

지방과 근육 세포주의 단독 및 공동배양을 통한 세포형태학 및 세포물질 비교 연구

최창원^{1*} · 조원모² · 연성흠² · 황보순¹ · 송만강³ · 박성권² · 백경훈⁴

¹대구대학교, ²농촌진흥청 국립축산과학원, ³충북대학교, ⁴영남대학교

Comparison between Single and Co-culture of Adipocyte and Muscle Cell Lines in Cell Morphology and Cytosolic Substances

Chang Weon Choi^{1*}, Won Mo Cho², Seong Heum Yeon², Soon Hwangbo¹, Man Kang Song³, Sung Kwon Park²
and Kyung Hoon Baek⁴

¹Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea, ²National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea,
³Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, ⁴Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

ABSTRACT

Present study was performed to investigate the effect of single and co-culture of adipocyte and muscle cell lines on cell differentiation. 3T3-L1 (adipocyte) and L6 (muscle) cell lines were single-cultured on the condition of 10% fetal bovine serum (FBS)/Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) for 48 h followed by culture within 5% FBS/DMEM as a growth media. Then, the growth media was replaced by differentiation media composed of 2% FBS/DMEM without additives in single- or co-culture of the 3T3-L1 and the L6 cells to induce differentiation of both cell types. In co-culture system, the 3T3-L1 and the L6 cells were grown in separated places by being seeded on a 0.4 μm insert membrane and on the bottom of 6 well plate, respectively. Cell differentiation was measured using morphological investigation and cytosolic analysis of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH; for 3T3-L1) and creatine kinase (CK; for L6). Based on the GPDH results, the presence of L6 cells did not stimulate 3T3-L1 differentiation showing more differentiation of 3T3-L1 cells in the single-culture compared to the co-culture condition. In contrast, 3T3-L1 cells in the co-culture promoted differentiation of L6 cells. Enzymatic analysis supported this result showing that 3T3-L1 cells showed statistically ($P < 0.05$) higher GPDH activity in the single-culture than the co-culture, whereas CK results of L6 cells were *vice versa* ($P < 0.05$). Overall, present results may indicate that co-culture system is more reliable and precise technique compared to single-culture. Further studies on several co-culture trials including different media conditions, supplementation of differentiating substances, molecular biological analysis, etc. should be required to obtain practical and fundamental mass data.

(Key words : Cell line, Co-culture, Adipocyte, Muscle cells)

서 론

한우 고급육으로 대표되는 맛 좋은 쇠고기는 근내지방, 특히 근내지방의 지방산 조성(예, 올레인산 등)과 밀접한 상관이 있으며(Choi 등, 2008), 따라서 한우를 포함한 비육우의 근육 및 지방의 합성과 분화에 대한 기전의 이해가 필요하다. 이를 위해서는 다양한 실험과 연구를 통한 많은 실험데이터 확보가 필수적인데 동물생리 및 생화학적 기초 실험의 접근이 비교적 용이한 세포배양 기법을 통한 실험데이터 확보가 가장 효과적이다. 1990년대부터 동물의 지방(preadipocyte) 및 근육(satellite cell) 전구세포의 분리 및

배양이 가능해지면서 지방 및 근육세포의 단독배양 기법이 활기를 띠게 되었으며, 현재까지 지방 및 근육세포의 분화 및 분화억제에 관련된 여러 연구들이 활발히 진행 중이다(Calvo 등, 1991; Lee 등, 1997; Dietze 등, 2002; Choi, 2011). 지방 전구세포에서 지방세포로의 분화는 insulin, 성장호르몬, triiodothyronine 및 glucocorticoid 등의 호르몬에 의해 촉진되고(Ailhaud 등, 1992; Darimont 등, 1993; Gregorie 등, 1998), 마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포에 있어서는 비타민 B₆ 및 C가 분화를 촉진하며, 비타민 A, D, E 및 K가 분화를 억제한다고 보고되어져 있다(Kawada 등, 1990; Safonova 등, 1994; Ishida 등, 1988). 또한

* Corresponding author : Prof. Chang Weon Choi, Department of Animal Resources, Daegu University, Jillyang, Gyeongsan 712-714, Gyeongbuk, Korea. Tel: +82-53-850-6721, Fax: +82-53-850-6729, E-mail: changchoi@daegu.ac.kr

동물 세포의 단독배양의 경우, 분화 및 분화억제에 관련되는 인자들 중 1-Methyl-3-isobutyl xanthine (MIX)에 대한 연구가 Brindell과 Montminy (1992)에 의해 수행되었고, Yeh 등 (1995)은 dexamethasone, Ohyama 등 (1998)은 T-174에 대한 연구들을 수행하여 최근 동물세포 배양 시에 이러한 인자들은 기본적인 분화조절 첨가물질로 자리매김하고 있다.

