

# 한우 Intramuscular Preadipocyte의 분화

이상미\*정영희\*황성호\*박효영\*윤두학\*\*문승주\*정의룡\*\*\*강만종\*

전남대학교 농업생명과학대학 농업과학기술연구소 동물자원학부\*, 농촌진흥청 축산연구소\*\*

상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과\*\*\*

## Differentiation of Hanwoo Intramuscular Preadipocytes

S. M. Lee\*, Y. H. Jeoung\*, S. H. Hwang\*, H. Y. Park\*, D. H. Yoon\*\*, S. J. Moon\*  
E. R. Chung\*\*\* and M. J. Kang\*

Department of Animal Science, Insti. of Ag. Sci. and Tech., College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea\*, National Livestock Research Institute, RDA\*\*  
Department of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University\*\*\*

### ABSTRACT

The development of marbling in cattle is closely associated with an increase in adipocyte size and number within muscle. The adipose precursor cells have the capacity to differentiate into adipocytes within the muscle during the formation of marbling. In this studies, we established the cell culture system for differentiation of intramuscular preadipocyte isolated from the sirloin of Hanwoo aged 12 months. The intramuscular preadipocyte cells exhibited a fibroblastic appearance and differentiated into adipocytes by treating confluent cells with differentiation medium containing insulin, dexamethasone, and troglitazone. When intramuscular preadipocyte cells were differentiated at 18 day, the triglyceride concentration was higher than control cells. Moreover, the thiazolidinedione treatment increased adipogenesis. RT-PCR analysis confirmed the significant expression of PPAR $\gamma$  mRNA during adipocyte differentiation. In conclusion, our culture system used in this study allowed intramuscular preadipocyte cells to differentiated into adipocytes and intramuscular preadipocyte cells may be useful in the further study of differentiation mechanism of adipocytes in Hanwoo.

(Key words : Primary culture, Bovine, Thiazolidinedione, Peroxisom proliferator-activated receptor- $\gamma$ , Preadipocyte)

### I. 서론

대가축인 소에 있어서 marbling은 골격근의 근섬유 다발 사이에 하얀색 얼룩모양 또는 줄무늬의 지방조직이 나타나는 것을 말하며 이러한 marbling의 형성은 근육사이에 있는 지방세포의 수와 크기에 밀접한 관계가 있다(Cianzio 등, 1985; Harper and Pethick, 2004). 발달 중인 근육에는 지방세포로 분화할 수 있는 줄기 세

포가 존재하며 이러한 줄기세포는 지방전구세포로 분화 발달하고 특정한 지방세포분화 유도에 의하여 지방세포로 분화하는 것으로 알려져 있다(Harper and Pethick, 2004). 지방세포로의 분화는 일반적으로 설치류에서 초대배양세포 및 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 이용하여 많은 연구가 되어져 왔다(Green, H. and O. Kehinde. 1974; Grimaldi PA. 2001). 소에서는 신장주변 지방(Faulconnier 등, 1994; Ohyama 등, 1998)과

Corresponding author : Man-Jong Kang, 300 Yongbong-Dong, Puk-Gu, Gwangju 500-757, Korea  
Tel : 062-530-2113 e-mail : mj kang@chonnam.ac.kr

골격근(Aso 등, 1995; Torii, 1998)으로부터 분리된 초대배양세포를 지방전구세포로 하여 지방분화에 관한 유도물질에 대한 연구와 유전자의 발현 등에 대한 연구가 진행되어져 왔다.

