

지방조직대사에 대한 testosterone의 영향

정선효*

Effects of Testosterone on Adipose Tissue Metabolism

Sunhyo Jeong*

Department of Science Management, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea

요약

본 연구는 고지방식이를 섭취한 정소절제수술을 한 수컷 마우스에서 백색지방증가의 개선에 대한 testosterone의 영향과 그것에 대한 분자생물학적 조절기전을 규명하였다. Testosterone이 처리된 정소절제수술 마우스(CAST+T)는 정소절제수술 마우스(CAST)에 비해 지방조직무게, 지방세포크기 및 C/EBP α 와 지방세포 표지유전자(mRNA) 발현이 감소되었다. 본 연구결과는 testosterone이 C/EBP α 와 C/EBP α 에 의해 조절되는 지방세포 표지유전자들의 발현을 억제시킴으로써 지방세포 조절기전이 억제되고 지방조직의 무게가 감소된다는 것을 시사하고 있다. 따라서 본 연구는 성선기능저하증 남성의 비만조절에 대한 testosterone therapy의 유익한 분자생물학적 정보를 제공할 것이다.

ABSTRACT

We investigated the effects of testosterone on the improvement of white adipose tissue explant and its molecular mechanism in adipose tissue of high fat diet-fed male castrated (CAST) mice. The CAST mice treated with testosterone had lower adipose tissue weights, the average size of adipocytes and mRNA levels of C/EBP α as well as adipocyte marker genes than the vehicle-treated CAST mice. These results suggest that testosterone prevent the expression of C/EBP α and C/EBP α -mediated adipocyte marker genes, resulting in decreased adipose tissue mass and adipocyte metabolism in male CAST mice. Moreover, this study give a valuable molecular and biological knowledge on testosterone therapy in obese hypogonadal men.

키워드 : 테스토스테론, C/EBP α , 정소절제수술 수컷 마우스, 지방조직무게

Key word : testosterone, C/EBP α , male CAST mice, adipose tissue mass

접수일자 : 2013. 07. 30 심사완료일자 : 2013. 08. 12 게재확정일자 : 2013. 08. 28

* Corresponding Author Sunhyo Jeong(E-mail:jsh0227@mokwon.ac.kr, Tel:+82-42-829-7595)

Department of Science Management, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea

Open Access <http://dx.doi.org/10.6109/jkiice.2013.17.12.2995>

print ISSN: 2234-4772 online ISSN: 2288-4165

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright ©The Korea Institute of Information and Communication Engineering.

I. 서 론

복강 내의 지방조직축적은 비만과 관련된 대사성 질환(인슐린 저항성, 심혈관계 질환 등)을 일으킬 위험이 높다[1]. 특히 남성들은 나이, 성선기능 저하증 등에 의해 생식선 성 스테로이드 호르몬이 감소되면 복부지방의 무게가 증가되고 심장혈관계질환이 나타나는 경향이 있다[2]. 반면 이러한 남성들이 testosterone를 처방 받으면 제지방무게(fat-free mass)는 증가되고 지방무게는 감소한다[3-4].

지방조직은 지방세포 크기가 커지는 hypertrophy 과정과 전구지방세포(preadipocyte)가 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정을 통해 증가된다.

Adipogenesis는 지방세포의 형태적 변화와 지방대사 조절과 관련된 유전자 발현의 변화와 관련이 있다. CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBPα)는 지방세포분화를 조절하는 주요한 전사조절인자이다[5]. C/EBPα가 과발현된 mouse fibroblast cell lines는 지방세포로의 분화를 촉진하였다[6]. 또한 adipogenesis 동안 C/EBPα 발현이 유도되었으며 그것은 분화된 지방세포에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 활성화시켰다[7].

Testosterone[♂] 지방조직대사를 조절한다는 연구결과들은 발표되었지만[8-9], testosterone[♂] C/EBPα-의존적인 조절기전을 통해 영향을 미치는지에 대해서는 명확히 밝혀진바 없다. 따라서 본 연구는 testosterone[♂] 비만조절에 영향을 미친다는 유전적인 근거를 마련하기 위해, 정소절제수술한 수컷 마우스에서 정소절제에 의해 증가된 지방조직이 testosterone처리에 의해 억제되는지를 조사하였으며 이러한 대사적 영향이 C/EBPα에 의해 조절되는 유전자의 발현에 대한 testosterone의 억제작용에 의한 것인지를 연구하였다.

II. 실험방법

2.1. 실험동물

모든 실험에서 8주령의 wild-type 수컷 마우스(C57BL/6J)를 대한 바이오링크로부터 구입하여 사용하였으며, 항균 상태에서 12h light/darkness cycle 조건 하에서 먹이와 물을 충분히 주면서 사육하였다.