전술한 바와 같이, 세포배양기법의 발달은 수행하기 어려운 *in vivo* 시험들을 손쉽게 해결해 왔으며, 특히 우리나라의 경우 실제 한우를 대상으로 수행되어야 하는 여러 연구들이 세포배양기법을 통해 다양한 연구가 가능하게 되었다 (Lee 등, 1997; Chung 등, 2001). 세포배양기법을 활용하여 한우의 고급육 생산을 위한 연구들은 고급육 판단 기준의 특성상 한우 지방세포를 대상으로 많이 이루어져 왔는데, Lee 등 (1997)은 기존까지 보고된 단위동물의 세포배양기법을 토대로 거세한우의 세포배양을 시도하였으며, Chung 등 (2001)은 한우 지방세포의 배양 시 최적의 한우 지방세포 분화를 위한 배지 조성을 발표하였다.

하지만 현재까지 진행되어온 대부분의 세포배양 연구들은 하나의 모델, 즉 지방세포를 단독배양 시킨 후 특정 물질을 처리하고 그 물질의 효과를 측정하여 왔기 때문에 *in vitro* 실험의 결과와 *in vivo* 시험의 결과가 상이하거나 효과 수준이 차이가 나는 한계점을 가지고 있다 (Hausman과 Poulos, 2005; Choi 등, 2007). 이러한 현상은 가축의 근내지방의 경우 실제 생체에는 근육세포와 지방세포가 함께 있음에도 불구하고, 지방 또는 근육세포만을 단독배양하여 연구를 수행함으로써 근육-지방간 교호작용 (특히 hormone 등)들이 무시되어 발생하는 것으로 추측된다 (Hausman과 Poulos, 2005). 이러한 단점을 보완하기 위해, 해외에서는 인간 골격근육세포와 지방세포를 한 배지에서 공동배양하는 기법이 발표된 바 있고 (Dietze 등, 2002), 축산분야에서는 Hausman과 Poulos (2005)가 돼지 지방과 근육세포의 공동배양 기법을 발표하는 등 활발히 연구되고 있다. 국내에서는 본 연구팀이 지방 및 근육세포주의 공동배양 조건을 발표한 바 있으나 (Choi 등, 2007), 이 기법의 실용적 이용을 위한 공동배양과 단독배양 세포와의 세포물질 비교 연구 등은 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 지방과 근육세포주의 단독 및 공동배양에서 배양기법에 따른 지방 및 근육세포의 분화에 미치는 영향을 조사함으로써 전술한 단독배양 위주의 세포배양 연구의 한계의 극복과 대안을 제시함은 물론 향후 한우 등의 지방 및 근육세포 primary 공동배양기법의 기초자료를 확보하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

1. 지방 및 근육세포주의 단독 및 공동배양

(1) 지방 및 근육세포주의 단독배양

지방유래 세포주 (cell line) 및 근육 세포주는 일반적으로 세포관련 실험에 많이 사용되어온 마우스 embryo 유래 세포주인

3T3-L1과 rat 골격근 유래 세포주인 L6를 선택하였으며, 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

Choi (2011)에서 설명한 바와 같이, 분양받은 3T3-L1 ampule을 알콜로 잘 닦아낸 뒤 무균상태의 클린 벤치에서 개봉하였으며, 3T3-L1 및 L6 세포에 5 ml Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; SH302043.01, Hyclone, USA)을 첨가하여 원심분리 (1,000 rpm, 10 min) 후 3T3-L1 및 L6 세포들을 pellet화시키는 washing 과정을 3회 반복하고, 최종 pellet량에 따라 5% fetal bovine serum (FBS, SH30396.03, Hyclone, USA)/DMEM를 적당량 (2~5 ml) 주입하였다. 혈구계산기와 trypan-blue를 이용하여 세포수를 측정하여 2×10^4 /ml 정도의 세포를 분주하였다.

각 세포주의 성장을 위하여 Choi 등 (2007)에서 제시한 적정 성장배지인 10% FBS/DMEM로 48시간 동안 성장시킨 후 5% FBS/DMEM으로 성장시켰다. 성장배지 속에는 antibiotics로 1% Pen-Strep solution (SV30010, Hyclone, USA)과 0.1% Fungizone (Amphotericin B, GIBCO 04195780D, USA)을 첨가해 주었다. 성장배지는 48 시간을 기준으로 교체해 주었으며, 성장에 따른 세포 변화를 관찰했으며, 약 70% confluence 되었을 때까지 꾸준히 성장시켰다. 이후 분화배지 처리를 해 주었는데, 일반적으로 지방전구 세포주들의 분화를 위해서는 Choi (2011)에서와 같이 FBS에 insulin, dexamethasone, MIX 등을 첨가시켜 배지로 사용하고 근육세포주는 낮은 수준의 FBS 또는 horse serum 등을 사용하였다. 하지만, 본 연구에서는 실험특성상 지방 및 근육세포주의 공동배양과의 조건을 일치시키기 위해 Choi 등 (2007)이 언급한 바와 같이 2% FBS/DMEM 만을 분화배지로 사용하였다.