소에 있어서도 지방전구세포의 지방세포분화는 설치류와 마찬가지로 지방분화 유도물질로 작용하는 지방산과 프로스타글란딘과 같은 ligand가 proliferator activated receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ )에, Glucocorticoids와 같은 호르몬은 CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ )와  $\delta$ 에 작용하는 것으로 분화유도가 시작되고 insulin은 adipocyte determination and differentiation factor-1 (ADD-1)에 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 인자들에 의하여 분화가 유도 되면서 활성을 받은 전사인자 PPAR $\delta$ 는 분화과정에서 PPAR $\gamma$ 의 발현을 유도하며 C/EBP $\beta$ 와 C/EBP $\delta$ 는 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 발현에 관여하고 insulin에 의한 ADD-1의 활성은 PPAR $\gamma$ 의 전사를 유도하는 것으로 보고되고 있다. 이렇게 전사활성을 받은 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 는 지방세포로 분화하는데 관여하는 유전자들의 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있다(Cowherd 등, 1999). 또한 돼지에 있어서 지방조직 유래 초대배양세포를 지방전구세포의 분화유도 물질인 dexamethasone과 troglitazone으로 처리하면 지방세포로의 분화가 촉진되며 이에 따라 C/EBP $\alpha$ 의 발현이 유도되는 것으로 보고되고 있다(Tchoukalova 등, 2000).

그러나 지방분화에 있어서 설치류와 반추동물인 소에 있어서 유전자의 발현이 서로 다를 가능성이 있으며 또한 초대배양세포의 지방분화 시스템을 이용하여 새로운 유전자의 발굴에도 이용할 수 있다(Aso 등, 1995; Nakajima, 2002). 또한 이와 같이 한우의 골격근 유래의 초대배양세포를 이용하여 지방분화시스템을 확립한 경우는 전무한 실정이며 분화시스템이 확립되면 marbling 형성에 관한 연구를 세포수준에서 연구를 진행할 수 있다. 그러므로 본 연구는 한우 등심유래의 초대배양세포를 확립하고 지방세포로의 분화시스템을 확립하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Intramuscular preadipocyte 세포의 분리 및 배양

한우 Intramuscular preadipocyte 세포의 분리는 축산연구소에서 사육된 12개월령 한우 수컷의 등심 조직으로부터 Aso 등(1995)의 방법을 약간 변형하여 아래와 같이 제조하였다. 먼저 도축 후 즉시 등심조직을 멸균된 수술용 가위로 절단하고 penicillin(100U/ml)과 streptomycin (100 $\mu$ g/ml)을 포함하는 DMEM에 넣고 실험실로 운송하였다. 등심조직은 매우 가늘게 멸균된 안과용 가위로 절단하고 DMEM으로 수회 wash 하였다. 가늘게 절단된 조직 0.5g당 2 mg/ml의 collagenase(sigma, type I)을 포함하는 DMEM을 1ml 넣고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1시간 30분 동안 처리하였다. collagenase 처리된 세포는 stainless steel mesh(100 $\mu$ m)을 이용하여 거른 다음 800 rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C에서 원심하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 세포수를 측정하고 10 cm dish에  $5 \times 10^6$  cell를 접종하여 10% FBS를 포함하는 DMEM에서 배양하였다. 다음날 배양액을 새로운 것으로 교체하고 세포가 충분히 자라면 10% DMSO를 포함하는 배양액으로 동결보존 하였다.

### 2. Intramuscular preadipocyte의 지방세포분화

Intramuscular preadipocyte의 지방세포분화는 동결된 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 용해하고 800rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 5분 원심한 후 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin을 포함하는 DMEM을 기본배지로 하여 배양하였으며 2-3회 계대하여 실험에 사용하였다. 지방분화를 위하여 intramuscular preadipocyte를  $4 \times 10^4$  cell/ml로 6 cm dish에 접종하고 confluent하게 자라면 48시간 후에 33  $\mu$ M biotin, 17  $\mu$ M pantothenate, 1mM carpylic acid, 200  $\mu$ M ascobic acid, 10  $\mu$ g/ml insulin, 0.25  $\mu$ M dexametason, 10mM acetic acid, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylantine을 포함하는 분화배지에서 12 ~ 18일간 배양하여 지방세포로 분화 유도하

였으며, 분화배지는 2일 간격으로 새로운 배지로 교환하였다. 그리고 PPAR $\gamma$ 의 ligand인 thiazolidinedione은 생쥐 3T3-L1 분화에 사용되는 일반적인 농도인 25  $\mu$ M을 분화배지에 첨가하였다. 분화의 정도는 Oil Red O staining으로 염색과 triglyceride의 양을 측정하여 확인하였다.

