

# 스테로이드 성호르몬이 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 영향

김혜림\* · 이기호 \*\* · 최인호\*\*\* · 정정수\*

충북대학교 축산학과\*, 을지대학교 생화학교실\*\*, 영남대학교 생명공학부\*\*\*

## Effects of Sex Steroid Hormones on Differentiation of Pig Preadipocytes

H. R. Kim\*, K. H. Lee\*\*, I. H. Choi\*\*\* and C. S. Chung\*

Department of Animal Science, Chungbuk National University\*,

Department of Biochemistry and Molecular Biology and Center of Antiaging, Eulji University\*\*,

School of Biotechnology, Yeungnam University\*\*\*

### ABSTRACT

The current study was undertaken to determine the effects of sex steroid hormones (estrogen, testosterone and 19-nortestosterone) on differentiation and proliferation of pig preadipocytes. The preadipocytes were isolated from the backfat of new-born female pigs by collagenase digestion.  $10^{-8}$ M and  $10^{-7}$ M sex steroid hormones were treated to the cultured preadipocytes. Sex steroid hormones treated during the early stage of cell growth did not affect differentiation and proliferation of preadipocytes. However, testosterone and 19-nortestosterone treated during the late stage of cell growth stimulated differentiation of pig preadipocytes. (Key words : Sex steroid, Pig, Preadipocytes, Differentiation)

### I. 서 론

동물의 암, 수 간에 지방분포와 지방축적의 정도에 차이가 있고, 옹성호르몬을 사람에게 투여했을 때 근육축적이 늘어나는 반면 지방축적이 감소하는 것이 보고되었는데 (Snyder 등, 2000), 이러한 사실들은 스테로이드 성호르몬이 동물의 지방축적에 크게 관여함을 나타낸다. 스테로이드 성호르몬이 동물의 지방축적에 관여하는 것에 대한 연구의 일환으로 지방세포를 배양하는 중에 옹성호르몬과 자성호르몬을 처리해서 이들 호르몬이 지방세포의 증식이나 분화에 미치는 영향에 관한 연구가 많이 수행되어 왔는데, 주로 쥐에서 분리한 지방전구세포와 세포주 (cell line)를 많이 이용했고, 일부 연

구는 사람 지방세포를 이용하기도 했으나 돼지 지방전구세포를 이용한 연구는 거의 전무한 편이다. 본 연구를 포함한 여러 연구에서 사용하는 동물의 지방조직에서 분리한 지방전구세포 (preadipocyte)는 stroma-vascular cell로 postconfluent mitosis를 그치지 않고 insulin과 glucocorticoid에 의해 성숙세포로 분화하는 세포이다 (Loffler와 Hauner, 1987).

Dieudonne 등 (2000)은 배양중인 쥐의 지방세포에 테스토스테론 (testosterone)을 처리했을 때 세포의 분화가 억제됐고, 반대로 에스트로겐 (estrogen) 처리는 세포 분화를 촉진했다고 보고했다. Singh 등 (2006)은 테스토스테론 처리가 3T3-L1 세포의 분화를 억제했다고 보고했다. 그리고 Singh 등 (2003)은 쥐의 C3H 10T1/2

Corresponding author : C. S. Chung, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea.

Tel : +82-43-261-2549, Fax : +82-43-276-3140, E-mail : chungpig@hotmail.com

pluripotent 세포에 응성호르몬을 처리했을 때 근육세포의 분화를 촉진시켰으나 지방세포의 분화는 억제했다고 보고했다. Roncari 등 (1978)은 배양중인 사람 지방세포에 에스트로겐을 처리했을 때 지방세포의 증식을 촉진했다고 보고했다. 위의 모든 연구 결과들이 응성호르몬은 지방세포의 분화나 증식을 억제하고, 반대로 자성호르몬은 분화나 증식을 촉진한 것을 보여주고 있는데, 이 사실은 *in vitro* 세포배양 실험이 *in vivo*에서 나타나는 현상을 잘 반영해주고 있어서 지방세포배양 실험의 타당성을 설명해준다. 위에 기술한 스테로이드 성호르몬이 지방세포의 증식이나 분화에 그 작용을 나타내기 위해서는 배양중인 지방세포에 이들 호르몬의 수용체가 존재해야 하는데 Dieudonne 등 (2000)은 에스트로겐과 테스토스테론의 receptor antagonist를 사용해서 쥐의 지방전구세포에 이들 호르몬의 수용체가 있음을 간접적으로 확인했다.

