

ANIMAL

# Influence of co-culturing muscle satellite cells with preadipocytes on the differentiation of adipocytes and muscle cells isolated from Korean native cattle

Chang Weon Choi\*

Department of Animal Resources, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

\*Corresponding author: [changchoi@daegu.ac.kr](mailto:changchoi@daegu.ac.kr)

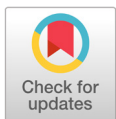
## Abstract

The present study was done to investigate the effect of co-culturing muscle satellite cells (MSCs) and intramuscular preadipocytes (IPs) on the differentiation of adipocytes and muscle cells isolated from Korean native cattle. MSCs and IPs were single-cultured in 10% fetal bovine serum/Dulbecco's modified Eagles medium (FBS/DMEM) for 48 h followed by culturing in 5% FBS/DMEM as the growth media. Then, the growth media was replaced by differentiation media composed of 2% FBS/DMEM without any additives for the single- or co-culture of muscle cells and intramuscular adipocytes to induce the differentiation of both cell types. Cell differentiation was measured by morphological investigation and cytosolic enzyme analysis of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) for the adipocytes and creatine kinase (CK) for the muscle cells. In the morphological test, the presence of muscle cells did not stimulate adipocyte differentiation showing more differentiation of the adipocytes in the single-culture compared to the co-culture condition. However, the differentiation of muscle cells was promoted by adipocytes in the co-culture. The results of the enzymatic analysis were highly associated with the morphological results with a statistically higher GPDH activity ( $p < 0.05$ ) appearing in the single-culture than in the co-culture, whereas the opposite was true for the CK activity of the muscle cells ( $p < 0.05$ ). By manipulating *in vivo* the milieu using a co-culture, we could detect the difference in the rate of cell differentiation and suggest that a co-culture system is a more reliable and precise technique compared to a single-culture. Further studies on various co-culture trials including supplementation of differentiating substances, gene expression analysis, etc. should be done to obtain practical and fundamental data.

**Keywords:** adipocyte, co-culture, Korean native cattle, muscle satellite cells

## Introduction

한우 쇠고기는 일반적으로 근내지방도가 높을수록 고급육으로 인식되어 지는데(Kim et al., 2017; Hamid et al., 2018), 그것은 올레인산과 같은 근내지방 내 불포화지방산 함량과 높은 상관관계가 있다고 알려져 있다(Choi et al., 2012). 따라서, 올레인산을 포함한 근내지방 내 불포화지방산을 높이



### OPEN ACCESS

**Citation:** Choi CW. 2018. Influence of co-culturing muscle satellite cells with preadipocytes on the differentiation of adipocytes and muscle cells isolated from Korean native cattle. Korean Journal of Agricultural Science. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180060>

**DOI:** <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180060>

**Received:** June 14, 2018

**Revised:** July 24, 2018

**Accepted:** August 1, 2018

**Copyright:** © 2018 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기 위해서는 비육우의 세포 내에서 일어나는 근육, 지방의 발달과 분화에 대한 이해와 지방 세포 분화 요인의 연구가 필수적이며, 이는 세포배양기법을 이용하여 대량의 기초 자료 확보가 효과적이라 할 수 있다(Hausman and Poulos, 2005; Choi, 2011). 기존 3T3-L1 등 세포주를 이용한 연구에서 지방 세포의 분화는 insulin, triiodothyronine, growth hormone, 수용성 비타민 첨가 등에 의해 촉진되고(Ailhaud et al., 1992; Safonova et al., 1994; Gregoire et al., 1998), 비타민 A, D, E, K 등 지용성 비타민 첨가에 의해 억제된다고 발표된 바 있다(Ishida et al., 1988; Kawada et al., 1990). 우리나라에서 세포주가 아닌 동물에서 직접 채취한 세포의 primary culture, 특히 한우를 이용한 지방세포 배양기법은 1990년 후반 이후 고급육 생산의 개념이 정립되기 시작되면서 본격적으로 시도되었는데, 한우 지방세포 분화를 위한 표준 배지 정립과 insulin, dexamethasone 등 분화 촉진 요인에 대한 효과 실험 등이 이루어졌다(Lee et al., 1997; Chung et al., 2001; Lee et al., 2005).