### 3. Oil-red O 염색

지방세포로 분화된 세포의 Oil-red O 염색은 다음과 같이 수행하였다. 분화가 종료된 세포의 배양액을 제거하고 PBS로 1회 wash한 다음 10% formalin(Sigma aldrich, HT5014) 5 ml 넣고 1시간 동안 실온에서 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 2회 wash 후 60% isopropanol 5 ml을 넣고 2분간 방치하였다. 염색은 isopropanol을 제거한 다음 Oil-red O 용액 5 ml을 넣고 실온에서 2시간 실시하였다. 염색 후 60% isopropanol 5 ml로 wash하고 5 ml의 10% formalin을 넣고 현미경으로 관찰하였다. 사용된 Oil-red O 용액은 0.5g Oil red O(sigma O-0625)을 100ml의 isopropanol에 녹인 후 stock 용액으로 하였으며 염색에는 사용직전 Oil-red O stock과 멸균 증류수를 6:4의 비율로 혼합하고 0.45 $\mu$ m filter로 filter한 다음 2시간 이내에 사용하였다.

### 4. Triglyceride의 측정

Triglyceride의 측정은 6 cm dish에 배양된 세포로부터 회수된 sample을 이용하여 측정하였다. 먼저 세포를 PBS로 1회 wash한 다음 1 mM

EDTA를 포함하는 25 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer 400 $\mu$ l을 넣고 scraper로 긁어 세포를 1.5ml tube에 회수한 다음 Ultra sonic homogenizer (UH-50, SMT company)의 output 6의 조건에서 2분간 세포를 파괴하였다. 세포를 파괴한 다음 1000  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심하여 상층만을 회수하여 측정에 이용하였다. Triglyceride의 측정은 Triglyceride E-test kit(Wako)를 이용하여 아래와 같이 측정하였다. 3 ml의 발색제를 15 ml의 시험관에 분주하고 측정할 sample 20 $\mu$ l을 넣고 가볍게 vortex한 다음 37 $^{\circ}$ C에 5분간 보온한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정량의 계산은 설명서에 따라 표준액을 20 $\mu$ l(300 mg /dl)을 측정하여 상대적인 흡광도를 계산하여 구하였다.

### 5. PPAR $\gamma$ 유전자의 발현 확인

Total RNA는 지방세포분화 단계에 따라 세포를 회수한 후 다음과 같이 제조하였다. 먼저  $5 \times 10^6$ 의 세포에 1 ml의 Trizol Reagent(Gibco BRL)을 넣고 Homogenizer한 후 사용설명서에 따라 Total RNA를 회수한 후 RNase-free water에 녹여 사용 전 까지 -70 $^{\circ}$ C에 보존하였다. PPAR $\gamma$  유전자의 발현을 확인하기 위하여 genomic DNA가 제거된 Total RNA 5 $\mu$ g을 사용하여 Superscript II RNaseH-reverse transcriptase (Invitrogen)와 ran-dom primer를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. PCR은 1 $\mu$ l first strand cDNA를 사용하여 NCBI에 보고된 한우 PPAR $\gamma$  유전자(accession No. AY179866)에 상응하는 20 pmole sense

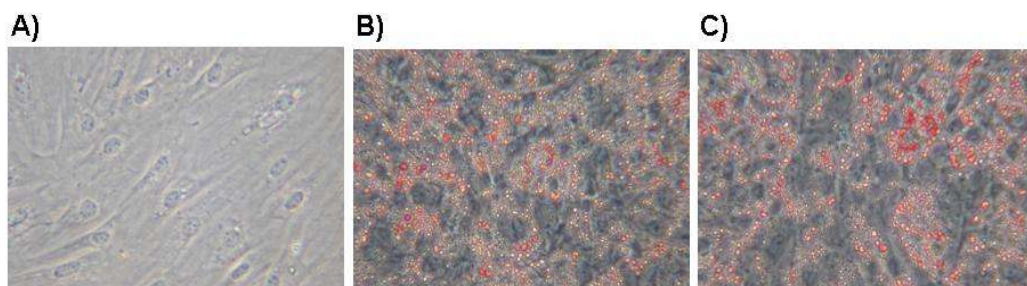


Fig. 1. Morphological changes of bovine intramuscular preadipocytes from Hanwoo at day 18 of culture in the differentiation medium. A) Control(0 day), B) Without thiazolidinedione, C) With 25 $\mu$ M thiazolidinedione.

