

스테로이드 성호르몬이 암, 수 돼지 지방전구세포의 증식과 분화에 미치는 영향

김원영 · 정정수*

충북대학교 농업생명환경대학 축산학과

Effects of Sex Steroid Hormones on Proliferation and Differentiation of Preadipocytes from Female and Male Pigs

Won Young Kim and Chung Soo Chung*

Department of Animal Science, Chungbuk National University

ABSTRACT

The current study was undertaken to determine the effects of sex steroid hormones (estrogen, testosterone and 19-nortestosterone) on proliferation and differentiation of preadipocytes of female and male pigs. The preadipocytes were isolated from the backfat of new-born female and male pigs by collagenase digestion and cultured in the CO₂ incubator. The concentration of 10⁻⁷M and 10⁻⁶M sex steroid hormones were treated to the cultured preadipocytes. Regarding the effects on preadipocytes proliferation, high concentration (10⁻⁶M) of all the three hormones increased proliferation of female preadipocytes, and only estrogen and testosterone increased proliferation of male preadipocytes. Regarding the effects on preadipocyte differentiation, all the three hormones increased differentiation of pig preadipocytes, regardless of hormone concentrations and sex of preadipocytes. The degree of stimulation of cell differentiation by sex steroid hormones was greater than that of cell proliferation.

(Key words : Sex steroid hormone, Pig, Preadipocytes, Proliferation, Differentiation)

서 론

동물의 암, 수간에 지방축적 정도에 차이가 있고(Campbell 등, 1989) 여성호르몬을 남성에게 투여했을 때 근육은 증가한 반면 지방조직은 감소된 것이 보고되었다(Snyder 등, 2000). 이러한 사실들은 스테로이드 성호르몬이 동물의 지방축적에 관여함을 나타낸다. 지방조직은 지방세포로 이루어져 있기에 지방세포를 배양하는 중에 스테로이드 성호르몬을 처리해서 이들 호르몬이 세포의 증식(proliferation)과 분화(differentiation)에 미치는 작용에 대한 연구가 많이 수행되었는데(Dieudonne 등, 2000; Singh 등, 2006; Hong 등, 2007) 주로 쥐나 세포주(cell line) 지방세포를 이용했고, 일부는 사람의 지방조직에서 분리한 지방세포를 이용했지만, 돼지 지방세포를 이용한 연구는 극히 적은 편이다.

Roncari 등(1978)은 배양중인 사람 지방세포에 에스트로겐(estrogen)을 처리했을 때 세포의 증식이 촉진되었다고 보고했다. Dieudonne 등(2000)은 배양중인 쥐 지방세포에 테스토스테론(testosterone)을 처리했을 때 세포분화가 억제되었고, 반대로 에스트로겐 처리는 분화를 촉진했다고 보고했다. Singh 등(2006)은 지

방세포 세포주인 3T3-L1에 테스토스테론을 처리했을 때 분화가 억제되었다고 보고했다. 이들 연구들은 여성호르몬은 지방전구세포의 증식이나 분화를 억제하고, 남성호르몬은 증식이나 분화를 촉진한 결과를 보여주고 있다. 이것은 *in vitro* 지방세포 실험 결과가 *in vivo*에서 일어나는 현상을 잘 반영하고 있어서 스테로이드 성호르몬에 의한 지방세포 배양 실험의 타당성을 설명해 준다. 더욱이 에스트로겐, 프로게스테론 및 테스토스테론의 수용체가 지방조직에 존재함이 확인 되었기에(Cooke 등, 2001, Mayes와 Watson, 2004; Kubo 등, 2008), 스테로이드 성호르몬의 지방세포에 작용의 중요성이 크게 인식되고 있다.

