

# Retinoic Acid가 돼지 지방세포의 분화에 미치는 영향

김혜림 · 정정수

충북대학교 농업생명환경대학 축산학과

## Effects of Retinoic Acid on Differentiation of Pig Preadipocytes

Hye-Rim Kim and Chung Soo Chung

Department of Animal Science, Chungbuk National University

### ABSTRACT

The current study was undertaken to determine the effects of retinoic acid (RA) on differentiation of pig preadipocytes. Pig preadipocytes were isolated from the backfat of new-born pigs with collagenase digestion. The isolated cells were seeded on MEM/F12 media and washed one day after seeding (day 0). Ten  $\mu$ M RA treated on day 0~2, day 2~4 and day 4~6 decreased differentiation of pig preadipocytes ( $P < 0.01$ ) with the highest inhibition found on day 0~2 treatment. One, 5 and 10  $\mu$ M of RA showed inhibitory action on differentiation in dose-dependent manner. The inhibitory effects of RA on proliferation of pig preadipocytes were smaller, compared to the effects on differentiation.

**(Key words :** Retinoic acid, Pig, Preadipocytes, Differentiation)

### I. 서 론

돼지는 다른 가축에 비해서 사료에너지로부터 체에너지로의 전환율이 높아서 피하지방을 많이 축적하게 되고, 한편 과다지방축적은 돼지의 사료효율을 저하시킨다. 그래서 오래전부터 돼지의 지방축적억제는 축산학 여러분야에서 중요한 과제로 인식되어 왔다. 최근에 와서 더욱 지방축적억제에 대한 요구가 큰데, 그 이유는 동물성지방 과다섭취에 의한 성인병발생의 우려 때문이다. 지금까지 육종과 영양분야의 지식에 의해 지방축적억제에 상당한 진전을 가져왔으나 최근에 와서 conjugated linolic acid (CLA) 또는 retinoic acid (RA) 등 영양소에 의한 지방축적조절이 중요시 되고 있다(Thiel-Cooper 등 2001; Ribot 등 2004; 문과 정, 2004). 이 중에서 RA는 가축의 지방축적과의 연관성이 있음이 알려졌다. 즉 일본화우에서 혈중 비

타민 A (retinoic acid) 농도가 낮은 소가 근내지방이 많았다는 사실이다(Torii 등, 1996). 한편 세포수준에서도 RA의 작용이 보고되었는데, RA의 생물학적인 작용이 RA가 retinoic acid receptor (RAR) 또는 retinoic X receptor (RXR)에 결합함으로써 일어나고, RA에 의해 활성화된 RAR-RXR 또는 RXR-RXR dimer가 RA의 target gene의 발현을 조절한다고 알려져 있다(Mangelsdorf와 Evans, 1995).

지방조직은 지방세포로 이뤄져 있기에 지방조직 축적의 조절은 지방세포의 생성(분화)를 조절하는 것이 효율적인 것으로 여겨진다. 지금까지 많은 RA관련 연구들이 쥐나 생쥐에서 유래한 cell line을 이용해서 수행되었으나(Stone과 Bernlohr, 1990; Xue 등, 1996; Boone 등, 2000), 돼지의 지방전구세포를 이용한 연구는 드문 편이다. Suryawan과 Hu(1997)는 RA가 지방전구세포의 분화에 미치는 작용을 구명했

Corresponding author : Chung Soo Chung, Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Tel : 582-43-261-2549, Fax : 582-43-276-3146, E-mail : cschung@chungbuk.ac.kr

으나 RA농도에 의한 차이 그리고 RA가 세포의 증식에 미치는 영향은 구명하지 않았다.

따라서 본 연구는 갓난 돼지의 지방조직에서 분리한 지방전구세포 (preadipocyte)를 배양하는 중에 RA를 처리해서 RA가 세포분화와 증식에 미치는 영향을 더 명확하게 구명하기 위해 수행하였다. 본 연구의 결과는 앞으로 RA가 돼지의 지방축적억제제로 사용될 경우 기초자료를 제공해 주는 데도 의의가 있을 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양

지방전구세포 (preadipocytes)는 신생자돈의 등지방 조직에서 분리해서 배양했는데, 세포분리 및 배양은 Suryawan 등(1997)의 방법을 따르면서 본 연구실에서 변경해서 확립한 방법(문과정, 2004)을 이용했다. 본 연구에서 사용한 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다.