(2) 지방 및 근육세포주의 공동배양

지방 및 근육 세포주의 공동배양은 Choi 등 (2007)에서 제시한 방법으로 진행되었다. 단독배양에서 증식시킨 지방 및 근육 세포는 공동배양을 위해 6 well plate에 0.4 μ m insert membrane을 사용하였고, insert membrane을 기준으로 하단 (6 well plate)에 L6를 분주하고 상단 (insert membrane)에 3T3-L1을 공생시켰다 (Choi 등, 2007). 이중세포주 공동배양을 위한 분화배지는 단독배양과 마찬가지로 Choi 등 (2007)의 연구 결과에 따라 2% FBS/DMEM을 사용하였고, 공동배양 조건은 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하되 배지는 48 시간 간격으로 교환하였다. 3T3-L1 및 L6 cell의 공동배양에 대한 모식도는 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

2. 배양 후 세포물질 비교분석

세포물질 비교분석은 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity를 측정함으로써 지방세포의 분화정도를 확인하였으며, 근육세포의 분화정도는 creatine kinase (CK) assay를 통해 확인하였다. GPDH 및 CK assay를 위한 세포의 전처리 Oh 등 (2005)의 방법에 따라 실시하였다.

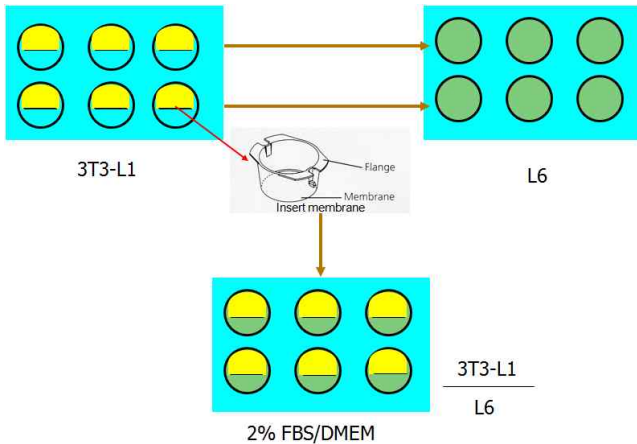


Fig. 1. Experimental scheme for co-culture of 3T3-L1 and L6 cell lines.

분화배지 처리일(0 day) 및 분화 후 8일에 배양 중이던 6 well plate의 배지를 모두 제거한 뒤, 2 ml의 DMEM으로 2회 washing을 실시하였다. 이후 6 well plate를 얼음 위에 올린 뒤, homogenizing buffer (4.28 g sucrose, 186 mg Na₂EDTA · 2H₂O (Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) Disodium salt; Dihydrate), 30.3 mg Tris-base, 50 ml ddH₂O)를 각 well에 1 ml 씩 주입한 뒤 약 5 분간 정치하였다. 타이머를 이용하여 동일한 시간 일정한 방향 및 힘으로 각 well을 rubber policeman을 이용해 긁어준 뒤 e-tube에 옮겨 넣었으며, 40 w에서 약 10초간 sonication 하였다(4°C). 용해성 단백질을 추출을 위해 10분간 원심 분리 (12,500 × g, 4°C)를 실시하였으며, pellet을 제외한 나머지 상등액을 새로운 e-tube에 옮겨 넣은 뒤, 액체질소에서 급속냉동 시킨 후 GPDH 및 CK assay 등에서 사용 전까지 냉동고(-70°C)에서 보관하였다.

GPDH assay는 Oh 등(2005)과 Bernt와 Bergmeyer(1974)의 방법에 따라 실시하였다. 전처리 해둔 단독 및 공동배양세포주의 샘플들을 녹인 뒤, 100 μl를 취하여 새로운 e-tube에 옮겨 넣었다. 사용 전 25°C로 데워둔 assay buffer (8 ml triethanolamine-EDTA premix, 4.8 ml ddH₂O, 9 μl β-mercaptoethanol, 2 mg NADH) 0.8 ml를 샘플이 들어있는 e-tube에 주입한 뒤 substrate buffer(141.6 μg dihydroxyacetone phosphate lithium, 1 ml ddH₂O) 100 μl를 추가로 주입하였다. 상온에서 약 5분간 반응시킨 후 cuvette에 옮겨 넣고 UV/VIS spectrophotometer (V-550, TS science, Korea)에서 340 nm의 흡광도를 0분과 3분의 간격으로 측정하여, Δ enzyme activity를 측정하였다. 1 unit의 효소 활성도는 분당 NADH 1.0 nmol의 산화에 해당 된다(Kozak 등, 1974). GPDH activity를 측정하기 위해 총 단백질의 함량 또한 조사하였는데, IgG를 표준으로 활용하여 DC protein assay kit (Bio-Rad 500-0016, USA)에서 제공하는 시약 및 프로토콜에 따라 단백질 정량을 실시하였으며(Lowry 등, 1951), 최종 단백질 함량은 microplate reader (Benchmark plus model 680, Bio-rad, USA)

에서 750 nm의 흡광도로 측정하였다.