(AATCCCTGTTCCGTG CTGTGATGGGTGAAA)와 antisense(GAACTCGG ACTTCTCTGCTAATACA-AGTCC) primer를 이용하여  $1 \times$  PCR-buffer, 0.5 U ExTaq-polymerase (TaKaRa), 각  $200\mu\text{M}$  dNTP 조성으로 denaturation  $94^\circ\text{C}$  30초, annealing  $68^\circ\text{C}$  30초, extension  $72^\circ\text{C}$  2분, 33cycle의 반응조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

한우 등심조직으로부터 intramuscular preadipocyte 세포의 분리는 collagenase 처리에 의하여 분리되었으며 그림 1의 A에 나타낸 바와 같이 전형적인 섬유아세포의 형태를 나타내었다. 이들 세포는 정상적인 10% FBS를 포함하는 DMEM에서 배양하는 동안에는 세포질에 lipid drop plate가 침착되지 않았다. 그러나 이들 세포를 6cm dish에 배양하여 confluent하게 자라면 48시간 후에 분화배지로 지방세포로의 분화를 유도한 결과 약 10일 이후부터 lipid drop plate가 나타나기 시작하였으며 18일에는 70~80%의 세포에서 lipid drop plate가 나타났다(그림 1B). 또한 지방분화 정도를 triglycerid의 침착여부 확인하기 위하여 지방분화전 세포와 지방분화 후 18일째의 세포에서 triglycerid의 양을 측정하였다. 결과 18일째 세포에서 6cm dish당  $122.8 \pm 7.27\mu\text{g}$ 의 triglycerid이 검출되었으며 분화 전에는 전혀 검출되지 않았다(그림 2). Aso 등 (1995)은 24개월과 12개월 거세 일본 화우의 근내 지방을 이용하여 intramuscular preadipocyte 세포를 분리한 후 bovine fibroblast growth factor (bFGF)가 첨가된 배양액에서 배양하여 세포의 colony를 분리하고 이들 세포를 지방세포로 분화 유도한 결과 정상적으로 lipid drop plate가 세포질에 침착됨을 확인하였다. 또한 Ohyama 등 (1998)은 21개월 된 거세 일본 화우의 신장 주변 지방조직으로부터 stromal-vascular 세포를 분리하고 지방세포로 분화를 유도한 결과 지방세포로 분화가 유도되었음을 보고하였다. 본 연구에서도 Aso 등 (1995)과 Ohyama 등 (1998)의 방법을 따라서 한우 등심유래 intramuscular

preadipocyte 세포를 지방세포로 분화 유도한 결과 lipid drop plate가 세포질에 출현하였으며 또한 triglyceride의 침착도 유도됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 제조된 한우 intramuscular preadipocyte 세포가 정상적으로 지방세포로 분화되었음을 나타내는 것이다.

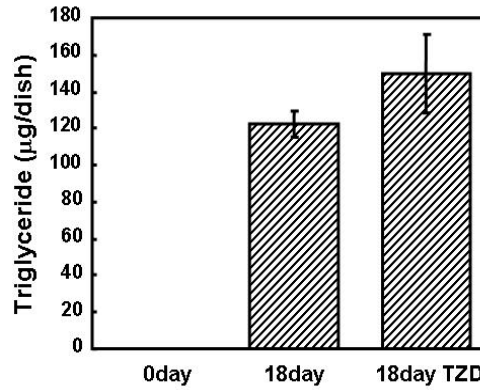


Fig. 2. Triglyceride accumulation during adipocyte differentiation of intramuscular preadipocytes. Triglyceride content was determined at 18 day after differentiation with or without thiazolidinedione (TZD). Results are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate dishes.