생후 1~2일령 된 신생 암돼지를 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>) 기체를 주입하여 질식사 시킨 후 등지방 조직을 떼어냈다. 떼어낸 지방조직을 잘게 세절한 후 collagenase와 함께 shaking water bath에서 40분 동안 배양한 후 250 μm nylon screen으로 여과해서 소화 안 된 지방조직을 제거했다. 여과 후 원심분리해서 지방전구세포가 들어있는 침전물을 KRB 용액으로 분산해서 다시 원심분리 후 75 μm nylon screen으로 여과해서 지방전구세포를 수집했다. 10% FBS를 함유한 DMEM/F-12를 이용하여 6-well plate에 1×10<sup>6</sup> cell/well을 접종했다. 접종한 다음날 적혈구 등을 제거하기 위해 세척한 후 분화유도(day 0)를 위해 insulin (600 ng/ml), transferrin (1 ng/ml) 및 hydrocortisone (500 ng/ml)을 함유한 5% FBS가 함유된 DMEM/F-12를 세포배양이 끝날 때까지 사용했으며 배지는 2일마다 교체했다.

### 2. 배양 중인 지방세포에 retinoic acid (RA) 처리

6마리의 신생 암돼지의 지방조직에서 분리한 지방전구세포를 본 실험에 사용했는데, 본 실험에 사용한 RA는 1 μM, 5 μM와 10 μM 이었으며 대조구로는 이들 RA를 녹이는 같은 부피의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 처리했다. RA가 지방전구세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해서 지방전구세포를 세척한 날(day 0)부터 지방전구세포가 배양접시에 100% confluent 시기인 day 4까지 4일 동안 10% FBS가 함유된 배지를 사용하였으며 배지를 2일 간격으로 바꾸어 주면서 처리하였으며, 세포 수는 처리 종료 시(day 4)에 측정하였다. RA가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해서 세포를 세척한 날(day 0)부터 day 2까지 2일 동안 처리하였으며, 지방전구세포의 분화유도를 위해 insulin (600 ng/ml), transferrin (1 ng/ml) 및 hydrocortisone (500 ng/ml)을 함유한 5% FBS가 함유된 DMEM/F-12 배지를 세포배양이 끝날 때까지 사용했으며 배지는 2일마다 교체하였고, 세포 분화는 처리 종료 시(day 9)에 측정하였다.

### 3. 지방세포 분화 및 세포수 측정

돼지 지방전구세포의 성숙세포로의 분화 정도는 배양 중인 세포의 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성도를 측정함으로써 구명했는데 기본적으로는 Wise와 Green (1979)의 방법을 사용했다. GPDH는 dihydroxyacetone phosphate가 glycerol-3-phosphate로 바뀌는데 관여하는 효소인데 이 glycerol-3-phosphate는 triglyceride 합성의 원료가 된다. 그리고 triglyceride는 성숙 지방세포에서 만들어지기 때문에 GPDH는 지방전구세포의 성숙 지방세포로의 분화 정도를 측정하는데 사용된다. 그리고 세포수의 측정은 세포내의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt (Roche kit 이름은 wst-1)의 분해 정도에 의해 측정하였다.

### 4. 통계처리

본 실험의 통계처리는 SAS Package (Version

9.1)를 이용하여 분석하였으며, GLM (Generalized Linear Model) 분석을 통하여 각 요인들에 대한 분산 분석을 실시하고, 대조구와의 비교 검증을 위하여 Dunnett's t-test 검정을 하였다.

### III. 결과 및 고찰

본 연구는 RA가 돼지 지방세포의 분화에 미치는 작용을 구명하고자 신생자돈의 지방조직에서 분리한 지방전구세포 (preadipocyte)를 배양하는 중에 RA의 처리시기 및 처리농도를 달리 해서 세포분화에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 1은 투여시기에 따른 RA가 지방세포 분화에 미치는 작용을 보여주고 있는데 배양후기 (day 4-6) 보다는 배양초기(day 0~2)에 RA를 처리하는 것이 세포분화의 억제정도가 더 컸다. Suryawan과 Hu (1997)도 비슷한 결과를 보고했는데 cell washing한 후 1, 4, 6, 7, 8일에 RA에 처리한 것을 비교했는데 1일에 처리했을

