

## 콜라비가 돼지 지방전구세포와 $3T_3-L_1$ cell의 증식과 분화에 미치는 영향

송미연<sup>1</sup> · 이재준<sup>2</sup> · 차선숙<sup>2</sup> · 정정수<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 충북대학교 농업생명환경대학 축산학과, <sup>2</sup> 조선대학교 자연과학대학 식품영양학과

## Effects of Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *Gongylodes*) on Proliferation and Differentiation of Pig Preadipocytes and $3T_3-L_1$ Cells

Mi-Yeon Song<sup>1</sup>, Jae-Joon Lee<sup>2</sup>, Seon-Sook Cha<sup>2</sup> and Chung-Soo Chung<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Science, Chungbuk National University, 52 Naesuddong-ro Heungdeok-gu, Cheongju Chungbuk 361-763, Korea, <sup>2</sup> Department of Food & Nutrition, Chosun University, 309 Pilmun-daero Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea

### ABSTRACT

The current study was carried out to determine the effects of Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) on proliferation and differentiation of pig preadipocytes and  $3T_3-L_1$  cells. Pig preadipocytes were isolated from the backfat of the new-born pigs. Twenty-four hours after seeding, the cells were washed with DMEM/F-12 (designated day 0). To measure the cell proliferation, the cells were treated with 25 ng/ml and 100 ng/ml ethanol extracts of Kohlrabi (peel and flesh) for two days (day 0 ~ 2). To measure differentiation, the cells were treated with Kohlrabi for two days (day 0 ~ 2) and cell differentiation was measured on day 6. Twenty-five ng/ml and 100 ng/ml of Kohlrabi peel decreased proliferation of pig preadipocytes by 4.59% and 17.7%, respectively, compared with the control and Kohlrabi flesh by 11.4% and 19.2%, respectively. However, Kohlrabi did not inhibit cell differentiation. To measure the effects of Kohlrabi on proliferation and differentiation of  $3T_3-L_1$  cells, the cells were treated with Kohlrabi for two days in culture, like pig preadipocytes. Kohlrabi (both peel and flesh) did not show any effects on cell proliferation and differentiation. In summary, the results of the current study showed that Kohlrabi decreased proliferation of pig preadipocytes, but no inhibitory effects on differentiation of the cells. Kohlrabi had no effects on proliferation and differentiation of  $3T_3-L_1$  cells.

(Key words : Kohlrabi, Pig preadipocytes,  $3T_3-L_1$  cells, Proliferation, Differentiation)

### 서 론

최근에 동물성 지방의 과다 섭취에 의한 성인병 발생이 크게 우려되고 있고, 지방과다축적적 가축의 생산성을 저하하기 때문에 가축이나 사람에서 지방축적 억제제는 중요한 과제로 인식되고 있다 (Rayalam 등, 2008 ; Adeneye 등, 2010). 지금까지 육종적인 접근에 의해서 가축의 지방축적을 억제해 보려는 시도가 있었으나 (Korner 등, 2008), 지방축적은 여러 유전자가 관여하므로 유전적으로 해결하기 어려운 면이 있다. 그래서 천연물을 포함한 외부 물질에 의한 지방축적 억제가 중시되고 있다. 지방조직은 지방세포로 이뤄져 있고 지방세포는 지방전구세포부터 증식과정을 거쳐서 분화에 이르는데, 배양 중의 세포에 천연물 등을 처리해서 증식과 분화에 미치는 영향을 구명하려는 연구가 많이 수행되어 왔다.

의약계를 포함한 여러 학문 분야에서 천연물 중에서 면역 증강

및 비만 억제 등을 가져오는 물질을 탐색하고 있는데 콜라비 (Kohlrabi)는 양귀비목 (*Papaveraceae*) 배추과 (*Brassicaceae*)에 속하는 2년생 채소이고, 순무양배추 또는 구경양배추 라고도 한다. 콜라비는 항암효과가 우수한 물질로 알려진 anthocyanin과 carotenoid (Park 등, 2012), glucosinolates (MaCledo와 MaCledo, 1990) 등을 풍부하게 함유하고 있다. 또한 콜라비는 양배추 등 일반채소에 비하여 비타민 C가 풍부하고, 열량도 낮고 수분과 식이 섬유소가 풍부해 다이어트에 유효하다고 알려져 있으나 (Choi 등, 2010), 지방축적 억제작용에 대해서는 알려진 바 없다. 본 연구에서 콜라비의 과육뿐만 아니라 과피의 작용도 함께 구명하는데 과피는 폐기자원을 활용하는 의미에서 중요하다.