CK activity의 측정은 QuntiChrom™ creatine kinase assay kit (ECPK-100, BioAssay Systems, USA)를 사용하여 실시하였다. Kit 내에 동봉되어 있는 substrate solution과 assay buffer 및 enzyme mix를 10 : 100 : 1의 비율로 혼합하여 분석 샘플 수에 맞게 reconstituted reagent를 제조한 뒤 GPDH assay와 동일한 방법으로 전처리한 샘플들과 잘 섞은 뒤 (Reconstituted reagent : 분석 sample = 10 : 1) 96 well plate (Costar 3590, USA)에 well 당 110 μl씩 주입하였다. 상온에서 10 분간 정치시킨 뒤 microplate reader를 이용해 340 nm의 흡광도로 30분 간격으로 O.D.를 측정하여 Δ creatine kinase를 측정하였으며, 계산식은 다음과 같다.

$$CK(U/L) = \frac{O.D_{.40min} - O.D_{.10min}}{O.D_{.cal} - O.D_{.H_2O}} \times 100$$

여기서 cal과 H₂O는 kit 내에 동봉된 calibrator 시약과 증류수를 동일한 방법으로 흡광도를 측정한 O.D. 값을 나타내며, 40 min과 10 min은 샘플의 10분 및 40분의 흡광도를 측정한 O.D. 값을 나타낸다. 흡광도 측정 후 샘플과 calibrator와의 백분율로 CK를 계산하였다. 1 U(unit)는 pH 6.0의 조건에서 phosphocreatine으로부터 1 μmole의 phosphate가 ADP로 들어가 ATP로 전환되는데 필요한 CK의 분당 활성도를 나타낸다.

3. 통계

지방 및 근육 세포주의 단독 및 공동배양 후 세포물질 변화는 SAS (2002) 통계 프로그램의 일반선형모델 (GLM)을 이용하여 분석하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan (1955)의 다중 검정법으로 95% 신뢰수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 지방-근육 세포주의 단독배양

Fig. 2는 3T3-L1 및 L6 세포를 공동배양하기 전 세포수를 증식시키기 위해 10% FBS/DMEM으로 2일간 배양시키고, 5% FBS/DMEM으로 5일간 배양시킨 것이다. Choi 등(2007)은 3T3-L1 및 L6 세포 모두가 배양액에 첨가한 FBS의 비율(2, 5 및 10%)이 높아짐에 따라 세포의 성장이 상대적으로 증가함을 확인하였다. 그런데, Choi 등(2007)은 전술한 3가지 FBS 첨가 비율 중에서 10% 첨가구가 가장 우수하였으나, 추가실험을 통해 10% FBS/DMEM으로 48시간동안 성장시킨 후 5% FBS/DMEM으로 FBS 함량을 낮추어 주는 것이 세포의 형태학적 안정성과 높은 세포분화를 유도한다고 보고하였다(Choi 등, 2007; RDA, 2008). 본 연구에서 사용된 FBS는 동물의 세포배양을 위해 흔히 사용되

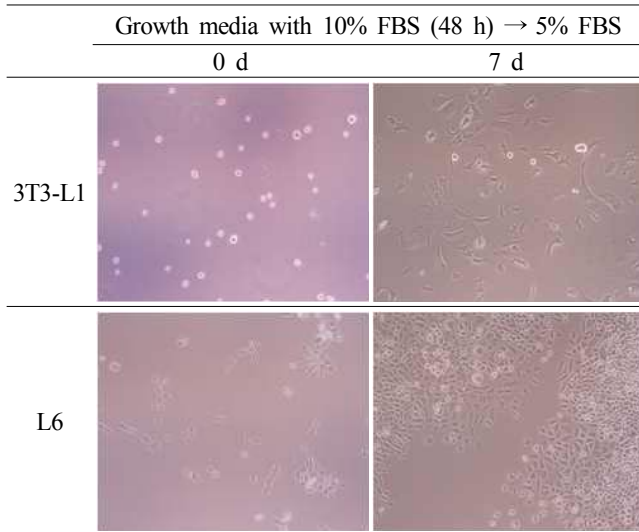


Fig. 2. Morphological changes of 3T3-L1 and L6 cells in growth media (DMEM) with 10% FBS for 48 h and with 5% FBS till confluence. Magnification = 100 x.

는 동물혈청인데, 이것은 임신중에 송아지의 태줄혈액으로부터 분리한 혈청으로, 세포증식을 촉진하는 필수영양소, 면역글로불린 항체, 전사인자, 지방산, 호르몬, 비타민, 성장인자 및 무기물 등을 포함하기 때문에 세포배양에 매우 우수하다고 알려져 있다(Skottman과 Hovatta, 2006; Cao 등 2009). 본 연구에서는 세포배양을 위해 10% 또는 5%의 혈청을 첨가하였는데, Diao 등 (2010)는 5~20%의 동물혈청 첨가는 세포의 성장 및 증식에 긍정적 효과를 준다고 보고하였다.

2. 지방-근육 세포주의 공동배양 및 세포물질 변화

Fig. 3은 3T3-L1 및 L6 세포의 단독 및 공동배양에 따른 세포의 형태학적 변화를 나타내고 있다. 3T3-L1 세포주는 현미경 상으로 세포 내에 지방적이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 공동배양보다 단독배양 시 분화가 더욱 잘 일어나는 것으로 확인되었다. 하지만 이와는 반대로 L6 세포주의 경우, 단독배양 시 보다 공동배양에서 세포의 분화가 더 잘 일어남을 형태학적 조사결과 확인할 수 있었다. 그러나, 세포배양의 경우 형태학적인 조사만으로는 실제 분화도를 객관적으로 평가할 수 없기 때문에 3T3-L1의 경우 지방세포 분화의 척도로 판단되는 cytosolic GPDH의 활성도를 측정하였다. 지방세포에 triglyceride가 축적되어지는, 즉 성숙 지방세포로의 분화시기에는 acetyl-Co A carboxylase, fatty acid synthetase, GPDH 등의 지방대사 관련효소 및 여러 종류의 protein 합성이 증가된다. 이 중 GPDH는 분화의 정도를 측정하는 대표적 지표효소로 이용되고 있으며(Wise 등, 1978; Sottile과 Seuwen, 2001), 지방세포내에 지방이 축적되기 위해서는 glycerol-3-phosphate가 fatty acyl-CoA와 결합하여 triglyceride를