PPAR $\gamma$ 의 리간드인 thiazolidinedione은 설치류, 사람 뿐 만아니라 소에서도 강력한 지방분화 유도 물질로 알려져 있다(Torii 등, 1998; Grimaldi, 2001). 그러므로 한우 intramuscular preadipocyte 세포의 지방분화에 있어서 thiazolidinedione의 영향을 확인하기 위하여  $25\mu\text{M}$ 을 분화배지에 첨가한 결과 전체적인 지방분화에는 큰 영향이 없었으나 지방구의 크기는 약간 증가한 경향을 나타내었다(그림 1C). 또한 분화된 세포에 침착된 triglyceride의 양을 측정 한 결과 6cm dish당  $149.52 \pm 20.96\mu\text{g}$ 으로 thiazolidinedione을 첨가하지 않은 처리군의  $122.8 \pm 7.27\mu\text{g}$ 보다 다소 높은 수치를 나타내었다. Ohyama 등 (1998)은 thiazolidinedione을 지방조직으로부터 분리한 preadipocyte 세포의 지방분화를 촉진한다고 보고하고 있으며 Troii 등 (1998)도 근육조직 유래 섬유아세포상의 세포가 thiazolidinedione

첨가에 의하여 지방분화가 유도됨을 보고하고 있다. 본 연구에서도 thiazolidinedione을 첨가한 처리구에서 대조구 보다 다소 높은 triglycerid의 양이 증가하였으므로 thiazolidinedione은 한우 등심유래 intramuscular preadipocyte 세포의 지방분화를 촉진함을 확인하였다.

지방분화 관련 유전자의 발현이 본 연구에서 사용한 지방분화방법에 따라 정상적으로 유도되는지를 확인하기 위하여 지방분화에 있어서 중요한 전사인자로 알려진 PPAR $\gamma$ 의 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과 그림 3에 나타내는 바와 같이 분화 0일에 매우 미약한 발현이 확인되었으나 이와 같은 발현은 지방분화가 유도됨에 따라 억제되었다가 다시 9일째에 약간의 발현이 확인되었고 지방분화유도 12일째에는 급격하게 그 발현이 증가됨을 확인하였다. PPAR $\gamma$ 은 지질 대사에 관련된 유전자의 전사를 조절하는 전사인자로서 핵내 호르몬 수용체로 분류되고 retinoid X 수용체(RXR)와 heterodimer을 형성하여 유전자의 promoter에 존재하는 peroxisome proliferator responsive element에 결합하여 전사활성을 조절하는 것으로 알려져 있으며(Grimaldi, 2001) 특히, 지방세포분화

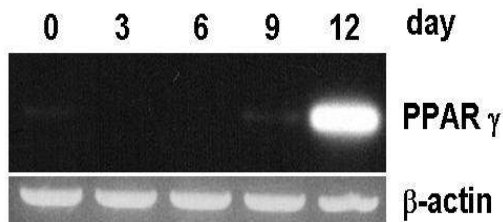


Fig. 3. Expression of PPAR $\gamma$  gene during differentiation of intramuscular preadipocytes. Total RNA was prepared from Hanwoo intramuscular fibroblast-like cells at various time point after the adipocyte differentiation. Synthesis of first strand cDNA was performed using Superscript II Rnase H-reverse transcriptase (Invitrogene) with random primer and 5 $\mu$ g of total RNA as template. PCR-amplification was carried out with 1 $\mu$ l of the first strand cDNA-mix and PPAR $\gamma$  specific primers.

에 있어서 분화말기에 지방형성관련 유전자의 전사에 중요한 것으로 보고되고 있다. 그러므로 본 연구에서 지방분화에 따라 PPAR $\gamma$  mRNA 발현의 증가를 보인 것은 본 연구에서 사용한 지방분화 방법에 의하여 한우 등심유래 intramuscular preadipocyte 세포가 지방세포로 분화 될 수 있음을 나타내고 있다.