콜라비가 지방세포의 증식과 분화에 미치는 작용을 구명하기 위해 두 가지 지방전구세포를 이용하려고 한다. 하나는 갓 난 돼지에서 분리한 지방전구세포이고, 다른 하나는 세포주 (cell line)로  $3T_3-L_1$  cell이다. 돼지에서 분리한 primary cell은 그 결과를 바로

\* Corresponding author : C. S. Chung, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Korea. Tel: 043-261-2549, Fax: 043-276-3140, E-mail: chungpig@hotmail.com

돼지나 사람에게 적용할 가능성이 많고,  $3T_3-L_1$  cell은 primary cell에 비해 다루기가 쉽고, 비용이 적게 들어서 만약에 연구결과가 primary cell과 비슷하게 나오면 동물에서 어렵게 세포를 분리, 배양하는 대신에 cell line을 이용하면 될 것이다.

그래서 본 연구의 목적은 콜라비가 돼지 지방전구세포와  $3T_3-L_1$  cell의 증식과 분화에 미치는 작용을 구명하는 것이다. 본 연구의 결과는 가축의 지방축적을 억제하는 사료첨가제나 사람의 비만을 억제하는 물질 개발의 기초자료로 사용될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 콜라비 추출

본 실험에 사용된 콜라비는 제주도에서 구입하여 수세한 후 과피와 과육을 분리하여 동결 건조하고 분쇄하여 분말로 제조하였다. 동결 건조한 콜라비 과피와 과육 분말을 각각 100 g 당 80% 에탄올 500 ml에 넣어 65°C에서 환류냉각관을 부착한 65°C의 heating mantle에서 3시간 동안 3회 추출한 다음 Whatman filter paper (No. 2)로 여과하였다. 여액을 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator로 용매를 제거하고 감압·농축한 후 동결 건조시켜 고형물 함량을 산출한 다음 (Jung 등, 2000), 시료의 산화방지를 위하여 -70°C에 냉동 보관하면서 사용하였다.

### 2. 돼지 지방전구세포 분리 및 배양

돼지 지방전구세포(stroma-vascular cell)는 신생자돈의 등지방 조직으로부터 분리하였다. 등지방 조직을 사용한 이유는 지방전구세포의 분리가 용이하기 때문이었다. 신생자돈에게 이산화탄소(CO<sub>2</sub>) 기체를 10분 동안 주입하여 완전히 죽었는지 확인하고 꺼내어 30% 요오드로 세척한 후 다시 70% 알코올로 세척한 후 등쪽 첫 번째 갈비부근에서 등지방 조직을 8~10 g 정도 떼어냈다. 떼어낸 지방조직을 잘게 세절한 후 지방조직 무게 g당 3 ml의 KRB (Kerb's ringer bicarbonate) 용액에 g당 200 unit의 collagenase를 녹여 세절한 지방조직과 함께 37°C shaking water bath에서 40분 동안 배양하여 지방조직을 소화시켰다. 그 후 250  $\mu$ m nylon screen으로 여과해서 소화되지 않은 지방조직을 제거했다. 그리고 3000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거했다. Tube 바닥에 침전된 지방전구세포를 다시 KRB 용액으로 희석하여 2000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하여 더 깨끗한 세포가 바닥에 침전되게 한 후, 75  $\mu$ m nylon screen으로 여과하여 지방전구세포를 수집했다.