때가 세포분화 억제작용이 가장 컸다. 이들은 더 나아가서 RA의 세포분화 억제작용은 세포 배양 초기 24시간만 처리해도 충분히 나타난다고 했으며, 본 연구의 결과도 비슷한 결과를 나타냈다 (Fig. 2). 위의 사실들은 다른 물질과는 달리 RA는 세포배양 초기에 단기간동안 처리에 의해서 분화억제작용을 크게 나타냄을 말해준다. 이와 관련해서 RA의 분화억제작용이 세포의 증식을 억제해서 결국 분화를 억제하는지를 구명하기 위해서 RA가 세포증식에 미치는 작용을 조사했는데 Fig. 3에서 보는 대로 RA가 세포의 증식도 억제했지만 분화억제에 비해서 억제정도가 워낙 작았다. 이 사실은 RA는 세포의 증식 (proliferation) 보다는 분화 (differentiation) 단계에서 그 억제작용을 나타낸다고 여겨진다.

RA가 어떤 작용기전에 의해 돼지 지방전구세포의 분화를 억제하는지에 대한 것은 확실하지 않다. cell line인 3T3-L1 cell을 이용한 실험에서 Kawada 등 (2000)은 RA가 peroxisome

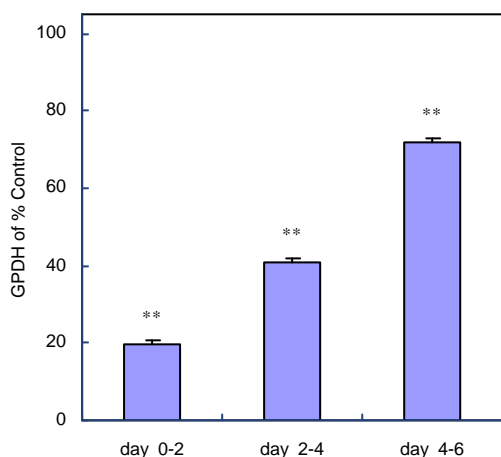


Fig. 1. Effects of retinoic acids (RA) on differentiation of porcine preadipocytes. The cells were treated with 10  $\mu$ M RA for two days during differentiation periods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control. Cell differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. Values are means  $\pm$  SE, difference from control; \*\*,  $p < 0.01$ .

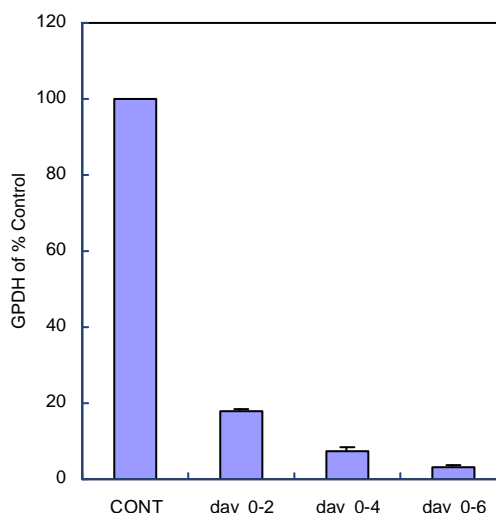


Fig. 2. Effects of retinoic acids (RA) on differentiation of porcine preadipocytes. The cells were treated with various treatment periods during differentiation periods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity.

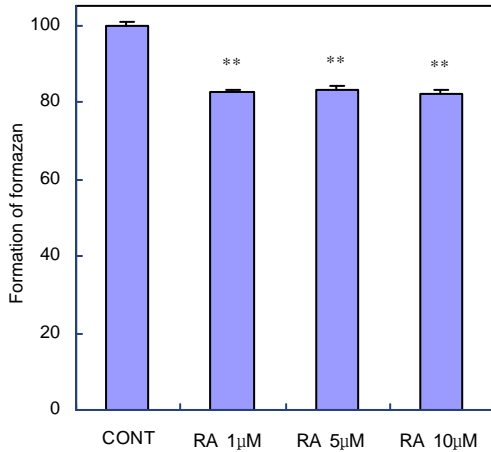


Fig. 3. Effects of retinoic acids (RA) on proliferation of porcine preadipocytes. The cells were treated with various RAs for two days during proliferation periods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell proliferation was determined by measuring formation of formazan. Values are means ± SE, difference from CONT ; \*\*, p<0.01.

