전자를 활성화한다.

이제까지 EGCG가 당뇨병이나 비만에 효과가 있다고 한 근거는 EGCG의 장관내 포도당 흡수율 저하 작용 때문이다[39]. 그리고 10 μ M 정도의 고농도에서는 장관내의 포도당 분해효소의 활성화도 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이는 혈중으로의 포도당 흡수율을 떨어뜨림으로써 식후 혈당의 상승을 억제할 수 있음을 암시한다. 그러나 EGCG가 결국 혈중으로 유입이 되었을 때에는 포도당을 주로 에너지원으로 사용하는 조직의 포도당 이용율도 감소시켜, 소위 세포들의 에너지 결핍현상을 초래할 수 있다[40,41]. 이 기전은 결국 혈중 포도당 농도 상승으로 이어질 것임으로, 고농도의 혈중 EGCG는 바람직하지 못하다. 즉 EGCG는 지연성 고혈당을

유발할 가능성이 있다. 한편으로 EGCG는 수컷 쥐의 Leydig cell의 포도당 흡수를 저해하여, 테스토스테론 분비를 감소시키고, 고환 위축을 유발할 수도 있다[7]. 테스토스테론의 감소는 물론 식욕도 억제하겠지만, 남성기능을 억제할 수 있으며, 이러한 이유로 무분별한 고농도의 EGCG의 사용에 대해 더욱더 많은 연구가 필요하다.

요 약

녹차는 폴리페놀류, 카페인, 비타민 C와 카로틴 등의 다양한 생리활성물질들을 포함하고 있다. 최근까지 녹차의 항암효과, 항산화효과 그리고 항균 효과에 이르기까지 많은 유익한 효과들이 보고되고 있다. 또한 생체 대사와 관련해서도 녹차의 음용은 혈중 콜레스테롤의 감소, 체중 및 체질량지수의 감소, 체지방 및 혈중 포도당의 감소를 가능하게 한다는 많은 주장이 있어 녹차의 소비가 최근 증가하는 대사성 질환의 예방에 도움을 줄 것으로 기대되고 있다. 그러나 녹차 복용이 실제 인체에 유익하다는 영양학적, 그리고 역학적 보고는 드물다. 특히 비만과 관련하여 녹차가 효과적이라는 것은 명백한 증거가 없는 실정이다. Epigallocatechin gallate (EGCG)는 녹차성분 중 가장 많은 카테킨으로서 녹차의 생물학적 효과를 대변한다. 녹차 카테킨 중 epigallocatechin (ECG)와 EGCG가 α -amylase나 sucrase 같은 위장관계 효소의 활성을 감소시켜, 포도당의 흡수율을 떨어뜨린다는 보고가 있으나 이는 일반적으로 복용하는 녹차량의 수십배에서 나타나는 효과이므로, 실제 일상생활에서 나타나는 효과로 보기는 어렵다. (-)-Catechin은 고농도에서는 지방 호르몬인 adiponectin의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 따라서 3T3-L1 지방세포주를 사용하여 EGCG와 (-)-catechin이 일상 녹차음용 시 나타날 수 있는 혈중 농도 범위에서, 비만 같은 대사성 질환에 효과가 있는지를 알아보았다. 지방세포주를 증식시키고 분화시키는 과정에서 EGCG 또는 (-)-catechin을 투여하여, 이들이 지방세포의 분화와 증식에 미치는 영향을 관찰하였

다.