이러한 결과를 종합하여볼 때 본 연구에서 분리된 한우 등심유래 intramuscular preadipocyte 세포는 *in vitro* 에서 지방세포로 분화됨을 확인할 수 있었으며 이러한 *in vitro* 지방분화는 앞으로 한우의 고급육 생산에 대한 기초 연구에 많은 도움을 줄 것으로 생각한다.

#### IV. 요 약

가축에 있어서 marbling의 발달은 근육 내 지방세포의 크기 증가와 수에 밀접한 관계가 있다. 근육 내에 있는 지방전구세포는 marbling이 형성되는 동안 지방세포로 분화될 수 있는 능력을 가지고 있다. 본 연구에서는 한우 12개월령에서부터 intramuscular preadipocyte 세포를 분리하였으며 그 세포는 섬유아세포형태를 나타내었다. intramuscular preadipocyte 세포는 insulin, dexamethasone과 thiazolidinedione을 포함하는 지방분화 배지로 배양하면 지방세포로 분화되었다. 18일째 까지 지방분화를 유도하였을 때 triglyceride의 양은 대조구인 0일째보다 월등히 높았다. 그리고 thiazolidinedione을 처리하였을 때는 지방형성이 더 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 지방분화에 있어서 PPAR $\gamma$  mRNA의 발현이 증가함을 RT-PCR로 확인하였다. 결론적으로 본 연구에서 지방분화에 사용된 배양 시스템은 intramuscular preadipocyte 세포를 지방세포로 분화를 유도하였으며 이들 세포는 한우에 있어서 지방분화 기능을 연구하는데 사용될 수 있을 것이다.

#### V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

## VI. 인 용 문 헌

1. Aso, H., Abe, H., Nakajima, I., Ozutsumi, K., Yamaguchi, T., Takamori, Y., Kodama, A., Hoshino, FB. and Takano, S. 1995. A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: nonexpression of GLUT-4 protein during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 213:369-375.
2. Cianzio, DS., Topel, DG., Whitehurst, GB., Beitz, DC. and Self, HL. 1985. Adipose tissue growth and cellularity: changes in bovine adipocyte size and number. *J Anim Sci.* 60(4):970-976.
3. Cowherd, R. M., Lyle, R. E. and McGehee Jr, R. E. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10:3-10.
4. Faulconnier, Y., Thevenet, M., Flechet, J. and Chilliard, Y. 1994. Lipoprotein lipase and metabolic activities in incubated bovine adipose tissue explants: effects of insulin, dexamethasone, and fetal bovine serum. *J Anim Sci.* 72:184-191.
5. Green, H. and Kehinde, O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell.* 1:113-116.
6. Grimaldi PA. 2001. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Progress in Lipid Research.* 40:269-281.
7. Harper, G.S. and Pethick, D.W. 2004. How might marbling begin? *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 44:653-662.
8. Nakajima, I., Muroya, S., Tanabe, R. and Chikuni, K. 2002. Positive effect of collagen V and VI on triglyceride accumulation during differentiation in cultures of bovine intramuscular adipocytes. *Differentiation.* 70:84-91.
9. Ohyama, M., Matsuda, K., Torii, S., Matsui, T., Yano, H., Kawada, T. and Ishihara, T. 1998. The interaction between vitamin A and thiazolidinedione on bovine adipocyte differentiation in primary culture. *J Anim Sci.* 76:61-65.
10. Torii, SI., Kawada, T., Matsuda, K., Matsui, T., Ishihara, T. and Yano, H. 1998. Thiazolidinedione induces the adipose differentiation of fibroblast-like cells resident within bovine skeletal muscle. *Cell Biol Int.* 22:421-427.
11. Tchoukalova, Y. D., Hausman, D. B., Dean, R. G. and Hausman, G. J. 2000. Enhancing effect of troglitazone on porcine adipocyte differentiation in primary culture: A comparison with dexamethasone. *Obes. Res.* 8: 664-672.

(접수일자 : 2005. 8. 12. / 채택일자 : 2005. 12. 14.)