돼지 지방전구세포의 배양은 Suryawan 등(1997)의 방법을 따르되 본 연구실에서 수정하여 확립한 방법을 이용했다(Mun과 Chung, 2004). 수집한 지방전구세포 수를 hemacytometer를 이용하여 조사한 후, 10% FBS를 함유한 DMEM/F-12 배지를 이용하여 6-well 배양접시에 증식은  $0.5 \times 10^6$  cell/well, 분화는  $1.0 \times$

$10^6$  cell/well을 접종하고 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 증식과 분화 모두 well당 2 ml의 배지를 사용하였다. 접종한 다음 날 적혈구(RBC)와 같은 이물질 등을 제거하기 위해 FBS를 함유하지 않은 DMEM/F-12 배지로 2회 세척하였다(day 0). 콜라비가 지방전구세포의 증식에 미치는 영향을 구명하기 위해서 세척을 한 날(day 0)로부터 세포수를 측정하는 날(day 2)까지 10% FBS를 포함한 배지에 배양하였다. 콜라비가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향을 구명하기 위해서 세척한 날(day 0)로부터 분화측정일(day 6)까지 10% FBS와 insulin (600 ng/ml), transferrin (1 ng/ml) 및 hydrocortisone (500 ng/ml)을 함유한 DMEM/F-12를 사용하여 배양하였고, 배지는 2일마다 교체했다. 콜라비가 돼지 지방전구세포의 증식과 분화에 미치는 작용을 구명하기 위해 신생 수 돼지 5마리를 사용했고, 각 처리당 3반복을 두었다.

### 3. $3T_3-L_1$ cell의 배양

주로 Chen 등(1997)의 방법을 따랐는데, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지를 이용하여 6-well 배양접시에 증식은  $1 \times 10^5$  cell/well, 분화는  $0.3 \times 10^5$  cell/well을 접종하고(day -7) 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였고, 증식과 분화 모두 well당 2 ml의 배지를 사용하였다.

콜라비가  $3T_3-L_1$  cell의 증식에 미치는 영향을 구명하기 위해서 세척을 한 날(day -6)로부터 세포수를 측정하는 날(day -4)까지 2일간 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 배양하였다.

콜라비가  $3T_3-L_1$ 의 분화에 미치는 영향을 구명하기 위해서 세척한 날(day -6)로부터 분화측정일(day 7)까지 14일간 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에 배양하였고 배지는 2일마다 교체해 주었다. 또한 세포가 팽창하는 day 0에는 분화유도를 위해 insulin (10  $\mu$ g/ml), dexametasone (1  $\mu$ M), IBMX (0.5 nmol/ml)를 첨가하였고, 2일 후인 day 2에는 같은 양(10  $\mu$ g/ml)의 Insulin만으로 분화를 유도하였다. day 4에 media를 교환해주면서 모든 분화유도를 종결하였다.

### 4. 콜라비 처리

콜라비는 2일 동안 처리하였는데, 증식과 분화 모두 돼지 지방전구세포는 배양초기 2일 동안(day 0~day 2),  $3T_3-L_1$ 은 day -6~day -4에 처리하였다.

### 5. 지방세포의 증식 및 분화 측정

돼지 지방전구세포의 증식은 trypsin 처리 후 세포 수를 측정했는데 그 방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 세포 배양이 끝난 후 6 well plate에서 배지를 모두 제거하고 2 ml의 versine으로 plate를 헹구어준 후, 360  $\mu$ l의 versene과 40  $\mu$ l의 trypsin을 넣고 골고루 섞은 뒤 5분 동안 incubation 시켜서 세포를 plate 바닥

에서 떨어뜨린 후 1.5 ml eppendorf tube에 cell을 수집하고, cell 10  $\mu$ l suspension을 사용하여 혈구계산기로 세포 수를 측정했다.

돼지 지방전구세포의 성숙세포로의 분화정도는 배양중인 세포의 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성도를 측정함으로써 구명했는데 기본적으로는 Wise와 Green (1979)의 방법을 사용했다.

### 6. 통계처리

본 연구에서 얻어진 자료의 통계모형 방정식은 다음과 같이 나타내었다.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \tau_j + e_{ijk}$$

$y_{ijk}$ 는 관측값,  $\mu$ 는 전체평균,  $A_i$ 는  $i$ 번째 돼지의 효과,  $\tau_j$ 는  $j$ 번째 처리의 효과,  $e_{ijk}$ 는 임의오차 효과로 설정하였다. 위와 같이 설정된 통계모형 방정식은 PC용 SAS Package (Version 9.1)의 GLM 프로시저를 이용하여 (SAS, 2004) 각 요인들에 대한 분산 분석 및 처리효과에 대한 유의차 분석을 수행하였으며, 대조구 (Control)와 처리구들간의 유의차 검정은 Dunnett t-test 방법을 이용하였다.