스테로이드 성호르몬이 지방세포의 분화에 미치는 작용은 쥐와 사람의 지방조직에서 분리한 지방세포 및 세포주를 이용해서 수많은 연구가 수행되었으나, 돼지에서는 극히 적어서 위에서 설명한 스테로이드 성호르몬의 작용이 돼지 지방세포에서도 나타나는지가 구명되어야 할 사항이다. 지금까지 암, 수 돼지의 지방조직에서 분리한 지방세포를 비교한 실험은 없었다. 그래서 본 연구의 주목적은 암, 수 갓난 돼지의 지방조직에서 분리한 지방세포에 여러 스테로이드 성호르몬을 처리해서, 이들 호르몬 간에, 그리고 암, 수 지

* Corresponding author : Chung Soo Chung, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea. Tel: 82-43-261-2549, Fax: 82-43-276-3140, E-mail: cschung@chungbuk.ac.kr

방세포간에 지방세포의 증식과 분화에 미치는 작용에 차이가 있는지를 구명하는 것이다. 그리고 본 연구에서는 돼지에서만 혈중에 높은 농도로 존재하는 스테로이드 성호르몬으로 알려진 노르테스토스테론(19-nortestosterone) (De Wash 등, 2001)의 작용도 함께 구명하려 한다.

재료 및 방법

1. 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양

본 연구는 돼지의 등지방조직으로부터 지방전구세포를 분리해서 배양하는 중에 스테로이드 성호르몬인 에스트로겐, 테스토스테론, 노르테스토스테론이 지방전구세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에서 사용한 돼지 지방전구세포는 암, 수 갓난 돼지의 등지방조직에서 분리해서 배양했는데, 세포분리 및 배양은 Suryawan 등(1997)의 방법을 따르면서 본 연구실에서 수정하여 확립한 방법을 이용했다(문과 정, 2004). 본 연구에 사용한 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양방법을 간략하게 설명하면 다음과 같다.

지방전구세포의 분리는 생후 1일령의 암, 수 신생자돈을 이산화탄소(CO₂) 기체를 주입하여 질식사 시킨 후 등지방조직을 6g 정도 떼어냈다. 떼어낸 지방조직을 잘게 세절한 후 collagenase를 첨가하여 37°C 진탕수조에서 40분 동안 배양하여 지방조직을 소화시켰다. 그 후 250 μm 나일론 천으로 여과해서 소화 안 된 지방조직을 제거했다. 1,500xg에서 15분 동안 원심분리한 후에 상층액을 제거한 뒤 지방전구세포가 들어있는 침전물을 KRB 용액으로 분산해서 다시 690xg에서 10분 동안 원심분리한 후 75 μm 나일론 천으로 여과해서 지방전구세포를 수집했다. 수집한 지방전구세포를 접종하기 위해 10% FBS를 함유한 DMEM/F-12의 배지를 6-well 배양접시에 2 ml씩 분주한 후, 세포분화에 미치는 영향을 측정하기 위해서 지방전구세포를 1.2 × 10⁶ cell/well을 접종했고, 세포증식에 미치는 영향을 측정하기 위해서는 지방전구세포를 0.6 × 10⁶ cell/well을 접종했다. 접종한 다음날 적혈구 등을 제거하기 위해 지방전구세포를 세척했다.

2. 스테로이드 성호르몬 처리

본 연구에 사용한 스테로이드 성호르몬은 10⁻⁷M과 10⁻⁶M의 에스트로겐, 테스토스테론 및 노르테스토스테론 이었으며 대조구는 이들 호르몬을 처리하지 않았다. 호르몬이 세포의 증식에 미치는 영향을 구명하기 위해서 세포를 세척한 날(day 0)부터 4일 동안 1% FBS를 함유한 DMEM/F-12 배양액에 배양중인 세포에 호르몬을 처리했으며 배지는 2일마다 교체하였다. 호르몬이 세포의 분화에 미치는 영향을 구명하기 위해서는 세척한 날(day 0)부터 day

2까지는 세포의 분화유도를 위해 insulin (600 ng/ml), transferrin (1 ng/ml) 및 hydrocortisone (500 ng/ml)을 함유한 10% FBS DMEM/F-12를 사용했으며 day 2부터 분화측정일(day 6)까지 1% FBS를 함유한 DMEM/F-12 배지에 배양중인 세포에 위의 호르몬을 4일 동안 처리했으며 배지는 2일마다 교체하였다.