스테로이드 성호르몬이 지방세포의 분화에 미치는 작용은 쥐나 세포주를 이용해서 수많은 실험이 수행되었으나 돼지에서는 거의 전무해서 위에 기술한 스테로이드 성호르몬의 작용이 돼지 지방세포에서도 나타나는지 궁금하다. 그래서 본 연구의 주목적은 갓난 돼지의 지방조직에서 분리한 지방전구세포에 여러 스테로이드 성호르몬을 처리해서 이들이 지방전구세포의 분화와 증식에 미치는 영향을 구명하는 것이다. 한편 본 연구에서는 돼지에서만 혈중에 높은 농도로 존재하는 돼지 특이 스테로이드 성호르몬으로 알려진 노르테스토스테론(19-nortestosterone)(De Wasch 등, 2001)의 작용도 함께 구명하려 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양

지방전구세포 (stroma-vascular cell)는 신생자의 등지방 조직에서 분리해서 배양했는데, 세포배양은 Suryawan 등 (1997)의 방법을 따르면서 본 연구실에서 수정하여 확립한 방법을 이용했다 (문과 정, 2004). 본 연구에서 사용한

돼지 지방전구세포의 분리 및 배양방법을 간단히 설명하면 다음과 같다.

생후 1~2일령 된 신생 암돼지를 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>) 기체를 주입하여 질식사 시킨 후 등지방 조직을 떼어냈다. 떼어낸 지방조직을 잘게 세절한 후 collagenase와 함께 shaking water bath에서 40분 동안 배양한 후 250 μm nylon screen으로 여과해서 소화 안 된 지방조직을 제거했다. 여과 후 원심분리해서 지방전구세포가 들어있는 침전물을 KRB 용액으로 분산해서 다시 원심분리 후 75 μm nylon screen으로 여과해서 지방전구세포를 수집했다. 10% FBS를 함유한 DMEM/F-12를 이용하여 6-well plate에 1 × 10<sup>6</sup> cell/well을 접종했다. 접종한 다음날 적혈구 등을 제거하기 위해 세척한 후 분화유도 (day 0)를 위해 insulin (600 ng/ml), transferrin (1 ng/ml) 및 hydrocortisone (500 ng/ml)을 함유한 5% FBS DMEM/F-12를 세포배양이 끝날 때까지 사용했으며 배지는 2일마다 교체했다.

### 2. 스테로이드 성호르몬 처리

돼지 지방전구세포를 4마리의 암돼지에서 분리해서 본 실험에 사용했는데 배지와 FBS에 함유되어 있는 스테로이드 성호르몬의 작용을 없애기 위해서 phenol red가 없는 배지와 charcoal dextran 처리한 FBS를 사용했다. 접종한 세포를 세척한 날 즉 day 0부터 day 2까지는 위에 기술한 배지와 FBS를 사용했는데 이 기간 동안 10<sup>-8</sup>M과 10<sup>-7</sup>M의 에스트로겐, 테스토스테론 및 노르테스토스테론을 배양중인 세포에 처리했다. day 3부터 일반적으로 사용하는 배지와 FBS를 세포배양이 끝날 때까지 사용했다. 그리고 스테로이드 성호르몬이 세포분화에 미치는 작용이 세포의 증식기 뿐만 아니라 세포의 분화기에도 미치는 가능성을 염두에 두고 day 0~day 2 뿐만 아니라 day 6~day 8에도 스테로이드 성호르몬 처리를 했다. 이 경우에도 스테로이드 성호르몬 처리기간 동안만 phenol red가 없는 배지와 charcoal dextran 처리한 FBS를 사용했다. 세포분화는 day 8에 측정했고, 세포의 증식은 day 4에 측정했다. 본 연

구에서 2일 동안 스테로이드 호르몬 처리한 이유 중의 하나는 스테로이드 호르몬 처리기간에 사용한 배지와 FBS가 세포의 성장을 위한 좋은 조건이 아니기 때문에 오랫동안 처리하기가 어려웠다.