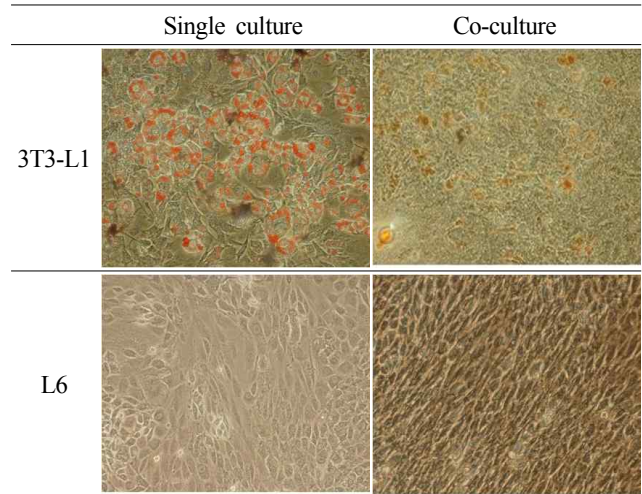


Fig. 3. Effect of different culture techniques on morphological changes of 3T3-L1 and L6 cells. Magnification = 100 x.

생성하여야 하는데, 이 glycerol-3-phosphate는 dihydroxyacetone phosphate로부터 합성되며 이 반응에 GPDH가 관여하게 된다(Baek, 2003; Choi, 2011). 본 연구에서는 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 분화배지 처리일(day 0)과 비교해 단독 및 공동배양 모두 GPDH의 활성도가 유의적으로(P<0.05) 증가했음을 확인할 수 있어 단독 및 공동배양 모두 3T3-L1 세포의 분화가 잘 이루어졌다고 판단할 수 있다. 특히 단독배양의 경우, 형태학적 변화의 결과(Fig. 3)와 유사하게 나타났고, 공동배양 시 측정된 GPDH의 활성도와도 유의적인(P<0.05) 차이를 나타낼 정도로 높은 수준을 나타내었는데, 이는 지방세포의 발현에 있어서는 공동배양보다 단독배양이 유리하다는 매우 중요한 의미를 가진다. 왜냐하면 본 연구팀에서 공동배양의 장점 중 하나로 추론되는 것은 생체조건(지방과 근육이 공존)과 보다 근접한 조건을 만들어 실험하는 것인데, 현재의 연구 결과를 역으로 설명하면 지금까지 많은 세포배양 연구에서 지방세포 단독 배양 시 측정된 높은 지방세포 분화나 분화유도 후보물질 즉 insulin (Brindle과 Montiminy, 1992), estrogen (Dieudonne 등 2000), glucocorticoids, triiodothyronine (Sztalryd 등, 1989; Gaben-Cogneville 등, 1984) 등은 실제 생체 내에서는 지방세포 분화가 일어나지 않거나, 일어나더라도 그 수준이 미미했을 가능성이 있기 때문이다. 하지만, 이러한 지방-근육세포 공동배양 시 지방세포 분화에 부정적 현상이 나타나는 과학적 기전은 현재단계에서는 정확하게 설명하기 어렵고 향후 추가연구가 필요한 부분이라고 생각된다. 다만 공동배양 시 지방 및 근육세포로부터 분비 또는 상호영향을 받을 것으로 여겨지는 물질들의 작용에 의해 지방세포의 분화가 다소 억제되는 것이 아닌가 추측되어진다(Hausman과 Poulos, 2005). 따라서, 본 연구결과로 유추해보면 실제 생체에는 근육세포와 지방세포가 함께 있으므로 기존의 지방세포 단독배양 실험결과는 근육-지방간 교호작용 등이 전혀 고려되지 않았음을 가정할 때 지방세포 발현에 있어서 과대평가되었을

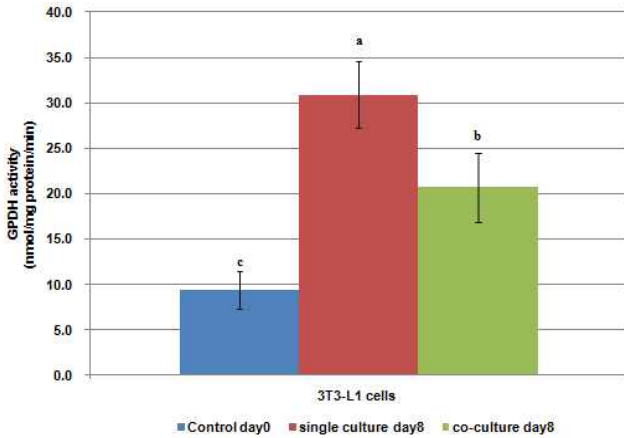


Fig. 4. Effect of different culture techniques on glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activities in 3T3-L1 cells at 0 and 8 days after differentiation media treatment. Mean \pm SE (n=4). Values with different superscripts are different (P<0.05).