EGCG나 (-)-catechin의 첨가에 의해 지방세포의 mitotic clonal expansion은 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 Oil red-O staining에서 지방적(lipid droplet)의 양이 EGCG에 농도의존적으로 증가하였다. 이때의 EGCG의 양은 일상적인 녹차 음용 시 인체 혈중에 도달할 수 있는 농도였다. 다른 녹차 카테킨인 (-)-catechin에 의해서는 지방적의 양적 변화가 미미하였다. 이 두 catechin들에 의해 PPAR γ 나 adiponectin 단백질의 발현 정도에는 변화가 없었다. 이로서 녹차 음용 시 도달 가능한 혈중 농도범위에서 EGCG는 지방세포를 통한 직접적인 비만 예방 효과는 없는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;**26**:958-67.
2. Xia J, Song X, Bi Z, Chu W, Wan Y. UV-induced NF-kappaB activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes *in vitro*. *Int J Mol Med* 2005;**16**:943-50.
3. Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, *et al*. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**112**:951-7.
4. Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2004;**53**:225-9.
5. Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 2001;**74**:227-32.
6. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, *et al*. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 2001;**131**:27-32.
7. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 2000;**141**:980-7.
8. Fiorini RN, Donovan JL, Rodwell D, Evans Z, Cheng G, May HD, *et al*. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl* 2005;**11**:298-308.
9. Lu H, Meng X, Yang CS. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab Dispos* 2003;**31**:572-9.
10. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem* 2002;**277**:34933-40.
11. Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, Wang Y, Teixeira SR, Riegger C, *et al*. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr* 2006;**136**:2512-8.
12. Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 2003b;**133**:S3262-7.
13. Lambert JD, Lee MJ, Lu H, Meng X, Hong JJ, Seril DN, *et al*. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *J Nutr* 2003;**133**:4172-7.
14. Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos* 1997;**25**:1045-50.
15. Chow HH, Cai Y, Alberts DS, Hakim I, Dorr R, Shahi F, *et al*. Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of

- epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;**10**:53-8.
16. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, *et al.* Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;**11**:1025-32.
 17. Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Arai S, Hara Y, Suzuki K, *et al.* Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem* 2000;**48**:5618-23.
 18. Cho SY, Park PJ, Shin HJ, Kim YK, Shin DW, Shin ES, *et al.* (-)-Catechin suppresses expression of Kruppel-like factor 7 and increases expression and secretion of adiponectin protein in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**:E1166-72.
 19. Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *Jama* 1994;**272**:205-11.
 20. Wolf AM, Colditz GA. Social and economic effects of body weight in the United States. *Am J Clin Nutr* 1996;**63**:466-9.
 21. Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, *et al.* Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. *Hypertension* 2006;**47**:1108-16.
 22. Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu J, Lam MC, Hoo RL, *et al.* Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res* 2006;**66**:11462-70.
 23. Wang Y, Lam KS, Xu A. Adiponectin as a negative regulator in obesity-related mammary carcinogenesis. *Cell Res* 2007;**17**:280-2.
 24. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin invest* 2003;**112**:91-100.
 25. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, *et al.* Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002;**106**:2767-70.
 26. Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin-journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005;**257**:167-75.
 27. Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, Moriwaki M, Tanaka S, Nishizawa H, *et al.* Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;**25**:1665-6.
 28. Semple RK, Halberg NH, Burling K, Soos MA, Schraw T, Luan J, *et al.* Paradoxical elevation of high-molecular weight adiponectin in acquired extreme insulin resistance due to insulin receptor antibodies. *Diabetes* 2007;**56**:1712-7.
 29. Semple RK, Soos MA, Luan J, Mitchell CS, Wilson JC, Gurnell M, *et al.* Elevated plasma adiponectin in humans with genetically defective insulin receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:3219-23.
 30. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;**78**:783-809.
 31. Chou FS, Wang PS, Kulp S, Pinzone JJ. Effects of thiazolidinediones on differentiation, proliferation, and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2007;**5**:523-30.
 32. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 2008;**409**:623-33.
 33. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 2006;**55**:249-59.
 34. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, *et al.* Complex distribution,

- not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004;**279**:12152-62.
35. Inoue T, Kotooka N, Morooka T, Komoda H, Uchida T, Aso Y, *et al.* High molecular weight adiponectin as a predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2007;**100**:569-74.
36. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, *et al.* PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001;**50**:2094-9.
37. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, *et al.* Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 2002;**143**:998-1007.
38. Hoo RL, Chow WS, Yau MH, Xu A, Tso AW, Tse HF, *et al.* Adiponectin mediates the suppressive effect of rosiglitazone on plasminogen activator inhibitor-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:2777-82.
39. Fukino Y, Shimbo M, Aoki N, Okubo T, Iso H. Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005;**51**:335-42.
40. Naftalin RJ, Afzal I, Cunningham P, Halai M, Ross C, Salleh N, *et al.* Interactions of androgens, green tea catechins and the antiandrogen flutamide with the external glucose-binding site of the human erythrocyte glucose transporter GLUT1. *Br J Pharmacol* 2003;**140**:487-99.
41. Wu LY, Juan CC, Hwang LS, Hsu YP, Ho PH, Ho LT. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Eur J Nutr* 2004;**43**:116-24.