### 3. 지방세포의 분화 및 증식 측정

지방전구세포가 성숙지방세포로 분화하기 위해서는 먼저 증식 (proliferation)이 일어나고 난 뒤에 협의의 분화 (differentiation)가 일어나는데, 본 연구에서 측정된 광의의 분화는 증식과 협의의 분화를 포함한 결과를 나타낸다. 돼지 지방전구세포의 성숙세포로의 분화정도는 배양중인 세포의 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성도를 측정함으로써 구명했는데 기본적으로는 Wise와 Green(1979)의 방법을 사용했다. GPDH는 dihydroxyacetone phosphate가 glycerol-3-phosphate로 바뀌는데 관여하는 효소인데 이 glycerol-3-phosphate는 triglyceride 합성의 원료가 된다. 그리고 triglyceride는 성숙 지방세포에서 만들어지기 때문에 GPDH는 지방전구세포의 성숙 지방세포로의 분화정도를 측정하는데 사용된다. 그리고 세포수의 측정은 세포내의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt (Roche kit 이름은 wst-1)의 분해 정도에 의해 측정했는데 Brandebourg와 Hu (2005)는 접종한 돼지 지방전구세포의 수가 증가함에 따라 formazan formation이 증가한 것을 관찰했다.

### 4. 통계분석

본 연구에서 얻어진 자료의 특성을 요약하면 다음 모형 방정식으로 나타낼 수 있다.  $y_{ijk} = \mu + A_i + \tau_j + (A \times \tau)_{ij} + \epsilon_{ijk}$ 로서  $y_{ijk}$ 는 관측값이고,  $\mu$ 는 전체 평균이며,  $A_i$ 는  $i$ 번째 개체 (돼지)로 임의효과로 가정하였고,  $\tau_j$ 는  $j$ 번째 처리의 고정효과로 가정하였으며,  $(A \times \tau)_{ij}$ 는 개체 (돼지)와 처리간의 상호효과이고,  $\epsilon_{ijk}$ 는 각 돼지 당 반복 측정된 것으로 이 역시 임의오차로 가정하였다. 얻어진 자료는 변이의 원천을 알

기 위해서 위의 모형 방정식을 이용하여 SAS (SAS, 1998)의 GLM 모듈로 분산 분석을 하였다. 각 처리의 값은 각 반복 당 대조구에 대한 상대적인 값으로 표현하는 것이 합리적일 것으로 사료되어, 각 처리구의 대조구에 대한 상대적 값(백분율)의 최소자승 평균과 그에 따른 표준오차를 나타내었다.

### III. 결과 및 고찰

지금까지 쥐와 사람 지방전구세포를 이용하여 수행한 많은 연구에서 에스트로겐은 지방전구세포의 분화나 증식을 촉진했고, 테스토스테론은 억제했다(Garcia 등, 1999; Dieudonne 등, 2000; Hong 등, 2007). 그러나 Fig. 1에서 보는 대로 돼지 지방전구세포 배양초기에 2일 동안  $10^{-8}M$ 과  $10^{-7}M$ 의 에스트로겐, 테스토스테론 및 노르테스토스테론을 처리한 결과 세포분화에 영향을 미치지 않았다. 본 연구에서 스테로이드 성호르몬의 작용이 나타나지 않은 이유는 확실하지 않은데 다음과 같이 추론할 수 있다. 1) 본 연구에서 사용한 스테로이드 성호르몬의

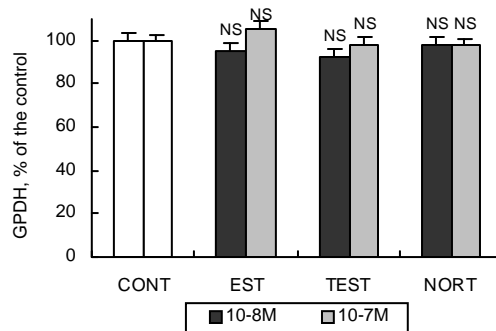


Fig. 1. The effects of steroid hormones on differentiation of pig preadipocytes.  $10^{-8}M$  or  $10^{-7}M$  estrogen (EST), testosterone (TEST) and 19-nortestosterone (NORT) were treated to pig preadipocytes for the first two days (day 0-day 2) after washing the cells. The degree of cell differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. Values are mean  $\pm$  SE; the difference from Control; NS, not significant.