그런데, 지금까지의 지방세포배양 관련 연구들은 주로 3T3-L1 같은 지방세포주나 생체 지방세포 등 1종류의 세포만을 이용한 단독배양 기법을 이용하여 수행하였다(Chung et al., 2001; Lee et al., 2005; Choi, 2011). 그러나, Choi et al. (2012)에서 지적한 바와 같이 단독세포배양기법을 이용한 체지방 연구는 그 자체의 결과는 비교적 명확하지만 그 결과를 *in vivo* 실험이나 농장에 실제 적용할 경우 세포배양기법의 결과와 매우 다르거나 그 효과가 미흡한 결과들이 나타난다고 하였다. 특히 한우고급육의 주요 요인인 근내지방이 근육 내 침착되는 지방이라는 것을 고려할 때 단독배양보다는 지방 및 근육 세포지방이 동시에 배양되는 조건에서 실험이 수행되는 공동배양(co-culture)을 통해 더 정확한 근내지방의 발달과 분화 기전을 이해할 수 있을 것으로 생각된다(Choi et al., 2012; Choi et al., 2013). 지금까지 축산분야에서 지방-근육세포의 공동 배양기법을 이용한 연구는 외국의 경우 돼지 지방-근육세포 공동배양 연구(Hausman and Poulos, 2005), 브란거스 교잡우 지방-근육세포 공동배양(Choi et al., 2013) 등이 발표된 바 있다. 하지만, 우리나라의 경우 본 연구팀에 의해 3T3-L1 및 L6 공동배양 연구가 발표되었을 뿐(Choi et al., 2007; Choi et al., 2012), 한우 고급육의 주요 요인으로 높은 근내지방도를 요구함에도 불구하고 한우를 이용한 primary 지방-근육세포 공동배양 연구는 아직 전무한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 한우 지방 및 근육세포의 단독 및 공동배양을 통해 배양기법에 따른 지방 및 근육세포의 분화에 미치는 영향을 조사하여 단독배양 위주의 세포배양 연구의 대안을 제시하고 향후 지방-근육세포 공동배양기법을 이용한 분화 조절관련 연구의 기초자료를 확보하기 위해 수행되었다.

## Materials and Methods

### 한우 지방 및 근육세포의 단독배양

한우 비육우 지방전구세포(intramuscular preadipocytes, IP)의 primary culture는 Chung et al. (2001) 및 Oh et al. (2005)이 제시한 방법을 기초로 수행하고, 근육위성세포(muscle satellite cells, MSC)의 primary culture는 Choi et al. (2012)와 Choi et al. (2013)의 방법을 기본 조건으로 실시하였다.

한우 비육우 IP를 배양하기 위해 먼저 24개월령 한우 거세비육우의 도축, 해체되는 과정 중에 약 500 g 정도의 등심을 채취하였다. 육안으로 식별되는 혈관 및 결합조직을 즉시 제거하고 근내지방을 채취한 다음 1% Pen-Strep solution (SV30010, Hyclone, Logan, Utah, USA) 및 amphotericin B solution (04195780D, Gibco, Grand Island, NY, USA)이 처리된 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, SH30268.01, Hyclone, Logan, Utah, USA)에 넣어서 신속하게 실험실로 운반하였다. Clean bench 내에서 혈관 및 결합조직, 임파구 등을 제거하여 근내지방 조직만을 채취하고 collagenase의 digestion을 용이하게 하기 위해 잘게 세절한 후 HBSS에 0.1%의 collagenase type II (C6885, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 첨가한 digestion buffer를 이용하여 37°C에서 1시간 동안 digestion 시켰다. Digestion 후 250 µm nylon mesh를 이용해 미소화된 지방절편을 제거하고 50 µm nylon mesh로 다시 한번 필터링하였다. 성숙한 지방세포가 있는 상층부분을 걸어내고 IP가 포함된 하층부분을

원심 분리( $500 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 min)하고 분리된 세포 pellet에 antibiotics를 함유한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, SH302043.01, Hyclone, Logan, Utah, USA)으로 3회 세척하는 과정을 통하여 IP를 얻었다. Hemocytometer와 trypan-blue를 이용하여 세포 수를 측정하는 후,  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 밀도로 T-75 flask (83.1813.002, Sarstedt, Nümbrecht, Germany)에 seeding 하고 5% fetal bovine serum (FBS, SH30396.03, Hyclone, Logan, Utah, USA), 1% Pen-Strep solution, amphotericin B solution을 포함한 DMEM media (growth media)를 처리하였다. IP는  $37^{\circ}\text{C}$ , 95% air, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였고 media는 48 시간 간격으로 교환하였다.