### 결과 및 고찰

콜라비가 돼지 지방전구세포의 증식에 미치는 작용을 구명하기 위해 세포배양 초기 2일간 25 ng/ml과 100 ng/ml의 콜라비를 처리했는데, 콜라비 과피와 과육 모두 지방전구세포의 증식을 억제하였다(과피 25 ng/ml 제외)(Fig. 1). 대조구(DMSO)에 비하여 콜라비 과피, 25 ng/ml, 100 ng/ml는 각각 4.59%, 17.7%( $p < 0.01$ )

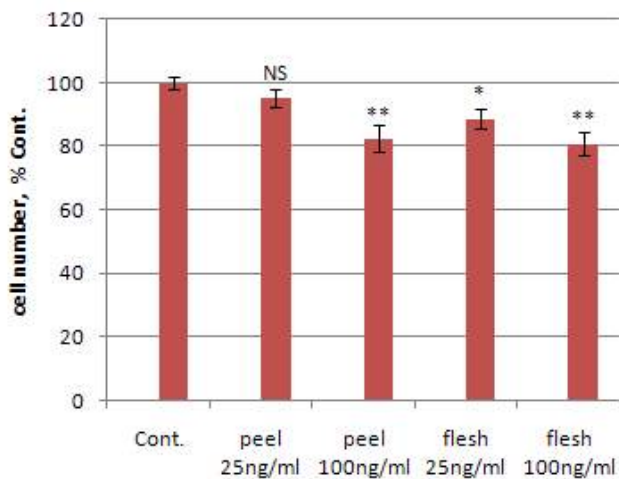


Fig. 1. Effects of Kohlrabi on proliferation of pig preadipocytes. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (Cont.) Cell proliferation was determined by counting cells by hemacytometer. Values are means  $\pm$ SE; difference from Cont.: NS, not significant; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

그리고 콜라비 과육 25 ng/ml, 100ng/ml는 각각 11.4% ( $p < 0.05$ ), 19.2% ( $p < 0.01$ ), 억제하였다. 모든 처리구의 100 ng/ml 농도가 25 ng/ml 보다 더 큰 억제작용을 나타내어 농도에 의한 차이를 잘 보여주고 있다. 그리고 높은 농도에서 콜라비 과피가 과육과 비슷하게 세포 증식을 억제한 것은 유의할 만하다.

콜라비가 돼지 지방전구세포 분화에 미치는 작용을 구명하기 위해 증식에 미치는 작용을 구명하는 것과 마찬가지로 배양초기 2일 동안 콜라비를 처리하였다. Fig. 2에 나타나 있는 대로, 증식에 미치는 작용과는 다르게 콜라비는 지방전구세포의 분화를 억제하지 않았고 오히려 촉진시켰는데, 콜라비 과피 100 ng/ml은 12.8% ( $p < 0.01$ ), 과육 100 ng/ml은 10.6% ( $p < 0.01$ ) 증가시켰다. 왜 높은 농도의 콜라비가 세포의 증식을 억제했는데 분화는 촉진시켰는지 그 이유는 알기 어렵다.

Fig. 3은 세포배양이 진행됨에 따른 세포의 증식과 분화 진행 정도의 처리간의 차이를 보여주고 있는데, 분화가 완료된 day 6에 처리 간에 큰 차이를 나타내지 않았는데, 이것은 Fig. 2의 결과를 잘 반영해 준다고 볼 수 있다.