것으로 사료된다. 이와는 반대로, 근육에서 분비된다고 알려진 insulin growth factor-1 (IGF1; Isgaard 등, 1989)는 preadipocytes의 성장과 adipocytes로의 분화를 촉진한다고 보고된 바 있다(Ramsay 등, 1989). 또한, 근육에서 분비된 paracrine mediator들이 adipocytes 내의 pyruvate dehydrogenase와 glycogen synthase의 활성을 증가시킨다는 보고도 있다(Jarett 등, 1985). 이는 근육과 지방세포가 서로 상호작용을 하며 이들 세포들에서 분비된 물질들이 서로간의 성장과 분화에 직·간접적인 영향을 주는 것을 증명해 주는 결과들이다.

근육유래 세포주인 L6의 경우, mesenchymal precursor에서 myoblast로 determination되어 분화과정과 핵의 융합으로 myotubes로 성장하는데, 본 연구에서는 현미경 상에서 myotubes로 발전하는 단계의 모습을 관찰할 수 있었다(see Fig. 3). 지방세포와 마찬가지로 객관적 수치를 제시하기 위해 측정된 CK는 근수축기작에서 ADP를 ATP로 전환시키기 위해 phosphocreatine을 creatine으로 분해시켜 유리되는 인산기를 이용해 ATP를 합성시키는 효소로 근육분화의 표지인자로 사용되는 효소이다(Hemmer와 Wallimann, 1994). Fig. 5는 단독 및 공동배양에 따른 L6의 CK의 활성도를 비교한 결과인데, 분화배지 처리일(0 day)에 비하여 단독 및 공동배양 공히 CK 활성도가 유의적으로(P<0.05) 차이가 있음을 확인할 수 있으며, 이는 L6 세포의 분화가 제대로 이루어졌음을 나타내는 결과라 할 수 있다. 또한 단독배양과 공동배양을 비교할 때, CK 활성도가 공동배양에서 유의적으로(P<0.05) 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 앞서 3T3-L1의 분화결과에서 언급한 바와 같이 지방세포와 근육세포의 공동배양 시 지방 및 근육세포로부터 분비되는 호르몬 등의 물질들 또는 그러한 물질들로 인한 상호영향을 통해 근육세포의 분화가 영향을 받는 것이 아닌가 추측된다(Hausman과 Poulos, 2005). 특히 지방세포는 기존 우리가 알고 있는 지방저장 등 지질대사와 당대사 조절 외에 지

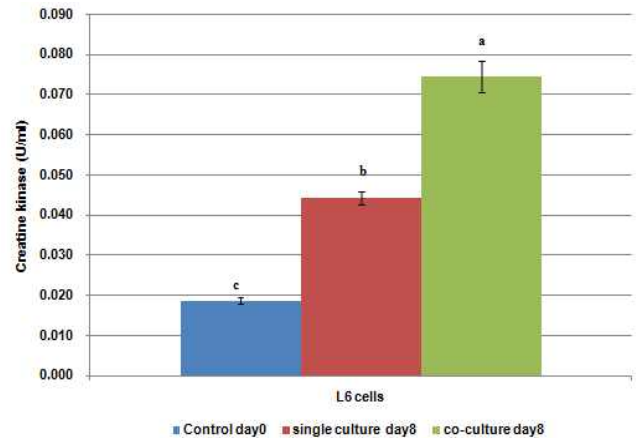


Fig. 5. Effect of different culture techniques on creatine kinase activities in L6 cells at 0 and 8 days after differentiation media treatment. Mean \pm SE (n=4). Values with different superscripts are different (P<0.05).

방세포에서 분비되는 여러 신호전달물질과 호르몬(adipokines)을 통하여 세포분화 발현량 등에 영향을 미칠 수 있는 기능을 가지고 있어(Gregoire 등, 1998), 본 연구에서와 같이 지방세포와의 공동배양 시 지방세포에서 분비되는 물질들이 근육세포의 분화에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 특히, 지방세포에서 분비되는 leptin, adiponectin, interleukin, tumor necrosis factor 등은 인슐린의 역할과 면역체계에 영향을 줄 뿐만 아니라, 당의 흡수와 이용 및 다양한 growth hormone들의 분비와 작용에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Diez와 Iglesias, 2003). 특히, 근육 전구 세포는 fibroblast growth factor, transforming growth factor, 또는 IGF 등의 growth factor에 의해 증식과 분화가 영향을 받는다(Greene과 Allen, 1991). 따라서, 이러한 지방세포의 근육세포성장과 분화에 미치는 직·간접적인 역할들은 기존의 단독 배양을 통한 근육세포분화 연구가 과소평가 되었을 가능성을 시사하며, 앞으로는 근육과 지방세포의 공동배양 시스템이 이러한 한계점을 보완하고, 육질, 특히 마블링에 관한 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 결과를 종합적으로 볼 때, 3T3-L1 세포주의 분화는 공동배양 시보다 단독배양 시 더 높게 나타났으며, L6 세포주의 분화는 반대로 단독배양 시보다 공동배양 시 더 높은 것으로 확인되었다. 본 연구 결과에서처럼 동일한 세포를 배양했다하더라도 배양 후 나타나는 cellular substance들의 수준이 다르다는 사실은 결국 단독배양이 가지고 있는 한계점을 나타내어주는 결과라 할 수 있다. 따라서, *in vitro* 세포배양연구에 있어 공동배양의 필요성을 입증시키는 결과로 생각되며, 향후 *in vivo* 상태에 가장 근접한 *in vitro* 세포배양 연구를 수행하기 위해서는 공동배양이 우선적으로 고려해야 된다는 것을 나타내는 매우 의미 있는 결과라 생각된다. 본 연구에서는 단순히 단독배양과 공동배양을 통한 분화에 대한 비교결과를 도출하였지만, 향후 다양한 조건과 분화조절 물질들의 첨가를 통한