한우 비육우 MSC의 배양을 위해 전술한 도축 한우의 등심부위를 약 50 g 분리하여 0.9% saline이 담겨있는 멸균 bag에 넣어 이동 후 간이 실험대에서 육안으로 확인되는 혈관 및 결합조직 등을 신속히 제거하였다. 도축 30 분 전에 ice-bucket에서 약  $4^{\circ}\text{C}$ 로 예냉 중이던 muscle stability media (1% Pen-Strep solution, 0.1% amphotericin B, 100 mL HBSS)에 등심 근육조직만을 넣은 뒤 신속히 실험실로 운반하여 clean bench 내에서 dissociation media (0.1% collagenase, 1% Pen-Strep solution, 0.1% amphotericin B, 100 mL HBSS)가 소량 있는 specimen-cup에 운반한 근육조직을 올려놓고 다시 혈관 및 결합조직을 최대한 제거한 뒤 원활한 digestion을 위해 가위로 잘게 세절하였다. 깨끗한 50 mL tube에 dissociation media를 15 mL 넣은 뒤 잘게 세절한 근육조직을 첨가하고,  $37^{\circ}\text{C}$  shaking water bath (250 rpm, 30 min)에서 digestion하였다. 그 후  $40 \mu\text{m}$  cell strainer (REF 352350, BD Falcon, Northbrook, Illinois, USA)를 이용하여 소화되지 않은 근육조직들을 깨끗이 제거해 주었다. Filtering 해준 근육세포들을 원심분리( $1,500 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min)하여 근육세포들을 pellet화 시켰으며, pellet을 DME/F-12 (1 : 1) (SH30023.01, Hyclone, Logan, Utah, USA)를 기본 배지로 하는 muscle cell culture growth media (10% FBS, 1% Pen-Strep solution, 0.1% amphotericin B, 90% DME/F-12 (1 : 1))에 suspension한 뒤 다시 원심분리( $500 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min)하여 pellet을 만드는 washing 과정을 3 회 이상 반복하였다. Washing 과정 후, 최종 pellet을 muscle cell culture media에 suspension 한 뒤 hemocytometer와 trypan-blue를 이용하여 세포 수를 계수한 후, 약  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 밀도로 T-75 flask에 seeding하였다. 배양조건은 IP 배양 조건과 동일하게  $37^{\circ}\text{C}$ , 95% air, 5% CO<sub>2</sub>로 하였고 media 또한 동일하게 48 시간 간격으로 교환하였다.

한우에서 유래된 MSC와 IP는 전술한 세포배양 과정을 통해 각각 근육세포(muscle cells)와 근내지방세포(intramuscular adipocytes)로 발달시키고 세포 변화 관찰을 통해 약 70% confluence 되었을 때 분화배지 처리를 해 주었다. 일반적으로 단독배양의 경우, 근육세포 분화는 낮은 수준의 FBS 또는 horse serum 등이 첨가된 DMEM media를 이용하고 지방세포 분화는 FBS에 insulin, dexamethasone, MIX 등을 첨가한 DMEM media를 사용하지만(Choi, 2011; Choi et al., 2013), 본 연구에서는 특성상 단독배양과 공동배양의 media 조건을 일치시키기 위해 Choi et al. (2012)의 방법대로 단독 및 공동배양 모두 2% (FBS/DMEM) media를 분화배지로 사용하였다.

## 한우 근육 및 지방세포의 공동배양

한우 근육 및 지방세포의 공동배양은 Choi et al. (2012)와 Choi et al. (2013)에서 제시된 방법을 근거로 수행하였다. 단독 배양에서 증식시킨 근육 및 지방세포를 6 well plate (83.1839, Sarstedt, Nümbrecht, Germany)에  $0.4 \mu\text{m}$  insert membrane (07-200-558, Corning, Oneota, NY, USA)을 이용하여 6 well plate 바닥에 근육세포를 분주하고, insert membrane 바닥에 지방세포를 분주하여 공동배양 하였다. 공동배양 분화용 media는 전술한 바와 같이 2% FBS/DMEM를 사용하였고, 단독 배양 조건과 동일하게  $37^{\circ}\text{C}$ , 95% air, 5% CO<sub>2</sub>로 하였고 media 또한 동일하게 48 시간 간격으로 교환하며 형태학적 변화를 관찰하였다.

## 세포분화도 분석

근육과 지방세포의 단독 및 공동배양 후 근육세포의 분화정도는 creatine kinase (CK) assay로 분석하였고, 지방세포는 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity를 측정하였는데, CK 및 GPDH 분석을 위한 세포의 전 처리는 Oh et al. (2005)의 방법에 따라 실시하였다. 분화배지 처리일(0 일) 및 분화 후 8 일에 배양 중이던 6 well plate의 media를 모두 제거

후 2 mL의 DMEM으로 2회 washing하고 6 well plate를 얼음 위에 올린 뒤, homogenizing buffer (4.28 g sucrose, 186 mg Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O (Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) Disodium salt · Dihydrate), 30.3 mg Tris-base, 50 mL ddH<sub>2</sub>O)를 각 well에 1 mL씩 주입한 뒤 5분 간 정치하였다. 세포 샘플링을 위하여 동일한 시간, 일정한 방향 및 힘으로 각 well을 rubber policeman을 이용해 긁어준 뒤 micro tube에 옮겨 넣었으며, 40 w에서 약 10 초간 sonication하였다(4°C). 용해성 단백질을 추출을 위해 원심분리(12,500 × g at 4°C for 10 min)를 실시하였으며, pellet을 제외한 나머지 부분을 새로운 micro tube에 담고, 액체질소에서 냉동시킨 후 CK 및 GPDH 분석 전까지 -70°C에서 보관하였다.