Song 등 (2011)은 본 연구에서처럼 배양초기 2일간 비타민 A인 retinoic acid (RA)를 처리했을 때 RA를 처리 받는 시기에 일어나는 증식은 억제하지 않았으나 배양 후기에 일어나는 분화를 크게 억제했다고 보고했다. 이와 상반되게 본 연구에서 콜라비는 증식만 억제했고, 분화는 아무런 영향을 미치지 않았거나 (25 ng/ml), 또는 오히려 분화를 촉진시켰다 (100 ng/ml). 이 사실들은 RA와 콜라비가 서로 다른 작용기전을 통해 돼지 지방전구세포의 증식과 분화에 영향을 미치는 것으로 여겨진다. Brandebourg와 Hu (2005)는 RA가 PPAR $\gamma$ 에 영향을 미쳐 돼지 지방전구세포의 분화를 억제한다고

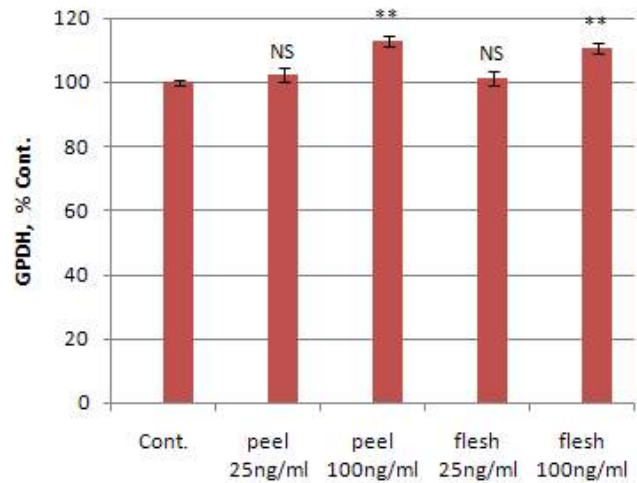


Fig. 2. Effects of Kohlrabi on differentiation of pig preadipocyte. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (Cont.) Cell differentiation was determined by glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. Values are means  $\pm$ SE; difference from Cont.: NS, not significant; \*\* $P < 0.01$ .

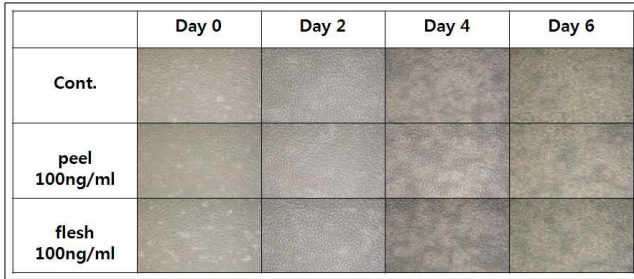


Fig. 3. Photomicrograph of cultured pig primary preadipocytes treated with Kohlrabi. The progress of differentiation was shown as cell culture continued.

보고했는데 콜라비는 어떤 transcription factor에 영향을 주는지는 미래의 실험에서 밝혀져야 할 사항이다.

콜라비가 돼지 지방전구세포의 증식은 억제했으나 분화는 억제하지 않은 본 연구의 결과는 콜라비가 과연 돼지나 사람에서 지방 축적 억제작용을 가져올 것인지 의문스럽게 한다. 즉 광의의 세포분화는 증식과 협의의 분화를 포함하고, 광의의 세포분화가 지방세포의 생성에 중요하기 때문이다. 콜라비가 인간의 체중감소에 유효하다고 알려져 있으나(Choi 등, 2010), 이것은 콜라비에 함유된 다량의 식이섬유소 때문이지, 어느 특정 성분이 지방세포 생성에 영향을 미치는 것으로 여겨지지는 않는다.

콜라비 과피와 과육이 cell line인  $3T_3-L_1$  세포의 증식과 분화에 미치는 작용이 Fig. 4와 5에 나타나 있다. 돼지 지방전구세포에서와는 달리 콜라비는 세포 증식을 억제하지 않았다. 그리고 세포분화에도 아무런 작용을 나타내지 않았다.