proliferator-activated receptor- $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )와 CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ (C/EBP $\alpha$ )의 발현을 억제해서 세포분화를 억제했다고 했다. 한편 Brandebourg와 Hu (2005)는 돼지지방전구세포를 이용한 실험에서 RA의 세포분화 억제작용은 RAR을 활성화시키고, PPAR $\alpha$ 와 RXR의 유전자 발현을 억제함으로써 가능했다고 보고했다. 그런데 이런 사실들이 본 연구에 나타난 RA의 세포분화 억제작용이 배양초기에 주로 나타나는 것을 잘 설명해주는지는 의문시된다.

Fig. 4에는 RA 처리농도에 따른 돼지 지방세포분화 억제작용이 나타나 있다. RA의 농도가 1µM, 5µM 및 10µM로 높아질수록 분화억제정도가 컸다. Suryawan과 Hu (1997)는 생리적 RA의 농도 (0.1~10 nM)에서는 세포분화억제가 나타나지 않았음을 보고했고 그 이후 실험에서는 10 µM 농도에서만 RA의 작용을 조사했다. 본 연구에서 RA의 농도가 증가할수록 억제정도가 컸던 사실은 본 실험의 측정조건이 적절했음을

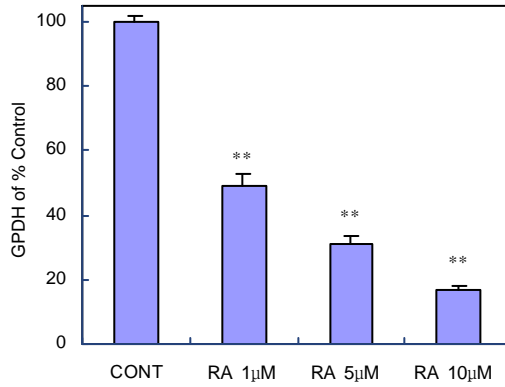


Fig. 4. Effects of retinoic acids (RA) on differentiation of porcine preadipocytes. The cells were treated with various RAs for two days during differentiation periods. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as control (CONT). Cell differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity. Values are means ± SE, difference from CONT ; \*\*, p<0.01.

나타낸다. Fig. 5에는 RA의 농도에 따른 세포분화에 미치는 영향이 현미경사진으로 나타나 있는데 Fig. 4의 결과를 잘 반영하고 있다. 본 연구에서 RA가 돼지 지방전구세포의 분화를 억제했음을 확인했는데, RA가 돼지의 지방축적 억제에 이용될 가능성은 다음과 같다. 즉 지방전구세포로부터 성숙세포로의 분화가 많이 일어나는 자돈시절에 사료에 RA를 섞어 급여해서 과연 사료중의 RA가 지방축적을 감소시키는지를 구명하는 것이다. 다른 가능성은 일본 화우의 경우처럼 혈중 RA 농도가 돼지의 체지방 축적상태와 상관관계가 있는지를 조사하는 것이다.

본 연구내용이 RA가 주로 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 작용에 관한 것이었고, 증식에 미치는 작용은 Fig. 3에 나타난 것 뿐이었다. 앞으로 증식에 미치는 작용에 대해서도 심도있는 연구가 수행되어야 할 것으로 여겨진다.