CK activity의 측정은 QuntiChrom™ creatine kinase assay kit (ECPK-100, BioAssay Systems, Hayward, California, USA)를 사용하였다. Kit 내 포함된 substrate solution과 assay buffer 및 enzyme mix를 10 : 100 : 1의 비율로 혼합하여 분석 샘플 수에 맞게 reconstituted reagent를 제조한 뒤 전 처리한 근육세포 샘플들과 잘 섞은 뒤(Reconstituted reagent : 근육세포 sample = 10 : 1), 96 well plate (Product No. 3590, Corning, Oneota, NY, USA)에 well 당 110 µL씩 주입하였다. 상온에서 10 분간 정치시킨 뒤 microplate reader를 이용해 340 nm의 흡광도로 30분 간격으로 O.D.를 측정하여 ΔCK를 계산하였으며, 계산식은 다음과 같다.

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

여기서 cal과 H<sub>2</sub>O는 kit 내 calibrator 시약과 증류수를 샘플과 동일한 방법으로 측정된 O.D. 값을 나타내며, 40 min과 10 min은 샘플의 40분 및 10분의 흡광도를 측정된 O.D. 값을 나타낸다. 측정 후 샘플과 calibrator와의 백분율로 CK를 계산하였다. 결과값의 1 U (unit)는 pH 6.0의 조건에서 phosphocreatine으로부터 1 µmole의 phosphate가 ADP로 들어가 ATP로 전환되는데 필요한 CK의 분당 활성도를 나타낸다.

지방세포 내 GPDH 분석은 Choi et al. (2012)의 방법에 따라 실시하였다. 전 처리 해둔 단독 및 공동배양한 지방세포 샘플 100 µL를 취하여 새로운 micro tube에 옮겨 담고, 사용 전 25°C로 데워둔 assay buffer (8 mL triethanolamine-EDTA premix, 4.8 mL ddH<sub>2</sub>O, 9 µL β-mercaptoethanol, 2 mg NADH) 0.8 mL를 샘플이 들어있는 micro tube에 주입한 뒤 substrate buffer (141.6 µg dihydroxyacetone phosphate lithium, 1 mL ddH<sub>2</sub>O) 100 µL를 추가로 주입하였다. 상온에서 5분간 반응시킨 후 340 nm에서 0분과 3분의 간격으로 측정하여, Δ enzyme activity를 측정하였다. 1 unit의 GPDH activity는 분당 NADH 1.0 nmol의 산화에 해당된다(Kozak and Jensen, 1974). GPDH activity를 측정하기 위해 총 단백질의 함량 또한 조사하였는데, Immunoglobulin G를 표준으로 활용하여 DC protein assay kit (Bio-Rad 500-0016, USA)에서 제공하는 시약 및 프로토콜에 따라 단백질 정량을 실시하였으며(Lowry et al., 1951), 최종 단백질 함량은 microplate reader (Benchmark plus model 680, Bio-rad, USA)에서 750 nm의 흡광도로 측정하였다.

## 통계분석

본 실험의 결과는 SAS ver., 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 일반선형모델(GLM)을 이용하여 분산분석하고 통계적 유의성 검증은 Duncan (1955)의 다중 검정법으로 95% 신뢰수준에서 검증하였다.