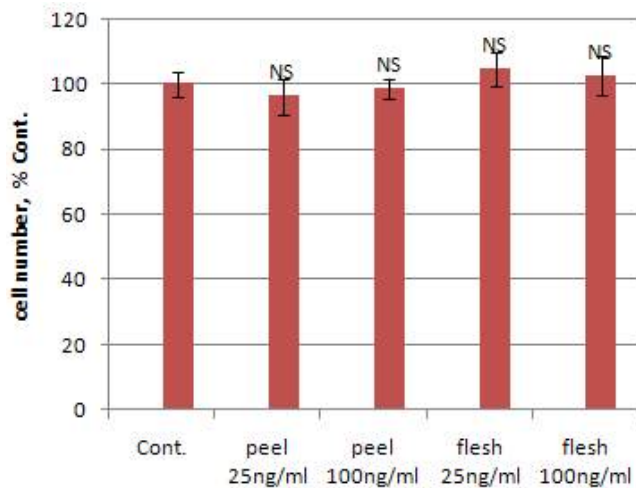


Fig. 4. Effects of Kohlrabi on proliferation of  $3T_3-L_1$  cell. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (Cont.) Cell proliferation was determined by counting cells by hemacytometer. Values are means  $\pm$  SE; difference from Cont. : NS, not significant;

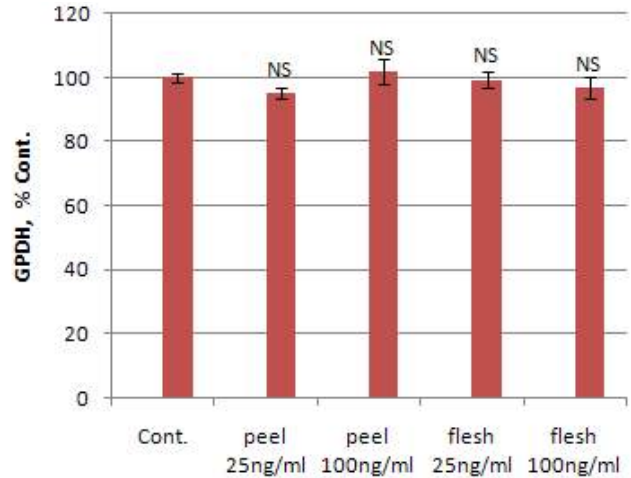


Fig. 5. Effects of Kohlrabi on differentiation of  $3T_3-L_1$  cell. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (Cont.) Cell differentiation was determined by glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. Values are means  $\pm$  SE; difference from Cont.: NS, not significant;

콜라비가 신생돼지 지방조직에서 분리한 지방전구세포 (primary cell)의 증식을 억제했지만 생쥐에서 유래한 cell line인  $3T_3-L_1$  cell의 증식에는 아무런 영향을 나타내지 않은 것은 유의할 만하다. 편의성 때문에 특정작용을 구명하기 위해서 그것에 적합한 cell line으로 primary cell을 대체하기도 하나 주의를 요한다(Purup과 Nielsen, 2012). 이것을 뒷받침해주는 예로, 돼지나 소의 생후 insulin-like growth factor-II (IGF-II)의 농도는 높으나 쥐나 생쥐의 그것은 극히 낮고(Gatford 등, 1998), IGF-II가 돼지 지방전구세포의 증식과 분화를 촉진시키기에(Owens 등, 2008),  $3T_3-L_1$  cell이 돼지 지방전구세포를 대체해서 지방세포의 증식이나 분화를 측정하는 것이 적합하지 않을지도 모른다.

본 연구의 결과를 요약하면, 콜라비(Kohlrabi)를 배양중인 세포에 처리했을 때, 신생자돈에서 분리한 지방전구세포의 증식은 억제했으나 분화는 억제하지 않았다. 한편 콜라비는  $3T_3-L_1$  cell의 증식과 분화 모두 영향을 미치지 않았다.

## 요 약

본 연구는 콜라비가 돼지 지방전구세포와  $3T_3-L_1$  세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 구명하기 위해 수행하였다. 돼지 지방전구세포는 신생자돈의 등지방에서 분리했다. 세포를 접종한 1일 후에 세척했고(day 0), 세포증식에 미치는 영향을 구명하기 위해서 2일 동안(day 0~day 2) 25 ng/ml과 100 ng/ml의 콜라비 알코올 추출물(과피와 과육)을 처리했다. 세포분화를 구명하기 위해서는 DMEM/F-12 배지에 6일 동안(day 0~day 6) 배양하고 배양초기 2일 동안(day 0~day 2) 콜라비를 처리하고 day 6에 세포 분화를 측정했다. 콜라비 과피 25 ng/ml와 100 ng/ml은 돼지 지방전