3. 지방세포의 증식 및 분화 측정

스테로이드 성 호르몬이 돼지 지방전구세포의 증식에 미치는 영향을 구명하기 위해서 세포수는 트립신 처리에 의해 측정했는데 그 방법을 간략하게 설명하면 다음과 같다. 세포배양이 끝난 후 6-well 배양접시에서 배지를 모두 제거했다. 그리고 배양접시에 versene 1 ml을 넣은 후 배양접시에 남아있는 배지를 깨끗이 제거해준 다음 versene과 트립신을 10:1 비율로 넣고 골고루 섞은 뒤 5분 동안 incubation 시켜서 세포가 배양접시 바닥에서 떨어지게 한 후 1.5 ml 플라스틱 tube에 세포를 수집했다. 세포가 들어있는 용액 10 μl를 hemacytometer에 의해 세포수를 측정했다. 그리고 돼지 지방전구세포의 성숙세포로의 분화정도는 배양중인 세포의 glycerol-3- phosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성도를 측정함으로써 구명했는데 기본적으로는 Wise와 Green (1979)의 방법을 사용했다.

4. 통계처리

본 연구결과 분석에 사용한 통계모델은 다음과 같다.

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + A_j + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ij} : 관측값

μ : 전체평균

τ_i : i 번째 처리의 효과

A_j : j 번째 성별 효과

ε_{ijk} : 임의 오차

본 연구에서 설정한 모형은 PC용 SAS Package (Version 9.1.3)를 이용하여 분석하였으며(SAS, 2004), GLM 프로시저를 이용하여 각 요인들에 대한 분산 분석을 실시하고, 각 성별 내에서 대조구와 처리구간의 유의차 검정은 T-Test를 통하여 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 암, 수 갓난 돼지의 지방조직에서 분리한 지방전구세포를 배양하는 중에 에스트로겐, 테스토스테론 및 노르테스토스테

론을 처리해서 이들이 세포의 증식과 분화에 미치는 작용을 구명하였다.

먼저 세포의 증식에 미치는 작용이 Fig. 1에 나타나 있는데, 암퇘지의 지방조직에서 분리한 지방전구세포의 경우, 10^{-7} M의 세스테로이드 성호르몬 모두 세포의 증식에 영향을 미치지 않았으나 10^{-6} M의 경우 세 호르몬 모두 증식을 촉진시켰다. 높은 농도(10^{-6} M)에서만 호르몬의 작용을 나타낸 것과 관련해서, 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. 수퇘지의 지방조직에서 분리한 지방전구세포의 스테로이드 성호르몬의 작용이 증식에 미치는 작용은 암퇘지의 그것에 비해 그 작용이 덜 명확하다. 즉, 저농도(10^{-7} M)와 고농도(10^{-6} M) 모두에서 노르테스토스테론의 작용은 나타나지 않았고, 테스토스테론은 저농도와 고농도 모두에서 증식을 촉진 시켰다. 그리고 에스트로겐은 저농도에서만 증식을 촉진시켰다.

스테로이드 성호르몬이 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 작용이 Fig. 2에 나타나 있다. 세포분화의 측정은 GPDH 활성도에 의해 조사했는데, GPDH는 dihydroxyacetone phosphate가 glycerol-3-phosphate로 바뀌는데 관여하는 효소인데 glycerol-3-phosphate는 triglyceride 합성의 원료가 된다. triglyceride는 성숙 지방세포에서 만들어지기 때문에 GPDH는 지방전구세포의 성숙 지방세포로의 분화정도를 측정하는데 사용된다. 저농도와 고농도의 세 호르몬 모두가 성별에 상관없이 모든 지방전구세포의 분화를 크게 촉진시켰는데, 이것은 세포의 증식에 미치는 작용과는 크게 달랐다. 왜

스테로이드 성호르몬이 지방전구세포의 증식보다 분화에 더 큰 작용을 나타냈는지 그 이유는 확실하지 않다. 쥐나 세포주로 수행된 많은 연구에서 옹성호르몬은 지방세포의 증식이나 분화를 억제하고, 자성호르몬은 촉진시킨 결과를 보고했는데(Dieudonne 등, 2000; Singh 등, 2003; Singh 등, 2006), 이와 같이 상반된 연구 결과에 대한 이유는 명확하지 않다.