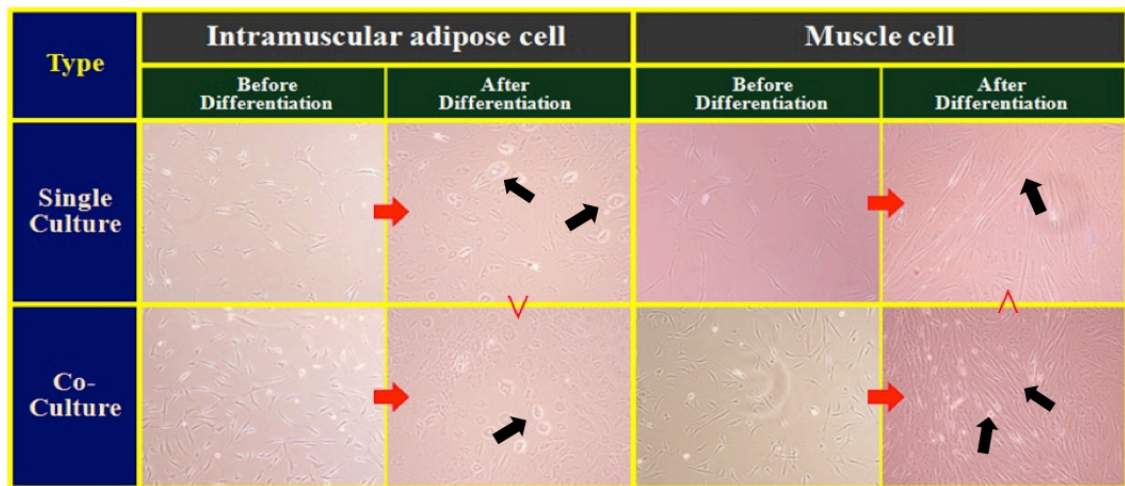
## Results and Discussion

### 단독 및 공동배양에 의한 세포분화의 형태학 및 세포물질 변화

한우 비육우로부터 primary culture하여 분리한 근육 및 지방세포의 단독 및 공동배양에 따른 세포의 형태학적 변화는

Fig. 1과 같다. 비육우의 근내지방세포의 경우, 현미경 상으로 분화 후 지방적이 형성되는 것을 확인할 수 있으며, 특히 공동배양보다 단독배양에서 분화가 더욱 많이 일어났음을 확인할 수 있었다. 비육우의 근육세포의 경우에는 단독배양에서 보다 공동배양에서 근육세포의 분화도가 높은 것으로 현미경을 통해 관찰할 수 있었다. 이러한 배양기법에 따른 형태학적 변화의 차이는 3T3-L1 및 L6 세포주를 이용한 지방 및 근육세포의 단독 및 공동배양의 분화 비교 결과와 일치한다(Choi et al., 2012). 그러나, 세포배양의 경우 형태학적인 조사만으로는 실제 분화도를 객관적으로 평가할 수 없기 때문에 세포 분화의 척도로 판단되는 효소 활성도를 측정하였다.

본 연구에서는 지방세포의 경우 GPDH activity를 측정하였는데, 이 효소는 acetyl-Co A carboxylase, fatty acid synthetase 등과 함께 성숙 지방세포의 분화시기에 증가되는 지방대사 관련효소로 알려져 있다. 특히 GPDH는 지방세포 내에 지방이 축적되기 위해서는 glycerol-3-phosphate가 fatty acyl-CoA와 결합하여 triglyceride를 생성하여야 하는데, 이 glycerol-3-phosphate가 dihydroxyacetone phosphate로부터 합성될 때 관여하는 효소로 지방세포 분화 측정에 이용되는 대표적 지표효소로 알려져 있다(Wise and Green, 1979; Sottile and Seuwen, 2001; Choi, 2011). Table 1에서 나타난 바와 같이 분화배지 처리일(control, 8.97 mmol/mg protein/min)과 비교해 단독(30.28) 및 공동배양(20.83) 모두 GPDH의 활성도가 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가했음을 확인할 수 있어 단독 및 공동배양 모두 지방 세포의 분화가 잘 이루어졌다고 판단할 수 있다. 단독배양의 경우, 형태학적 변화의 결과(Fig. 1)와 유사하게 나타났고, 공동배양 시 측정된 GPDH와 비교했을 때 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높은 수준을 보였는데 이는 세포 분화에 있어서는 공동배양보다 단독배양이 유리하다는 의미를 가진다. 본 연구팀에서 공동배양의 장점 중 하나로 추측되는 것은 생체조건과 유사한—즉 근내지방은 근육 사이에 침착되는 지방이므로 지방과 근육이 공존하는—조건 하에서 보다 정확한 결과 도출이 가능하다는 점이다. 현재의 연구 결과인 공동배양이 지방 분화 측면에서는 단독배양보다 불리하다는 것은 지금까지 수행된 세포배양 연구에서 지방세포 단독 배양 시 측정된 높은 지방세포 분화나 분화촉진 후보물질 즉 insulin (Brindle and Montiminy, 1992), estrogen (Dieudonne et al., 2000), glucocorticoids, triiodothyronine (Gaben-Cogneville et al., 1984; Sztalryd et al., 1989) 등은 실제 생체에서는 분화가 일어나지 않거나, 분화를 유도하더라도 단독배양의 결과보다는 낮은 수준에서 일어났을 가능성을 지적할 수 있다. 본 연구팀이 세포주를 이용하여