농도는 생리적 농도로 알려진 (Lu 등 1998; Vanderschueren 등 2000)  $10^{-8}$ M과  $10^{-7}$ M이었는데, 이 농도가 돼지 지방전구세포의 분화를 촉진할 만큼 충분히 높지 않을 가능성이 있다는 점이다. Dieudonne 등 (2000)은 쥐 지방전구세포를 이용한 실험에서  $10^{-8}$ M과  $10^{-7}$ M 농도에서는 에스트로겐의 작용이 나타나지 않았고,  $10^{-5}$ M 농도에서 그 작용이 나타났다고 보고했다 그러나 테스토스테론은  $10^{-7}$ M 농도에서도 그 작용이 나타났다. 2) 본 연구에서는 돼지 지방전구세포를 갖는 돼지의 피하지방조직에서 분리했는데, 이 지방전구세포가 쥐나 사람의 지방전구세포와는 달리 안드로겐 수용체(androgen receptor)나 에스트로겐 수용체(estrogen receptor)의 양이 매우 적을 가능성이 있다는 점이다. Dieudonne 등 (2000)은 쥐의 피하지방에서 분리한 지방전구세포는 부정소 지방에서 분리한 것에 비해 테스토스테론의 작용이 덜 나타났다고 보고했다.

노르테스토스테론은 수돼지의 혈중에 높은 농도로 존재하는 돼지 특이 스테로이드 성호르몬으로 (Schwarzenberger 등, 1993), anabolic 작

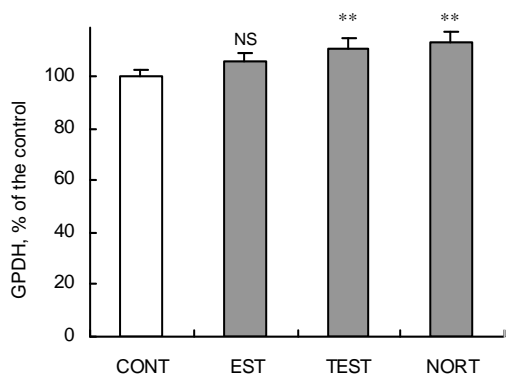


Fig. 2. The effects of steroid hormones on differentiation of pig preadipocytes.  $10^{-7}$ M estrogen (EST), testosterone (TEST) and 19-nortestosterone (NORT) were treated to pig preadipocytes for two days during the late stage of cell growth (day 6-day 8). The degree of cell differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. Values are mean  $\pm$  SE: the difference from Control; NS, not significant; \*\* $p$ <0.01.

용과 androgenic 작용의 비율이 9:1로서 돼지의 빠른 성장에 기여하는 것으로 알려졌기에 배양 중인 지방전구세포의 분화에 영향을 미칠 것으로 예상되었으나 다른 호르몬과 마찬가지로 아무런 작용을 나타내지 않았다.

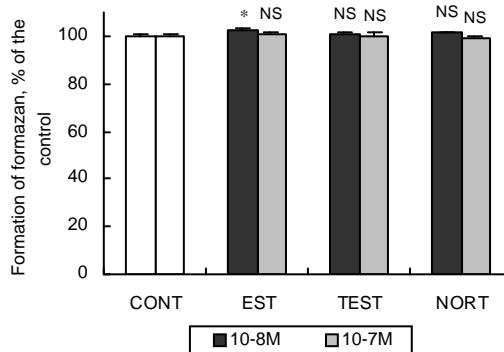


Fig. 3. The effects of steroid hormones on proliferation of pig preadipocytes.  $10^{-8}$ M or  $10^{-7}$ M estrogen (EST), testosterone (TEST) and 19-nortestosterone (NORT) were treated to pig preadipocytes for the first two days (day 0-day 2) after washing the cells. The degree of cell differentiation was determined by measuring formation of formazan activity. Values are mean  $\pm$  SE: the difference from Control; NS, not significant; \* $p$ <0.05.

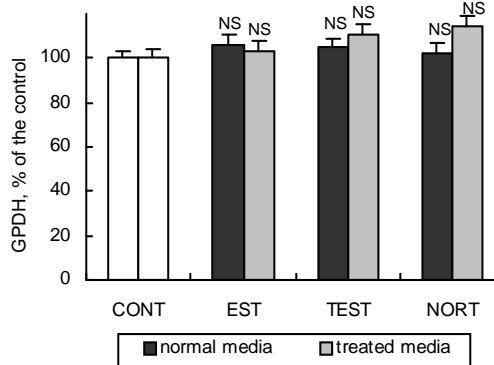


Fig. 4. Comparison of normal FBS & media and charcoal dextran-treated FBS & phenol red-removed media in differentiation of pig preadipocytes.  $10^{-7}$ M estrogen (EST), testosterone (TEST) and 19-nortestosterone (NORT) were treated to pig preadipocytes for the two days. Values are mean  $\pm$  SE: the difference from Control; NS, not significant.