본 연구의 결과를 요약하면, RA는 배양중인 돼지 지방전구세포의 분화를 크게 억제했는데

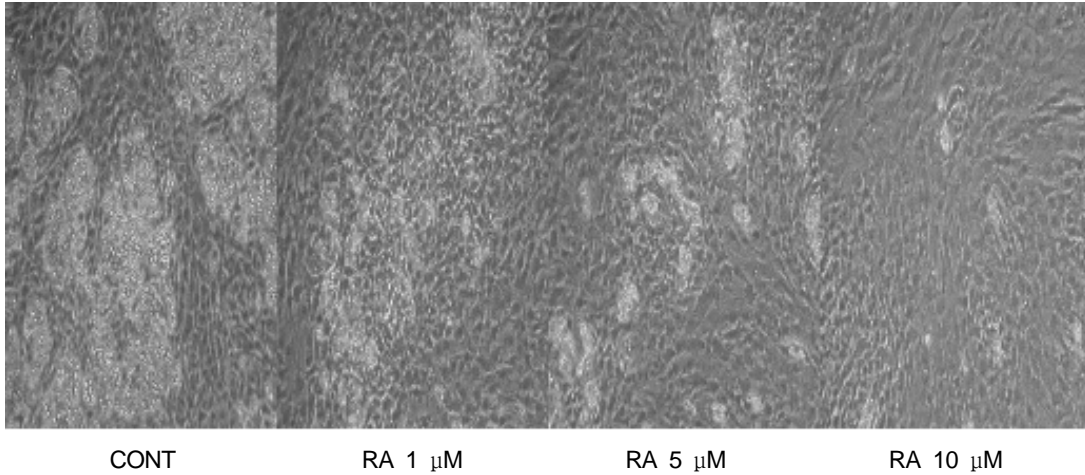


Fig. 5. Micrographs showing differentiation of pig preadipocytes cultures treated with various concentrations of retinoic acid.

억제 작용은 배양초기에 더 컸다. 앞으로 RA가 돼지 지방축적억제를 위해 사용될 가능성을 염두에 둘 경우 유전자발현조절에 관한 연구가 수행되어야 할 줄 여겨진다.

#### IV. 요약

본 연구는 retinoic acid (RA) 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 작용을 구명하기 위해서 수행하였다. 지방전구세포는 갓난돼지 등지방조직을 collagenase 처리에 의해 분리했다. 분리된 세포는 MEM/F12 media를 이용해서 seeding 했고, 그 다음날 세포를 세척했다(day 0). 10 μM의 RA를 day 0~2, day 2~4, 및 day 4~6에 처리한 결과 세포분화를 억제했는데 ( $P < 0.01$ ) day 0~2에 처리한 것이 가장 억제작용이 컸다. 1, 5, 및 10 μM의 RA의 처리했을 때 농도에 비례해서 분화를 억제했다. RA가 돼지지방전구세포의 증식억제작용은 분화억제작용에 비해서 작았다.

#### V. 사사

이 논문은 2006년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

#### VI. 인용문헌

1. Boone, C., Mourot, J., Gregoire, F. and Remacle, C. 2000. The adipose conversion process: Regulation by extracellular and intracellular factors. *Reprod. Nutr. Dev.* 40. 325-358.
2. Brandebourg, T. D. and Hu, C. Y. 2005. Regulation of differentiating pig preadipocyte by retinoic acid. *J. Anim. Sci.* 83:98-107.
3. Kawada, T., Kamei, Y., Fujita, A., Hida, Y., Takahashi, N., Sugimoto, E. and Fushiki, T. 2000. Carotenoids and retinoids as suppressors on adipocyte differentiation via nuclear receptors. *Biofactors* 13:103-109.
4. Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptor. *Cell* 83:841-850.
5. Ribot, J., Felipe, F., Bonet, M. L. and Palou, A. 2004. Retinoic acid administration and vitamin A status modulate retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor alpha levels in mouse brown adipose tissue. *Mol Cell Biochem.* 266:25-30.
6. SAS. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide Volume 1. SAS institute Inc., Cary, NC., USA
7. Stone, R. L. and Bernlohr, D. A. 1990. The molecular basis for inhibition of adipose

- conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation*. 45:119-27.
8. Suryawan, A. and Hu, C. Y. 1997. Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J. Anim. Sci.* 75:112-117.
  9. 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.
  10. Thiel-Cooper, R. L., Parrish, F. C., Sparks, J. C., Wiegand, B. R. and Ewan, R. C. 2001. Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 79:1821-1828.
  11. Torii, S., Matsui, T. and Yano, H. 1996. Development of intramuscular fat in Wagyu beef cattle depends on adipogenic or antiadipogenic substances present in serum. *Anim. Sci.* 63:73-78.
  12. Wise, L. S. and Green, H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate in adipose conversion of 3T3 cell. *J. Biol. Chem.* 254:273-275.
  13. Xue, J. C., Schwarz, E. J., Chawla, A. and Lazar, M. A. 1996. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol. Cell. Biol.* 16:1567-1575.
  14. 문현석, 정정수. 2004. Conjugated Linolic Acid (CLA) 이성체가 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 영향. *한국동물자원과학회*. 46:967-974.  
(접수일자 : 2008. 1. 10. / 수정일자 : 2008. 6. 5. / 채택일자 : 2008. 6. 17.)