**Fig. 1.** Effect of different culture techniques on morphological changes of intramuscular adipocytes and muscle cells. Intramuscular preadipocytes (IP) and muscle satellite cells (MSC) obtained from Hanwoo were grown at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Upon reaching approximately 70% of confluency, the growth medium was replaced with 2% fetal bovine serum/Dulbecco's modified Eagles medium (FBS/DMEM) for both IP and MSC. Intramuscular adipocytes and muscle cells were co-cultured using a 0.4 μm insert membrane. Black arrows indicate lipid droplets for adipocytes and myotubes for muscle cells, respectively. Magnification = 100 x.

발표한 배양기법에 따른 지방세포 분화 정도는 단독 및 공동배양에서 각각 30.9 및 20.7 mmol/mg protein/min으로 현재 연구 결과와 매우 유사한데(Choi et al., 2012), 이것은 비록 세포주와 primary cells이라는 차이에도 불구하고 동일한 연구팀에 의해 동일한 분석법을 이용하였기 때문일 것으로 판단된다. 또한, 미국의 돼지 primary culture 연구(Hausman and Poulos, 2005)에서도 유사한 패턴 결과가 나타난 것으로 미루어볼 때, 이는 종 차이에도 불구하고 공동배양 시 지방 및 근육세포로부터 분비 또는 영향을 받을 것으로 여겨지는 교호물질들의 작용에 의해 지방세포의 분화가 억제되는 것으로 추측된다. 또한, 미국에서 수행된 브란저스 교잡우를 이용한 primary culture 연구에서도 체지방 내 불포화지방산 합성 효소로 알려진 stearoyl-CoA desaturase 발현이 공동배양보다는 단독배양 시 수치적으로 높게 나타나 현재 연구결과와 유사하였다(Choi et al., 2013). 반대로 근육세포에서 분비되는 insulin growth factor (IGF)-1는 preadipocytes의 발달과 분화를 촉진하고(Ramsay et al., 1989), paracrine mediator는 adipocytes 내 pyruvate dehydrogenase 등의 활성을 증가시켰다고 발표하였다(Jarett et al., 1985). 현재 연구결과와 기존 결과를 종합해 볼 때, 지방세포 내 정(+) 또는 부(-)의 영향을 막론하고 공존하는 근육세포는 지방세포의 발달과 분화에 다양한 영향을 미친다는 것을 의미한다.

전술한 바와 같이 현미경 상으로 관찰한 근육세포의 경우 myotubes로 발전하는 단계의 모습을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1), 근육분화의 표지인자로 사용되는 CK activity (Choi et al., 2012) 분석을 통해 단독 및 공동배양에 따른 근육세포의 분화 정도를 비교하였다(Table 1). 근육세포의 분화배지 처리일(control, 0.025 U/mL)과 비교해 단독(0.063) 및 공동배양(0.093) 시 근육세포의 CK activity는 모두 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가했는데, 지방세포와 마찬가지로 근육세포의 형태학적 변화와 일치하였다(Fig. 1). 또한, 지방세포의 분화와는 반대로, 단독배양보다는 공동배양 시 근육세포의 CK activity가 유의적으로( $p < 0.05$ ) 높게 나타났다. 본 연구팀에 의해 수행된 세포주 공동배양 연구에서도 근육세포주를 분화시켰을 때, 지방세포와는 달리 수치적으로는 연구결과 간 차이가 있지만 단독 배양 시 0.044, 공동 배양 시 0.075 U/mL로(Choi et al., 2012), 전체적으로 현재 연구결과와 유사한 패턴을 보였다. 이것은 지방 및 근육세포의 공동배양 시 지방 및 근육세포로부터 분비되는 호르몬 등의 물질들 또는 그러한 물질들로 인한 상호영향을 통해 근육세포의 분화가 영향을 받는 것이 아닌가 추측된다(Hausman and Poulos, 2005; Choi et al., 2013). 근육세포와 같이 공존하는 지방세포는 지방저장, 지질대사 및 당대사 조절 기능 뿐만 아니라 세포 신호전달물질과 호르몬 분비를 통한 세포분화 발현량 조절 기능을 가지고 있음을 고려할 때(Gregoire et al., 1998), 전술한 추측은 매우 근거있는 해석이라고 판단된다. 또한 지방세포에서 분비되는 leptin, adiponectin, interleukin, tumor necrosis factor 등은 인슐린 기능이나 면역체계 조절과 더불어 growth hormone의 분비와 작용에도 영향을 주고, 이 영향을 받은 fibroblast growth factor, transforming growth factor, IGF 등 다양한 growth factor들은 MSC 및 근육세포의 발달과 분화에 관여를 한다고 알려져 있다(Greene and Allen, 1991; Diez and Iglesias, 2003).