추가적인 공동배양실험 수행 시 보다 현실적이고 대량의 기초자료 확보가 가능하리라 판단된다.

요 약

본 연구는 기존 단독배양 위주로 이루어져온 세포배양 연구의 방법학적 한계의 극복과 대안을 제시하고자 지방과 근육세포주의 단독 및 공동배양에서 배양기법에 따른 지방 및 근육세포의 분화에 미치는 영향을 비교 조사하고자 실시하였다. 3T3-L1 (지방세포) 및 L6 (근육세포) 세포주는 성장배지인 10% FBS/DMEM (1% Pen-Strep solution 및 0.1% Fungizone 첨가) 하에서 48h 동안 단독 배양 후 5% FBS/DMEM에서 배양하였다. 분화를 위한 단독 및 공동배양에서는 지방 및 근육세포 모두 분화유도물질 없이 2% FBS/DMEM으로 배양하였고, 공동배양에서는 0.4 μ m insert membrane을 사용하여 6 well plate 하단에 L6 cell을, 상단에는 3T3-L1 cell을 공생시켰다. 지방 및 근육세포 분화정도 측정은 세포별 형태학적 측정과 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 및 creatine kinase (CK) 분석을 통해 조사되었다. 형태학적으로 볼때 3T3-L1 세포주는 공동배양보다 단독배양 시 분화가 더욱 잘 일어났고 L6 세포주의 경우 역으로 같았다. 세포물질 분석에서는 분화배지 처리일 (day 0)과 비교해 단독 및 공동배양 모두 지방세포 내 GPDH의 활성도가 유의적으로 ($P<0.05$) 증가했음을 확인할 수 있었고 단독배양이 공동배양보다 유의적으로 ($P<0.05$) 높은 수준의 GPDH 활성도를 보였다. L6 역시 마찬가지로 분화배지 처리일에 비하여 단독 및 공동배양 모두 CK 활성도가 유의적으로 ($P<0.05$) 높았고, CK 활성도가 공동배양에서 유의적으로 ($P<0.05$) 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 기존 연구에서 이용된 단독 배양을 통한 세포 분화 결과 등은 생체와 비교 시 방법학적 한계로 인해 실제 생체 내에서는 그 분화정도가 매우 다를 것으로 생각되며, 이것은 앞으로 정확한 세포배양 결과 확보를 위해서는 단독배양보다는 공동배양기법을 사용해야 함을 의미한다. 향후 다양한 조건과 분화조절 물질들의 첨가를 통한 추가적인 공동배양실험이나 지방분화관련 분자생물학적 물질분석 등 다양한 실험 수행 시 보다 현실적이고 대량의 기초자료 확보가 가능할 것으로 판단된다.

(주제어 : 세포주, 공동배양, 지방세포, 근육세포)

사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호 : PJ907108042012) 수행결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

Ailhaud, G., Grimaldi, P. and Negrel, R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Ann. Rev. Nutr.*