수컷마우스는 무작위로 3그룹 즉, 모조수술 마우스 그룹(Sham), 정소절제수술 마우스 그룹(CAST), 그리고 정소절제수술 후 실험기간 마지막 2주 동안 testosterone(5mg/pellet, 60-day release)[♂]이 피하주입식으로 처리된 마우스 그룹(CAST+T)으로 분류하였다.

모든 마우스는 실험기간 7주 동안 고지방식이 사료(High fat diet: 45% kcal fat, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 섭취하였다. 모든 연구에 사용된 마우스의 수는 각 그룹 당 8마리이다 (n=8/group).

모든 실험 군은 마우스를 죽이기 4시간 전에 사료를 제거하였다. 지방조직은 무게 측정 후 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

2.2. 조직형태학적 분석

지방조직은 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 동안 고정한다. Paraffin section(5μm)은 탈수와 세척과정을 실시한 후, hematoxylin과 eosin으로 염색한다. 지방세포의 크기는 image analysis system(Image pro-plus, MD, USA)으로 분석한다.

2.3. Target genes 발현 분석

Total RNA는 Trizol(Invitrogen, Avenue Carlsbad, U.S.A.)을 사용하여 조직으로부터 추출하였으며, 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction,)을 이용하여 특이적 mRNA의 발현 양을 측정하였다. Complementary DNA는 total RNA 2μg과 reverse primer 0.5μg을 혼합하여 최종 약 14μl를 준비하여 75°C에서 15분 동안 열처리(heating) 한 후, 5분 동안 얼음 속에 보관하였다. 여기에 5X M-MLV reaction buffer, 10 mM dNTP mixture, 200 units M-MLV RT(Promega, Madison, WI, USA)를 첨가하여 최종 양이 25μl가 되게 한 후, 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. RT reaction 5μl에 10X reaction buffer(Mg2+포함), 10 mM dNTP, 5 unites Taq polymerase(Solgent, Daejeon, South Korea), 그리고 10 μM primer를 첨가하여 최종 50μl가 되게 한 후, RTC-100TM Programmable Thermal Controller(MJ Research, INC., Waltham, MA, USA)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 표 1은 primer sequences와 PCR conditions이다.

2.4. 분석방법

모든 값은 mean \pm standard deviation(SD)으로 표시하였다. 통계분석은 Tukey's multiple-comparison test에 의한 one-way ANOVA를 실시하였다. 유의수준은 $p<0.05$ 로 설정하였다.

표 1. Primer sequences와 PCR 조건

Table. 1 Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions

Genes	Size (bp)	Primer sequences	AT ($^{\circ}$ C)	C
C/EBP α	465	F:5'-agacatcagegcctacatcg-3' R:5'-tgcagggtgcattgggttc-3'	52	34
LPL	770	F:5'-atggagagcaaagccctgc-3' R:5'-agtccctctctgcataatcca-3'	52	34
FAT/ CD36	883	F:5'-agtttggatcttgatgtgc-3' R:5'-ttcaatagttctgaaacatc-3'	52	34
Leptin	275	F:5'-ccaagaagaggatccctgtccaggc-3' R:5'-agaatgggtgaagccccagg-3'	58	26
β -actin	350	F:5'-tggaatctgtggcatccatgaaa-3' R:5'-taaaacgcagtcagtaacagtcc-3'	58	28

AT : Annealing temperature, C : Cycle

III. 실험결과

Testosterone \circ CAST 수컷 마우스에서 증가된 지방조직무게를 억제조절하는지 조사하였다(그림 1).

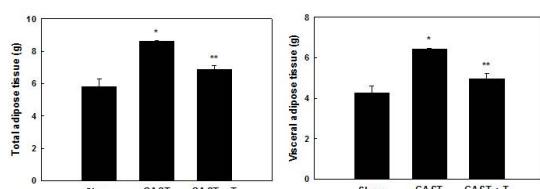


그림 1. 지방조직무게에 대한 testosterone의 영향

Fig. 1 Effect of testosterone on adipose tissue mass

* $p<0.05$ significantly different from Sham mice

** $p<0.05$ significantly different from vehicle-treated CAST mice

Sham 마우스에 비해 CAST 마우스는 총 지방조직 무게와 내장지방조직무게가 각각 47.8%와 51.4% 씩 증가하였으나($p<0.05$), testosterone이 처리된 CAST 마우스는 CAST에 의해 증가된 총 지방조직무게와 내장

지방조직무게가 각각 20.3%와 23.0% 씩 감소되었다($p<0.05$).