동물의 암컷이 수컷에 비해 지방축적이 많고, 이런 차이가 상당 부분 스테로이드 성호르몬에 기인하기 때문에, 지방세포 배양에서도 자성호르몬은 지방세포의 분화를 촉진하고 옹성호르몬은 분화를 억제할 것이 예상되었다. 그리고 지금까지 수행된 여러 연구에서 이것이 확인되었다. 그러나 유의할 것은 위의 결과를 나타낸 대부분의 연구가 주로 설치류 지방세포 또는 설치류에서 유래한 세포주에서 얻은 결과이다. 종간에 차이가 있어서 설치류 이외의 다른 포유동물의 지방세포에서는 다른 결과들이 나올 수 있다. 이와 관련해서 Anderson 등 (2001)은 사람의 피하지방에서 분리한 지방전구세포의 증식을 에스트로겐 뿐만 아니라 테스토스테론도 촉진했다고 보고했고, 김 등 (2007)도 테스토스테론이 돼지 지방전구세포의 분화를 촉진했다고 보고했다. 이와 관련해서 대가축에서 일어나는 지방세포의 생성을 알기 위해서 쥐나 세포주를 사용하는 것에 대한 의문이 제기되고 있다. 그 한 가지 예가 혈중 IGF-II의 농도인데, 사람이나 돼지에서는 생후에 이것의 농도가 태아기에 비해 높은데 반해 쥐에서는 태아기에 높으나 생후에는 측정이 불가능할 정도로 매우 낮다(이, 2000). 이 IGF-II는 돼지의 지방세포 분화에 크게 관여하는 것으로 확인되었다(Owens 등, 2008). 그래서 본 연