- 12:207-233.
- Baek, K. H. 2003. Studies on the production of lean meats and the identification of Hanwoo (Korean Cattle) brand beef using immunological techniques. Ph.D. thesis. Yeungnam Univ., Gyeongsan, Korea.
- Bernt, E. and Bergmeyer, H. U. 1974. Hexokinase. In : H. U. Bergmeyer and K. Gawehn (Ed.). *Methods of enzyme analysis.* Academic Press, New York. 473-474.
- Brindle, P. K. and Montminy, M. R. 1992. The CREB family of transcription activators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:199-204.
- Calvo, J. C., Rodbard, D., Katki, A., Chernick, S. and Yanagishita, M. 1991. Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes with 3-isobutyl-1-methyl-xanthine and dexamethasone stimulates cell-associated and soluble chondroitin 4-sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 266:11237-11244.
- Cao, Z., West, C., Norton-Wenzel, C. S., Rej, R., Davis, F. B., Davis, P. J. and Rej, R. 2009. Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endo. Res.* 34:101-108.
- Choi, C. W. 2011. Sera taken from aged Korean native steers increase adipocyte differentiation. *J. Agr. Life Sci.* 45(2):85-92.
- Choi, C. B., Shin, H. W., Lee, S. W., Kim, S. I., Jung, K. K., Choi, C. W., Baek, K. H., Lunt, D. K. and Smith, S. B. 2008. Comparison of cholesterol contents and fatty acid composition in M. longissimus of Hanwoo, Angus and Wagyu crossbred steers. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* 50:519-526.
- Choi, C. W., Baek, K. H., Smith, S. B., Kim, Y. H., Ford, L. A., Kim, S. J., Oh, Y. K., Kim, K. H., Kang, S. W., Nam, I. S. and Lee, B. S. 2007. Screening of media conditions to establish optimum conditions for 3T3-L1 cells co-cultured with L6 cells. *Proceedings of Animal Science & Technology.* 2007. 6. 28. Chungang University, Anseong, Gyeonggi.
- Chung, K. Y., Park, S. K., Chung, H. J. and Choi, C. B. 2001. Screening of media components to establish optimum conditions for the differentiation of Hanwoo adipocytes. *Korean J. Anim. Sci. & Technol.* 43(1):65-74.
- Darimont, C., Gaillard, D., Ailhaud, G. and Negrel, R. 1993. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cell : adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Mol. cell. Endocrinol.* 98:67-73.
- Dietze, D., Koenen, M., Röhrig, K., Horikoshi, H., Hauner, H. and Eckel, J. 2002. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes.* 51: 2369-2376.
- 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 γ . *Endo.* 141:649-656.
- Diez, J. and Iglesias, P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European J. Endo.* 148:293-300.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* 11:1-42.
- Gaben-Cogneville, A., Quignard-Boulange, A., Aron, Y., Brignant, L., Jahchan, T., Pello, J. and Swierczewski, E. 1984. Development under the control of insulin of lipogenic enzymes, lipoprotein lipase, isoproterenol and glucagon sensitivity in differentiating rat preadipocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Acta.* Nov. 13:252-260.
- Greene, E. A. and Allen, R. E. 1991. Growth factor regulation of bovine satellite cell growth *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 69:146-152.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78:783-809.
- Hausman, G. J. and Poulos, S. P. 2005. A method to establish co-cultures of myotubes and preadipocytes from collagenase digested neonatal pig semitendinosus muscles. *J. Anim. Sci.* 83: 1010-1016.
- Hemmer, W. and Wallimann, T. 1994. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem.* 133:193-220.
- Isgaard, J., Nilsson, A., Vikman, K. and Isaksson, O. G. P. 1989. Growth hormone regulates the level of insulin-like growth factor-I mRNA in rat skeletal muscle. *J. Endo.* 120:107-112.
- Ishida, Y., Taniguchi, H. and Baba, S. 1988. Possible involvement of 1α , 25-dihydroxyvitamin D_3 in proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 151:1122-1127.
- Jarett, L., Wong, E., Macaulay, S. and Smith, J. 1985. Insulin mediators from rat skeletal muscle have differential effects on insulin-sensitive pathways of intact adipocytes. *Science.* 227: 533-535.
- Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Maeshige, K., Nishiu, S. and Sugimoto, E. 1990. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation from preadipocyte to adipocyte, of 3T3-L1 cell. *Comp. Biochem. Physiol.* 96A: 323-326.
- Kozak, L. P. and Jensen, J. T. 1974. Genetic and Developmental Control of Multiple Forms of L-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase. *J. Bio. Chem.* 249(24):7775-7781.
- Lee, S. C., Kim, D. W., Lee, H. J., Kim, J. W., Hong, S. G. and Chung, Y. H. 1997. Differentiation of adipose stromal-vascular cells from Korean native steers in culture. *Korean J. Anim. Sci. & Technol.* 39(4):415-422.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Oh, Y. S., Cho, S. B., Baek, K. H. and Choi, C. B. 2005. Effects of testosterone, 17β -estradiol, and progesterone on the differentiation of bovine intramuscular adipocytes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18(11):1589-1593.
- Oyama, K., 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.
- Ramsay, T. G., White, M. E. and Wolverton, C. K. 1989. Insulin-like growth factor 1 induction of differentiation of porcine preadipocytes. *J. Anim. Sci.* 67:2452-2459.
- RDA. 2008. Livestock Research Report. National Institute of Animal Science, Rural Development Administration. Reg. No. 11-1390271-000032-10.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E. Z., Grimaud, P., Ailhaud, G., Reichert, U. and Shroot, B. 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. cell. Endocrinol.* 104: 201-211.
- Skottman, H. and Hovatta, O. 2006. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction.* 132:691-698.
- Sottile, V. and Seuwen, K. 2001. A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Anal. Biochem.* 293:124-128.
- Sztalryd, C., Levacher, C. and Picon, L. 1989. Acceleration by triiodothyronine of adipose conversion of rat preadipocytes from two adipose localizations. *Cell. Mol. Biol.* 35:81-88.
- Wise, L. S. and Green, H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *The J. Biol. Chem.* 254:273-275.
- Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M. and Mcknight, S. 1995. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Gene & Dev.* 9:168-181.

(Received Feb. 27, 2012; Revised Apr. 20, 2012; Accepted Apr. 24, 2012)