CAST 마우스에서 testosterone에 의한 지방조직무게의 감소가 testosterone에 의한 지방세포의 형태적 변화와 관련이 있는지를 조사하였다(그림 2와 그림 3).



그림 2. 백색지방조직의 형태적 변화에 대한 testosterone의 영향

Fig. 2 Effects of testosterone on morphological changes of white adipose tissue

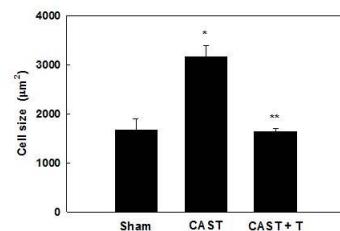


그림 3. 백색지방조직의 세포 크기에 대한 testosterone의 영향

Fig. 3 Effects of testosterone on adipocyte size of white adipose tissue

* $p<0.05$ significantly different from Sham mice

** $p<0.05$ significantly different from vehicle-treated CAST mice

조직형태학적 분석에 의하면 CAST 마우스의 내장지방조직을 구성하는 지방세포의 크기는 Sham 마우스에 비해 더 증가되었다($p<0.05$). 그리고 내장지방조직의 무게에 대한 testosterone의 영향과 일치되게 testosterone은 내장지방세포의 크기를 감소시켰다. CAST 마우스에 비해 testosterone이 처리된 CAST 마우스의 내장지방세포의 크기는 48.3% 감소되었다($p<0.05$). 고지방식이를 섭취한 CAST 수컷 마우스에서 testosterone이 백색지방조직의 증가를 개선시킨 분자생물학적 조절기전을 규명하기 위해, 내장백색지방조직에서 C/EBP α 전사조절인자의 mRNA 발현정도를 조사하였다(그림 4).

내장백색지방조직에서의 C/EBP α mRNA 발현은 CAST 마우스가 Sham 마우스에 비해 26.7% 증가되었

다($p<0.05$). 그러나 이러한 효과는 testosterone 처리에 의해 억제되었다. CAST 마우스에 비해 testosterone \circledast 처리된 CAST 마우스의 C/EBP α mRNA 발현은 23.4% 감소되었다($p<0.05$).

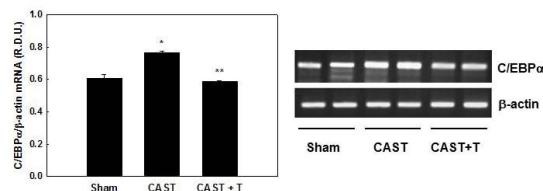


그림 4. testosterone에 의한 C/EBP α 유전자 발현의 조절
Fig. 4 Modulation of adipose C/EBP α gene expression by testosterone

* $p<0.05$ significantly different from Sham mice
** $p<0.05$ significantly different from vehicle-treated CAST mice

또한 백색지방조직에서 testosterone \circledast 지방세포 표지 유전자의 발현을 조절하는지를 조사하였다(그림 5).

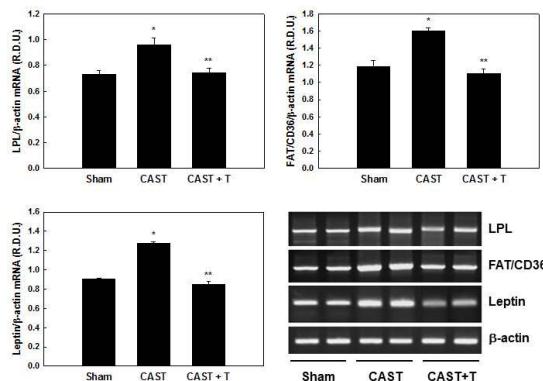


그림 5. testosterone에 의한 지방세포 특이적 유전자 발현의 조절
Fig. 5 Modulation of adipocyte specific gene expression by testosterone

* $p<0.05$ significantly different from Sham mice
** $p<0.05$ significantly different from vehicle-treated CAST mice

Sham 마우스에 비해 CAST 마우스는 지방세포 표지 유전자인 lipoprotein lipase(LPL), fatty acid translocase(FAT/CD36) 및 leptin의 mRNA 발현정도가 각각 31.3%, 34.5% 및 29.7% 씩 감소되었다($p<0.05$). Testosterone에 의한 C/EBP α mRNA 발현의 감소와 일치되게, CAST 마우스에 비해 testosterone \circledast 처리된

CAST 마우스의 LPL, FAT/CD36 및 leptin의 mRNA 발현정도는 각각 22.7%, 31.2% 및 33.5% 씩 감소되었다($p<0.05$).