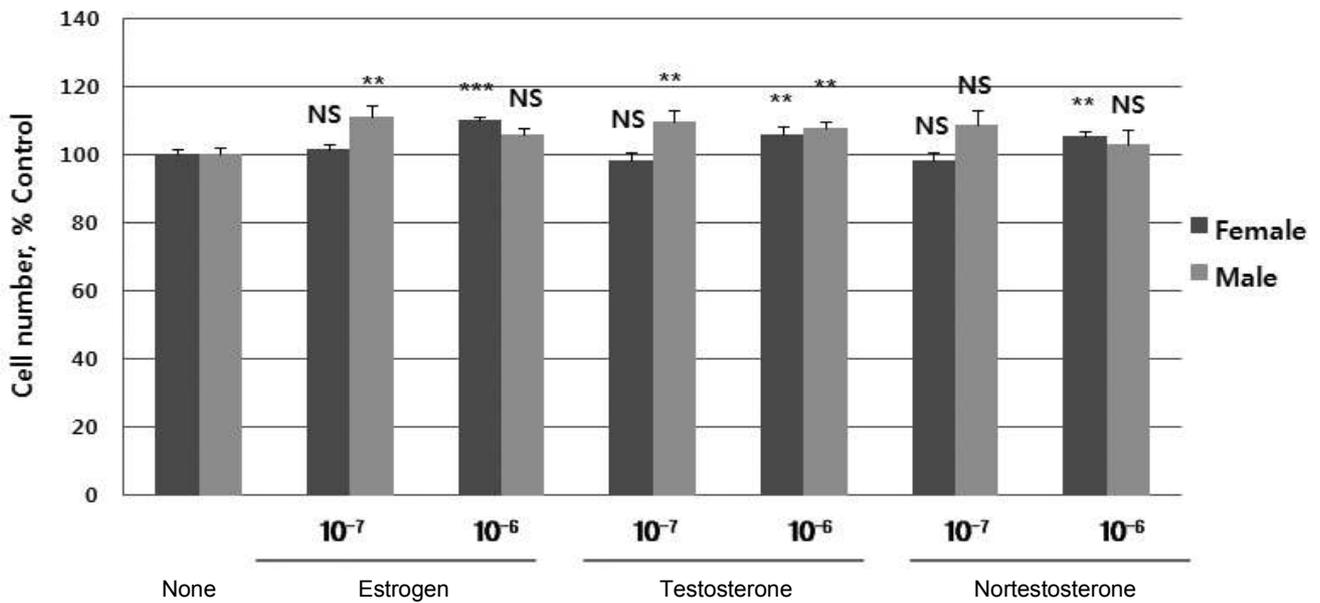


Fig. 1. The effects of sex steroid hormones on proliferation of female and male pig preadipocytes. 10^{-7} M and 10^{-6} M of estrogen, testosterone and nortestosterone were treated to pig preadipocytes for four days. Values are mean \pm SE, difference from None within each sex : NS, not significant : ** P < 0.01; *** P < 0.001.

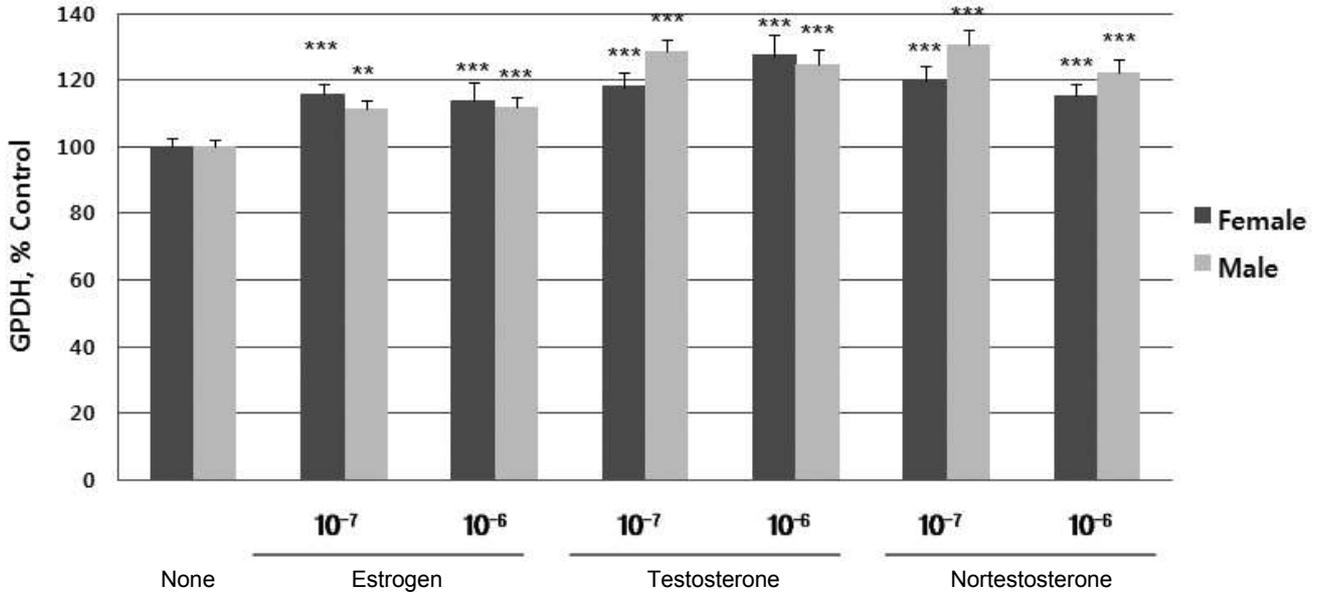


Fig. 2. The effects of sex steroid hormones on differentiation of female and male pig preadipocytes. 10⁻⁷ M and 10⁻⁶ M of estrogen, testosterone and nortestosterone were treated to pig preadipocytes for four days. Values are mean ± SE, difference from None within each sex : NS, not significant : ** P < 0.01; *** P < 0.001.

구에서 확인된 자성호르몬과 음성호르몬 모두 돼지 지방전구세포의 분화를 촉진시킨 것은 쥐나 세포주에서 나타나는 결과와는 다른 돼지 지방전구세포에서 일어나는 중요한 결과로 여겨진다.