구세포의 증식을 각각 4.59%, 17.7% 억제했고, 콜라비 과육은 각각 11.4%, 19.2% 억제했다. 반면 돼지 지방전구세포의 분화는 억제하지 않았다. 콜라비가  $3T_3-L_1$  cell의 증식과 분화에 미치는 작용을 구명하기 위해, 돼지 지방전구세포처럼, 세포 배양초기 2일간 콜라비를 처리했는데 콜라비 과피와 과육 둘 다 세포의 증식과 분화에 영향을 미치지 않았다. 본 연구의 결과를 요약하면, 콜라비는 돼지 지방전구세포의 증식을 억제했으나 분화는 억제하지 않았고, 한편  $3T_3-L_1$  cell의 증식과 분화 모두 영향을 미치지 않았다.  
(주제어: 콜라비, 돼지 지방전구세포,  $3T_3-L_1$  세포, 증식, 분화)

## 인 용 문 헌

- Adeneye, A. A., Adyemi, O. O. and Agbaje, E. O. Antiobesity and antihyperlipidaemic effect of *Hunteria umbellata* seed extract in experimental hyperlipidaemia. *J. Ethnopharmacol.* 130:307-314.
- 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.
- Chen, C., Brodie, A. E. and Hu, C. Y. 1997. CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  cannot overcome TCDD inhibition of  $3T_3-L_1$  preadipocyte differentiation. *Obesity Fes.* 5:146-152.
- Choi, S. H., Ryu, D. K., Park, S. H., Ahn, K. G., Lim, Y. P. and An, G. H. 2010. Composition analysis between kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) and radish (*Raphanus sativus*). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:469-475.
- Gatford, K. L., Egan, A. R., Clarke, I. J. and Owens, P. C. 1998. Sexual dimorphism of the somatotrophic axis. *J. Endo.* 157:373-389.
- Jung, G. T., Ju, I. O., Choi, J. S. and Hong, J. S. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32:928-935.
- Korner, A., Keiss, W., Stumvoll, M. and Kovacs, P. 2008. Polygenic contribution to obesity: genome-wide strategies reveal new targets. *Front. Horm. Res.* 36:12-36.
- MaCledo, G. and MaCledo, A. J. 1990. The glucosinolates and aroma volatiles of green kohlrabi. *Phytochem.* 29:1183-1187.
- Moon, H. S. and Chung, C. S. 2004. Effect of isomers of conjugated linoleic acid on porcine preadipocyte differentiation. *J. Anim. Sci. & Technol.* 46:967-974.
- Owens, P. Kim, W. Y., Kim, H. R. and Chung, C. S. 2008. Insulin-like growth factors-1 and 2 promote proliferation and differentiation of cultured pig preadipocytes by different receptor-mediated mechanisms. *J. Anim. Sci. & Technol.* 50:649-656.
- Park, W. T., Kim, J. K., Park, S., Lee, S. W., Li, X., Kim, Y. B., Uddin, M. R., Park, N. I., Kim, S. J. and Park, S. U. 2012. Metabolic profiling of glucosinolates, anthocyanins, carotenoids, and other secondary metabolites in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *J. Agri. Food Chem.* 60:8111-8116.
- Purup, S. and Nielsen, T. S. 2012. Cell-based models to test the effects of milk-derived bioactives. *Animal* 6:423-432.
- Rayalam, S., Della-Fera, M. A. and Baile, C. A. 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocytes life cycle. *J. Nutr. Biochem.* 19:717-726.
- SAS. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. Volume 1. Institute Inc., Cary, NC., USA
- Song, M. Y., Dang, C. K. and Chung, C. S. 2011. Effect of retinoic acid on proliferation and differentiation of preadipocytes from male and female Pigs. *J. Anim. Sci. & Technol.* 53:451-454.
- Suryawan, A., Swanson L. V. and Hu, C. Y. 1997. Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are 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  $3T_3$  cells. *J. Biol. Chem.* 254:273-275.

(Received Jan. 22, 2013; Revised Feb. 18, 2013; Accepted Feb. 20, 2013)