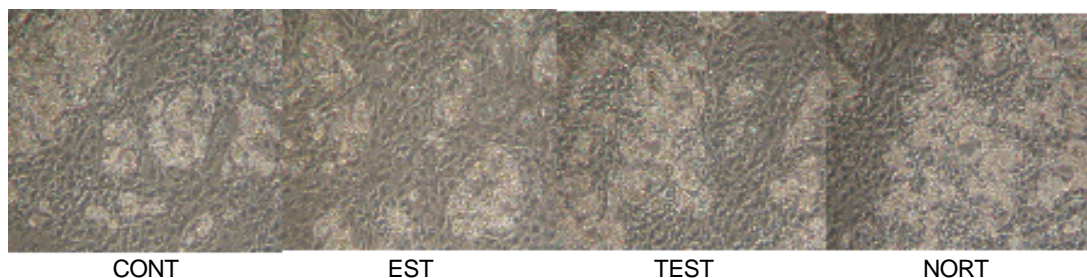


Fig. 5. Micrographs showing differentiation of pig preadipocytes cultures treated with  $10^{-7}$ M estrogen (EST), testosterone (TEST) and 19-nortestosterone (NORT).

Fig. 2에는 세포배양 후기 즉 세포의 증식이 지난 분화기에 2일 동안  $10^{-7}$ M의 스테로이드 성호르몬의 처리 결과가 나타나 있는데 세포배양 전기에 처리한 결과와는 달리 스테로이드 성호르몬의 효과가 나타났다. 세 호르몬 모두 분화를 촉진시켰는데, 에스트로겐의 작용은 유의하지 않고, 예상과는 반대로 테스토스테론과 노르테스토스테론은 세포 분화를 촉진했다. 이것은 지금까지의 쥐나 사람의 지방조직 세포에서 수행된 결과와 상반된 것이다. 이에 대한 이유는 확실하지 않다.

Fig. 3에는 스테로이드 성호르몬이 돼지 지방전구세포의 증식에 미치는 영향이 나타나 있는데 각 호르몬의 처리효과가 뚜렷하지 않았다. 이 사실은 Fig. 1의 결과를 설명해 준다고 볼 수 있는데 그 이유는 Fig. 1은 스테로이드 성호르몬이 세포의 증식에 미치는 작용이 세포 분화에 나타나는 것을 보여주기 때문이다.

본 연구에서 스테로이드 성호르몬 처리 기간 동안 사용한 FBS와 배지가 세포가 정상적으로 성장하는데 적합하지 못할지도 모른다는 가정하에 정상적인 FBS와 배지, 그리고 charcoal dextran 처리한 FBS와 phenol red를 제거한 배지를 비교한 결과가 Fig. 4에 나타나 있는데, 일반적으로 사용하는 FBS와 배지와 그렇지 않은 구간에 스테로이드 성호르몬 처리효과에 차이가 없었다. Fig. 5에는 스테로이드 성호르몬 처리가 세포분화에 미치는 작용에 대한 현미경 사진이 나타나 있는데 처리간에 차이가 없었는데 이것은 Fig. 4의 결과를 잘 반영해 준다.

갓난 돼지의 등지방에서 분리 배양한 돼지 지방전구세포에 스테로이드 성호르몬을 처리했

을 때 뚜렷한 작용이 본 연구에서 나타나지 않았는데, 과연 스테로이드 성호르몬이 돼지 지방전구세포의 분화나 증식에 아무런 작용이 없는지를 확인하기 위해서 다음과 같은 실험수행이 필요할 것이다. 1) 돼지의 성장이 진행되면 지방전구세포가 스테로이드 성호르몬에 반응하는지를 알기 위해서 돼지의 연령에 따라 차이가 나는지를 구명하고 2) 생리적 농도가 아닌 약리적 농도에서 스테로이드 성호르몬이 작용하는지를 구명하고 3) 본 연구에서는 암돼지에서 분리한 지방전구세포를 이용했는데 수태지의 세포도 함께 조사해서 성별에 의한 차이가 있는지를 구명할 필요가 있다.

본 연구의 결과를 요약하면 에스트로겐, 테스토스테론 및 노르테스토스테론을 돼지 지방전구세포에 처리했을 때 세포의 분화나 증식에 뚜렷한 작용이 나타나지 않았다. 다만 테스토스테론과 노르테스토스테론을 세포배양 후기에 처리했을 때 세포분화를 촉진시켰다.