한편 본 연구에서 암수 돼지에서 분리한 지방전구세포간에 스테로이드 성호르몬이 세포 분화에 미치는 작용에는 차이가 없었다. 이를 지지해 주는 연구로, Pederson 등 (2001)은 사람의 피하지방에서 분리한 지방전구세포에서 estrogen receptor (ER) 발현이 남녀 성별 간에 차이가 없었다고 보고했다. 이 사실은 본 연구에서 처리한 에스트로겐이 ER을 통해서 돼지 지방전구세포의 분화에 관여할 경우 암수간에 차이가 없을 것을 암시한다. 그리고 Anderson 등 (2001)은 남녀 피하지방조직에서 분리한 지방전구세포의 테스토스테론에 의한 증식 촉진작용이 동일했다고 보고했다.

노르테스토스테론은 수돼지의 혈중에 높은 농도를 나타내는 돼지 특이 스테로이드 성호르몬으로 (Schwarzenberger 등, 1993), anabolic 작용이 androgenic 작용에 비해 매우 커서 육성기 돼지의 빠른 성장에 기여하는 것으로 알려졌기에, 배양중인 지방전구세포의 분화에 특이한 작용을 나타낼 것이 기대 되었으나, 본 연구에서는 테스토스테론과 비슷한 작용을 나타내었다.

Fig. 3은 배양시기에 따른 수돼지에서 분리한 지방전구세포의 스테로이드 성호르몬에 의한 분화 차이를 보여주고 있는데 Fig. 2에 나타난 사실을 잘 반영해주고 있다. 즉, 대조구에 비해 스테로이드 성호르몬 처리구의 분화가 더 크게 일어난 것을 보여준다.

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다. 암, 수 갓 난 돼지의

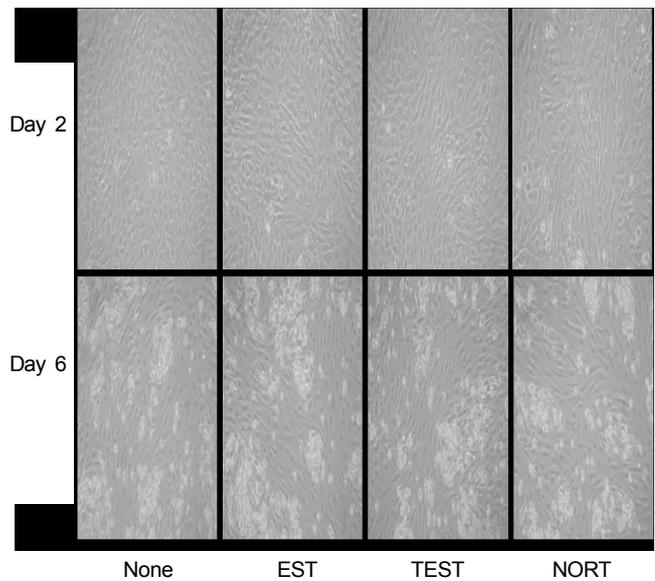


Fig. 3. Micrographs showing differentiation of male pig preadipocytes in culture treated with 10⁻⁶ M estrogen (EST), testosterone (TEST) and nortestosterone (NORT).

지방조직에서 분리한 지방세포를 배양하는 중에 10⁻⁷ M와 10⁻⁶ M 에스트로젠, 테스토스테론, 노르테스토스테론을 처리한 결과 암돼지에서 분리한 세포의 증식을 10⁻⁶ M의 세 호르몬 모두가 촉진했고, 수돼지에서 분리한 세포의 증식은 에스트로젠과 테스토스테론만이

촉진했다. 지방세포의 분화는 세 호르몬 모두, 농도에 관계없이, 성별에 관계없이 촉진시켰다. 촉진 정도는 증식보다는 분화에 더 크게 나타났다.