**Table 1.** Effect of different culture techniques on differentiation of muscle cells and intramuscular adipocytes isolated from Korean native cattle<sup>z</sup>.

Items	Treatments			SEM
	Control	Single culture	Co-culture	
Concentration of				
GPDH activity (mmol/mg protein/min)	8.97c	30.28a	20.83b	3.114
CK activity (U/mL)	0.025c	0.063b	0.093a	0.0110

GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; CK, creatine kinase; SEM, standard error of the mean.

<sup>z</sup>Intramuscular preadipocytes (IP) and muscle satellite cells (MSC) obtained from Korean native cattle (Hanwoo) were grown at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Upon reaching approximately 70% of confluency, the growth medium was replaced with 2% fetal bovine serum/Dulbecco's modified Eagles medium (FBS/DMEM) for both IP and MSC. Hanwoo intramuscular adipocytes and muscle cells were co-cultured using a 0.4 µm insert membrane. GPDH activities in intramuscular adipocytes and CK activity in Hanwoo muscle cells were measured at 0 (control) and 8 days (single culture and co-culture) after differentiation media, respectively.

a - c: Means in a row with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

현재 연구결과를 종합해 보면 기존의 단독배양기법을 이용한 근육, 지방세포 연구결과들은 근육과 지방세포 간 교호작용을 고려치 않음으로써 세포분화에 있어 근육세포는 과소평가, 지방세포는 과대평가 되었을 가능성이 있음을 보여준다. 따라서, 세포배양, 특히 근육, 지방세포 연구에 있어서는 공동배양기법을 이용하는 것이 생체에 적용가능한 정확한 기초자료 제공이라는 근본적인 목적을 달성할 수 있을 것으로 판단된다. 아울러, 현재의 근육-지방 공동배양 기법의 활용도 개선과 한우 고급육 생산 등 학문적, 산업적 적용을 위해서 향후에는 본 연구결과에서 제시한 효소 발현도 비교 뿐만 아니라 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$ , GPR43 등 지방 및 근육세포 분화관련 gene expression 분석 등을 병행한 세포 분화촉진물질 탐색 연구 등이 필요할 것으로 생각된다.

## Conclusion

본 연구에서는 기존 단독배양 위주로 이루어져온 세포배양 연구의 방법학적 한계의 극복과 한우 고급육 생산 연구에 실질적 자료제공 가능한 대안을 제시하고자 한우 거세비육우의 MSC 및 IP의 primary culture를 실시하고 단독 및 공동배양 기법에 따른 지방 및 근육세포의 분화에 미치는 영향을 비교 조사하였다. MSC 및 IP는 성장배지인 10% FBS/DMEM (1% Pen-Strep solution 및 0.1% amphotericin B 첨가) 하에서 48 h 동안 단독배양 후 5% FBS/DMEM에서 배양하였다. 분화를 위한 단독 및 공동배양에서는 지방 및 근육세포 모두 분화유도물질 처리없이 2% FBS/DMEM으로 배양하였다. 지방 및 근육세포 분화도 측정은 세포 별 형태학적 측정과 GPDH 및 CK 분석을 통해 조사되었다. 형태학적 변화는 근육세포는 단독배양보다 공동배양, 지방세포는 공동배양보다 단독배양의 분화정도가 높은 것으로 육안으로 판단되었다. 세포 내 효소 분석에서는 분화배지 처리일(day 0)과 비교해 단독 및 공동배양 모두 지방세포 내 GPDH activity가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 증가했음을 확인할 수 있었고 단독배양이 공동배양보다 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높은 수준의 GPDH activity를 보였다. 근육세포는 분화배지 처리일(day 0) 기준, 단독 및 공동배양 모두 CK activity가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았으며, 지방세포와는 반대로, 공동배양의 근육세포 내 CK activity가 단독배양에 비해 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높게 나타났다. 이러한 결과는 기존의 단독배양 기법을 활용한 세포분화관련 연구결과가 과소평가(근육세포) 또는 과대평가(지방세포) 되었음을 시사한다. 따라서, 보다 정확한 세포배양 결과 도출을 위해서는 공동배양 기법을 사용해야 함을 의미하며, 향후 다양한 조건과 분화 조절 물질들의 탐색을 위한 공동배양연구나 지방 및 근육세포 분화관련 gene expression 분석 등을 병행한 세포 분화촉진 물질 탐색 연구 등이 필요할 것으로 생각된다

## Acknowledgements

이 논문은 2016학년도 대구대학교 학술연구비(연구년과제) 지원을 받았으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. Annual Review of Nutrition 12:207-233.
- Brindle PK, Montminy MR. 1992. The CREB family of transcription activators. Current Opinion in Genetics and Development 2:199-204.
- Choi CW. 2011. Sera taken from aged Korean native steers increase adipocyte differentiation. Journal of Agriculture and Life Science 45:85-92.