IV. 고찰

본 연구는 CAST 수컷 마우스가 testosterone 처리에 의해 지방무게가 감소되었음을 보여주었다. 이러한 결과는 나이가 들거나 성선기능의 저하로 testosterone 분비량이 감소된 남성들에게 testosterone를 처리한 경우 복부비만과 총 지방무게가 감소된다는 다른 논문들에 의해서 뒷받침되고 있다[3, 4, 10].

내장지방의 축적은 신진대사 장애(metabolic syndrome)를 일으키는 대사작용과 밀접한 관련이 있다[11]. 따라서 본 연구는 testosterone이 지방세포 대사작용과 관련된 분자생물학적 조절기전을 통해 지방조직무게가 조절되는지를 규명하기 위해, CAST 마우스의 내장백색지방에서 지방세포 대사작용과 관련된 유전자들의 발현을 조사하였다.

C/EBP α 는 지방세포분화를 조절하는 중요한 전사조절인자이다. C/EBP α 의 발현은 지방세포분화 동안 증가되며 C/EBP α 의 활성은 지방세포분화와 지방세포 표지 유전자의 발현을 촉진한다[5]. Singh 등(2006)의 연구 결과에 의하면 testosterone \circledast 3T3-L1 지방전구세포가 성숙한 지방세포로 분화되는 것을 억제하였으며 C/EBP α 의 mRNA 발현과 단백질 활성을 억제하였다[12]. 본 연구결과는 CAST 마우스가 Sham 마우스에 비해 C/EBP α mRNA 발현이 증가되었지만 testosterone 처리에 의해 CAST에 의해 증가된 C/EBP α mRNA 발현이 감소되었음을 보여주었다.

이러한 연구결과들은 testosterone \circledast 지방세포에서 C/EBP α 의 전사기전에 관여함으로써 지방세포분화를 억제하였음을 시사하고 있다.

비만동안 지방세포의 형태적 변화측면에서 볼 때, 지방조직 무게의 증가는 지방세포로의 lipid 축적으로 인한 지방세포의 크기가 커졌기 때문인 것으로 알려져 있다[13]. 일반적으로 지방세포의 형태적 변화는 지방조직에서의 지방세포 유전자(adipogenic gene)의 조절과 관련이 있다. LPL과 FAT/CD36은 지방세포로의 지방축적과 관련이 있다. LPL은 혈액 속의 triglycerides를

자유 지방산으로 가수분해하는 효소이며 FAT/CD36은 지방산을 세포막으로 이동시켜 세포 속으로 유입시킴으로써 지방조직에 저장시킨다[14-15]. Leptin 또한 음식섭취, 에너지 소비 및 몸무게 항상성을 조절하는 중요한 지방 단백질로써 leptin의 양은 신체의 지방분포 및 양과 밀접한 관련이 있다[16].

C/EBP α mRNA 발현이 testosterone에 의해 감소된 것처럼, 본 연구에서는 testosterone \circledast CAST 마우스의 내장지방에서 지방세포 유전자인 LPL, FAT/CD36 및 leptin의 발현을 억제시켰다. 따라서 본 연구는 CAST 마우스에서 testosterone \circledast adipogenesis와 adipocyte metabolism과 관련된 유전자인 C/EBP α 작용을 억제조절함으로써, 지방세포의 형태를 변화시키고 지방조직 무게를 감소시킨다는 것을 입증하였다.

따라서 지방세포의 대사작용에 대한 testosterone의 분자생물학적 조절기전을 이해하는 것은 testosterone 분비량이 감소된 남성들의 비만을 조절하고 효과적인 지방무게 감소를 위한 치료에 도움을 줄 것이다.

V. 결 론

본 연구는 testosterone \circledast 처리된 CAST 마우스는 CAST 마우스에 비해 1)지방조직무게와 지방세포 크기가 감소되었으며 2)CAST에 의해 증가된 C/EBP α 및 지방세포 표지유전자들(LPL, FAT/CD36 및 leptin)의 mRNA 발현이 감소되어 Sham 마우스의 실험과 비슷한 결과를 얻었다.

결론적으로 본 연구는 testosterone \circledast CAST 마우스에서 C/EBP α 에 의해 조절되는 지방세포 표지 유전자들의 발현을 억제시킴으로써 지방조직무게와 지방세포의 대사작용을 조절한다는 것을 시사하고 있다.