요 약

본 연구는 스테로이드 성호르몬인 에스트로겐(estrogen), 테스토스테론(testosterone) 및 노르테스토스테론(19-nortestosterone)이 암, 수 돼지 지방전구세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 구명하기 위해서 수행하였다. 지방전구세포는 암, 수 갓 난 돼지의 등지방 조직을 떼어 내어 collagenase를 처리한 후 분리해서 CO₂ 배양기에서 배양했다. 세포 배양 중에 10⁻⁷M와 10⁻⁶M의 스테로이드 성호르몬을 처리했다. 먼저 지방전구세포의 증식에 미치는 영향을 보면, 암돼지에서 분리한 지방전구세포의 증식을 높은 농도의 스테로이드 성호르몬 모두가 촉진했다. 수돼지에서 분리한 지방전구세포의 증식은 에스트로겐과 테스토스테론만이 촉진했다. 지방세포의 분화에 미치는 작용을 보면, 세 호르몬 모두, 농도에 관계없이 암 수 성별에 관계없이 지방전구세포의 분화를 촉진했다. 촉진 정도는 증식보다 분화에 더 크게 나타났다.

사 사

이 논문은 2008년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구 되었음.

인 용 문 헌

Anderson, L. A., McEman, P. G., Barnett, A. H. and Kumar, S. 2001. The effects of androgens estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue :influence of gender and site. *J. Clin. Endo. Metab.* 86:5045-5051.

Campbell, R. G., Steel, N. C., Caperna, T. J., Mcmurry, J. P., Solomon, M. B. and Mitchell, A. D. 1989. Interrelationships between sex and exogenous growth hormone administration on performance, body composition and protein and fat accretion of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 67:177-186.

Cooke, P. S., Heine, P. A., Taylor, J. A. and Lubahn, D. B. 2001. The role of estrogen and estrogen receptor- α in male adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.*178:147-154.

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-normandrosterone and 19-norretiocholanolone excretion in human

urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 15:1442-1447.

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 peroxisomes proliferator-activated receptor γ 2. *Endocrinology* 141:649-656.

Hong, L., Colpan, A., Peptan, I. A., Daw, J., George, A. and Evans, C. A. 2007. 17-Betaestradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 13:1197-1203.

Kubo, M., Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-inoue, K., Takeda, S. and Inoue, S. 2008. Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor γ during adipocytic differentiation. *Biochimica et Biophysica. Acta.* 1789:71-77.

Mayes, J. S. and Watson, G. H. 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Reviews* 5:197-216.

Pedersen, S. B., Bruun, J. M., Hube, F., Kristensen, K., Hauner, H. and Richelsen, B. 2001. Demonstration of estrogen receptor subtypes α and β in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. *Mol. Cell. Endocrinol.* 182:27-37.

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.

SAS. 2004. SAS/STAT 9.1 USer's Guide Volume 1. SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA.

Schwarzenberger, F., Toole, G. S., Christie, H. L. and Raeside, J. I. 1993. Plasma levels of several androgens and estrogens from bish to puberty in male domestic pigs. *Acta. Endo.* 128:173-177.

Singh, R., Artaza, J. N., Taylor, W. E., Gonzalezcadavid, 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. *Endocrinology.* 144: 5081-5088.

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 3 T3-L1 cells: Nuclear translocation of androgen receptor complex with β -catanin and T-cell factor 4 May bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology.* 147: 141-154.

Snyder, P. J., Peachey, H., Berlin, J. A.m Han-noush. 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.
- 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.
- 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.
- Owens, P., 김원영, 김혜립, 정정수. 2008. Insulin-like growth factors- I 과 II 는 서로 다른 수용체-매개 작용기전을 통해 돼지 지방전구세포의 증식과 분화를 촉진한다. *한국동물자원과학회지* 50:649-656.
- 김혜립, 이기호, 최인호, 정정수. 2007. 스테로이드 성호르몬이 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지* 49:593-598.
- 문현식, 정정수. 2004. Conjugated linoleic acid (CLA) 이성체가 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지* 46:967-974.
- 이철영. 2000. Insulin-like growth factor system과 성장, 대사 및 영양과의 관계. *한국동물자원과학회지* 42:795-816.
- (접수일자 : 2010. 1. 15 / 수정일자 : 2010. 2. 9 / 채택일자 : 2010. 2. 17)