- 
- Choi CW, Baek KH, Smith SB, Kim YH, Ford LA, Kim SJ, Oh YK, Kim KH, Kang SW, Nam IS, Lee BS. 2007. Screening of media conditions to establish optimum conditions for 3T3-L1 cells co-cultured with L6 cells. *Proceedings of Animal Science and Technology*, Chungang University, Anseong, Korea.
- Choi CW, Cho WM, Yeon SH, Hwangbo S, Song MK, Park SK, Baek KH. 2012. Comparison between single and co-culture of adipocyte and muscle cell lines in cell morphology and cytosolic substances. *Journal of Animal Science and Technology* 54:103-109. [in Korean]
- Choi SH, Chung KY, Johnson BJ, Go GW, Kim KH, Choi CW, Smith SB. 2013. Co-culture of bovine muscle satellite cells with preadipocytes increases PPAR $\gamma$  and C/EBP $\beta$  gene expression in differentiated myoblasts and increases GPR43 gene expression in adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24:539-543.
- Chung KY, Park SK, Chung HJ, Choi CB. 2001. Screening of media components to establish optimum conditions for the differentiation of Hanwoo adipocytes. *Korean Journal of Animal Science and Technology* 43:65-74. [in Korean]
- Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, 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 gamma2. *Endocrinology* 141:649-656.
- Diez J, Iglesias P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European Journal of Endocrinology* 148:293-300.
- Duncan DB. 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, 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. *Biochemica et Biophysica Acta* 805:252-260.
- Greene EA, Allen RE. 1991. Growth factor regulation of bovine satellite cell growth *in vitro*. *Journal of Animal Science* 69:146-152.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Review* 78:783-809.
- Hamid MMA, Park HY, Choi CW. 2018. Comparison of *in vitro* fermentation incubated with different levels of Korean corn grains with total mixed ration as a basal. *Korean Journal of Agricultural Science* 45:419-427.
- Hausman GJ, Poulos SP. 2005. A method to establish co-cultures of myotubes and preadipocytes from collagenase digested neonatal pig semitendinosus muscles. *Journal of Animal Science* 83:1010-1016.
- Ishida Y, Taniguchi H, Baba S. 1988. Possible involvement of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 in proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151:1122-1127.
- Jarett L, Wong E, Macaulay S, 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, Sugimoto E. 1990. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation from preadipocyte to adipocyte, of 3T3-L1 cell. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: physiology* 96:323-326.
- Kim DH, Park HY, Choi CW. 2017. Comparison of in vitro ruminal fermentation between different originated corn grains. *Korean Journal of Agricultural Science* 44:541-548. [in Korean]
- Kozak LP, Jensen JT. 1974. Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 249:7775-7781.
- Lee SC, Kim DW, Lee HJ, Kim JW, Hong SG, Chung YH. 1997. Differentiation of adipose stromal-vascular cells from Korean native steers in culture. *Korean Journal of Animal Science and Technology* 39:415-422. [in Korean]
- Lee SM, Jeoung YH, Hwang SH, Park HY, Yoon DH, Moon SJ, Chung ER, Kang MJ. 2005. Differentiation of Hanwoo intramuscular preadipocytes. *Journal of Animal Science and Technology* 47:913-918. [in Korean]
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Oh YS, Cho SB, Baek KH, Choi CB. 2005. Effects of testosterone, 17 $\beta$ -estradiol, and progesterone on the differentiation of bovine intramuscular adipocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18:1589-1593.
- Ramsay TG, White ME, Wolverson CK. 1989. Insulin-like growth factor 1 induction of differentiation of porcine preadipocytes. *Journal of Animal Science* 67:2452-2459.
- Safonova I, Darimont C, Amri EZ, Grimaid P, Ailhaud G, Reichert U, Shroot B. 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 104:201-211.
- Sottile V, Seuwen K. 2001. A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Analytical Biochemistry* 293:124-128.
- Sztlryd C, Levacher C, Picon L. 1989. Acceleration by triiodothyronine of adipose conversion of rat preadipocytes from two adipose localizations. *Cellular and Molecular Biology* 35:81-88.
- Wise LS, Green H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* 254:273-275.