REFERENCES

- [1] I. Juhan-Vague, P. E. Morange, and M.C. Alessi, "The insulin resistance syndrome: implications for thrombosis and cardiovascular disease" *Pathophysiology Haemostasis Thrombosis*, vol. 32, no. 5-6, pp. 269-273, Sep-Dec. 2002.
- [2] K. Blouin, J. P. Després, C. Couillard, A. Tremblay, D. rud'homme, C. Bouchard, and A. Tchernof, "Contribution of age and declining androgen levels to features of the metabolic syndrome in men" *Metabolism*, vol. 54, no. 8, pp. 1034-1040, Aug. 2005.
- [3] J. L. Tenover, "Experience with testosterone replacement in the elderly" *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 75(Suppl), pp. S77-S81, Jan. 2000.
- [4] C. Wang, R. S. Swerdloff, A. Iranmanesh, A. Dobs, P. J. Snyder, G. Cunningham, A. M. Matsumoto, T. Weber, and N. Berman, "Testosterone Gel Study Group. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men" *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 85, no. 8, pp. 2839-2853, Aug. 2000.
- [5] G. J. Darlington, S. E. Ross, and O. A. MacDougald, "The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation" *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 46, pp. 30057-30060, Nov 1998.
- [6] S. O. Freytag, D. L. Paielli, and J. D. Gilbert, "Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells" *Genes & Development*, vol. 8, no. 14, pp. 1654-1663, Jul. 1994.
- [7] R. J. Christy, V. W. Yang, J. M. Ntambi, D. E. Geiman, W. H. Landschulz, A. D. Friedman, Y. Nakabeppu, T. J. Kelly, and M. D. Lane, "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes" *Genes & Development*, vol. 3, no. 9, pp. 1323-1335, Sep. 1989.
- [8] G. De Pergola, "The adipose tissue metabolism: role of testosterone and dehydroepiandrosterone" *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, vol. 24, no. 2, pp. S59-63, Jun 2000.
- [9] E. Maneschi, A. Morelli, S. Filippi, I. Cellai, P. Comeglio, B. Mazzanti, T. Mello, A. Calcagno, E. Sarchielli, L. Vignozzi, F. Saad, R. Vettor, G. B. Vannelli, and M. Maggi, "Testosterone treatment improves metabolic syndrome-induced adipose tissue derangements" *The Journal of Endocrinology*, vol. 215, no. 3, pp. 347-362, Dec. 2012.
- [10] M. A. Boyanov, Z. Boneva, and V. G. Christov, "Testosterone supplementation in men with type 2 diabetes, visceral obesity and partial androgen deficiency" *Aging male*, Vol. 6, no. 1, pp. 1-7, Mar 2003.
- [11] M. D. Jensen, "Is visceral fat involved in the pathogenesis

- of the metabolic syndrome? Human model" *Obesity*(Silver Spring), vol. 14 suppl 1, pp. 20S-24S, Feb. 2006.
- [12] R. Singh, J. N. Artaza, W. E. Taylor, M. Braga, X. Yuan, N. F. Gonwalez-Cadavid, and S. Bhaisin, "Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: Nuclear Translocation of androgen receptor complex with β -catenin and TCF4 may bypass canonical wnt signaling to downregulate adipogenic transcription factors" *Endocrinology*, vol. 147, no. 1, pp. 141-154, Jan. 2006.
- [13] K. Yagi, D. Kondo, Y. Okazaki, and K. Kano, "A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes" *Biochimica and Biophysical Research Communications*, vol. 321, no. 4, pp. 967-974, Sep. 2004.
- [14] I. J. Goldberg, and M. Merkel, "Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology" *Frontiers Bioscience*, vol. 6, pp. D388-D405, Mar. 2001.
- [15] U. Gurriarán-Rodríguez, O. Al-Massadi, A. Roca-Rivada, A. B. Crujeiras, R. Gallego, M. Pardo, L. M. Seoane, Y. Pazos, F. F. Casanueva, and J. P. Camiña, "Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis" *Journal of Cellular Molecular Medicine*, vol. 15, no. 9, pp. 1927-1940, Sep. 2011.
- [16] J. M. Friedman, and J. L. Halaas, "Leptin and the regulation of body weight in mammals" *Nature*, vol. 395, no. 6704, pp. 763-770, Oct. 1998.



정선효(Sunhyo Jeong)

1995년 경북대학교 생물학과 이학사
1997년 경북대학교 생물학과 이학석사
2004년 목원대학교 생물학과 이학박사
2011년 충남대학교 스포츠과학과 이학박사
2006년~2008년 목원대학교 테크노과학연구소 연구교수
2009년~2010년 충남대학교 체육과학연구소 연구원
2012년~ 현재 목원대학교 의생명·보건학부 교수
※관심분야: 의료정보시스템, 생물정보학