#### IV. 요약

본 연구는 스테로이드 성호르몬 즉 에스트로겐, 테스토스테론 및 노르테스토스테론이 돼지 지방전구세포의 분화와 증식에 미치는 영향을 구명하기 위해서 수행하였다. 지방전구세포는 갓난 암돼지의 등지방조직을 떼어내어 collagenase를 처리해서 분리해서 배양했다. 세포 배양중에  $10^{-8}$ M과  $10^{-7}$ M의 스테로이드 성호르몬을 처리했다. 세포배양 전기에 스테로이드 성호르몬을 처리했을 때 지방전구세포의 분화나 증식에 아무런 영향을 미치지 않았고, 세포배양

후기에 처리했을 때는 테스토스테론과 노르테스토스테론이 세포분화를 촉진시켰다.

## V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20050401034712)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## VI. 인 용 문 헌

1. Brandebourg, T. D. and Hu, C. Y. 2005. Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. *J. Anim. Sci.* 83:2096-2105.
2. De Wasch, K., Le Bizec, B., De Brabander, H., Andre, F. and Impens, S. 2001. Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profiles of nandrolone metabolites. II. Identification and quantification of 19-norsteroids responsible for 19-nornandrostosterone and 19-norretiocholanolone excretion in human urine. *Rapid Commun. Mass spectrom.* 15:1442-1447.
3. Dieudonne, M. N., Pecquery, R., Leneuve, M. C. and Giudicelli, Y. 2000. Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: Evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2. *Endo.* 141(2):649-656.
4. Garcia, E., Lacasa, M., Agli, B., Giudicelli, Y. and Lacasa, D. 1999. Modulation of rat preadipocyte adipose conversion by androgenic status: involvement of C/EBPs transcription factors. *J. Endo.* 161:89-97.
5. Hauner, H., Schmid, P. and Pfeiffer, E. F. 1987. Glucocorticoid and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:832-835.
6. Hong, L., Colpan, A., Peptan, I. A., Daw, J., George, A. and Evans, C. A. 2007. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue. Eng.* 13(6):1197-203.
7. Loffler, G. and Hauner, N. 1987. Adipose tissue development: the role precursor cells and adipogenic factors. *Klin Wochenschr.* 1:65-69.
8. Lu, C. C., Tasi, S. C., Wang, S. W., Tasi, C. L., Lau, C. P., Shih, H. C., Chen, Y. H., Chiao, Y. C., Liaw, C. and Wang, P. S. 1998. Effects of

- ovarian steroid hormones and thyroxine on calcitonin secretion in pregnant rats. *Am. J. Physiol.* 274:E246-252.
9. Roncari, D. A. K. and Van, R. L. R. 1978. promotion of human adipocyte precursor replication by 17-beta estradiol in culture. *J Clin Invest.* 62:503-508.
10. SAS. 1998. SAS Use's Guide: Statistics, SAS Inst, Int., Cary, N.C.
11. Schwarzenberger, F., Toole, G. S., Christie, H. L. and Raeside, J. I. 1993. Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta. Endo.* 128(2):173-177.
12. Singh, R., Artaza, J. N., Taylor, W. E., Braga, M., Yuan, X., Gonzalez-cadavid, N. F. and Bhasin, S. 2006. Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: Nuclear translocation of androgen receptor complex with  $\beta$ -catenin and T-cell factor 4 May bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endo.* 147(1):141-154.
13. Singh, R., Artaza, J. N., Taylor, W. E., Gonzalez-cadavid, N. F. and Bhasin, S. 2003. Androgens stimulates myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *J. Endo. Soci.* 144(11):5081-5088.
14. Snyder, P. J., Peachey, H., Berlin, J. A., Hannonoush, P., Haggad, G., Dlewati, A., Santanna, J., Loh, L., Lenrow, D. A., Holmes, J. H., Kappor, S., Atkinson, L. and Strom, S. 2000. Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J. Clin. Endo. Metab.* 85:2670-2677.
15. Suryawan, A., Swanson, L. V. and Hu, C. Y. 1997. Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, and required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture. *J. Anim. Sci.* 75:105-111.
16. Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Van Herck, E., Swinnen, J. V. and Bouillon, R. 2000. An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement. *Endo.* 141:1642-1647.
17. Wise, L. S. and Green, H. 1979. participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate in adipose conversion of 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 254:273-275.
18. 문현석, 정정수. 2004. Conjugated linoleic acid (CLA) 이성체가 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지* 46(6):967-974. (접수일자: 2007. 9. 12. / 채택일자: 2007. 10. 22.)