돼지 고기의 아나볼릭 스테로이드가 Myogenic Satellite Cell의 증식과 분화에 미치는 영향

이동목 · 이기호¹ · 전용필² · 전태훈³ · 최인호*

영남대학교 생명공학부 및 소유전체연구소재은행, ¹울지대학교 생화학교실

²성신여자대학교 생물학과, ³고려대학교 생명과학대학

Effects of Anabolic Steroids of Pork on Proliferation and Differentiation of Myogenic Satellite Cell

Dong-Mok Lee, Ki-Ho Lee¹, Yong-Pil Cheon², Taehoon Chun³, and Inho Choi*

School of Biotechnology, Yeungnam University and Bovine Genome Resources Bank, Gyeongsan 712-749, Korea

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology and Medical Sciences Research Institute, Eulji University, Daejeon 301-746, Korea

²Department of Biology, Sungshin Womens University, Seoul 136-742, Korea

³School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

Sex steroids are known to be involved in skeletal muscle development (anabolic effect) and are frequently used in medicines. It has been known that pork contains a variety of steroids that are mainly synthesized in the gonads (testis and ovary). Thus, the present study was conducted to evaluate the effects of anabolic steroids of pork on the proliferation and differentiation of myogenic satellite cells (MSC). Three different methods (M1, M2, and M3) were developed for the isolation and purification of steroids from porcine tissues. Among three extraction methods that we developed, M3 was the best method with respect to the quantities of steroids and the induction of MSC proliferation. Hormonal analysis showed that the steroid hormone levels were the highest in muscle and fat of intact male than those of castrated males and females. In addition, the highest serum levels of nandrolone and testosterone were detected in intact males, whereas estrone and 17 β -estradiol levels were similar in the entire experimental serum samples. Expression of androgen receptor (AR), myoD, desmin, and myogenin in bovine muscle cells were significantly up-regulated by the treatment of steroid extracts. The highest increases of myogenin and AR mRNA abundance were observed in the MSCs treated with M3 extract ($p < 0.001$). Altogether, the present research showed the positive effect of steroids on MSC proliferation and differentiation in vitro. These results would certainly imply a beneficial effect of pork consumption on human muscle development.

Key words: pig, anabolic steroid, myogenic satellite cell, proliferation, pork, testis

서론

경제발달과 식생활 양식의 변화에 따라 육류의 소비가 급격하게 증가하고, 소비 형태도 양적인 면에서 질적인 면으로 바뀌어 가고 있다. 좀 더 구체적으로 살펴보면, 1인당 축산물 연간 소비량은 육류의 경우 1985년 14.4 kg에 불과하던 것이 2007년 35.8 kg으로 증가하였다(농협중앙회, 2007). 그 중 돼지고기는 8.4 kg에서 19.2 kg으로 117%

가 늘어났다. 그러나 이 같은 축산물 소비는 지난 2004년 이후 주춤하는 경향을 보이고 있어 축산물 소비촉진을 위한 다양한 노력이 요구된다(Lee *et al.*, 2009). 돼지에는 불포화지방산, 필수지방산, 비타민 및 각종 미네랄 등이 풍부하여 동맥경화, 중금속해독작용, 빈혈과 피로회복 등에 육류 및 가공식품으로 많이 이용되고 있다(Barton Pai *et al.*, 2002; Rho and Han, 2007). 또한 돼지의 경우 다른 포유동물에서 일반적으로 만들어지지 않는 다양한 특이 스테로이드를 생산해 내는 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 2009). 수태지의 정소에서 생성되는 웅취 성분인 androstenone과 같이 돈육의 품질 저하요인이 되는 스테로이드도

*Corresponding author: Inho Choi, School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea. Tel: 82-53-810-3024, Fax: 82-53-810-4657, E-mail: inhochoi@ynu.ac.kr

있지만 nandrolone(주로 정소에서 생성)과 19-norandrostenedione(주로 난소에서 생성)과 같은 아나볼릭 스테로이드도 대량 생산되는 것으로 알려져 있다(De Wasch *et al.*, 2001; Khalil *et al.*, 1988; Raeside *et al.*, 1989; Schwarzenberger *et al.*, 1993). Nandrolone(혹은 19-nortestosterone)은 남성 호르몬인 testosterone과 그 구조가 유사하지만 근육 및 골격을 발달시키는 아나볼릭(anabolic) 효과가 testosterone과 비교해 10배 정도 강한 스테로이드이다(Bergink *et al.*, 1985; Saartok *et al.*, 1984). 이렇게 돼지에서만 특이하게 일어나는 현상에 대한 자세한 연구가 요구된다. 또한 이렇게 돼지의 생식샘에서 만들어진 아나볼릭 스테로이드는 돼지고기에 축적되며, 돼지고기를 섭취한 사람들의 소변에서 이 스테로이드의 대사 물질이 검출된다고 보고되었다(Debruyckere and Peteghem, 1991; De Wasch *et al.*, 2001; Fuh *et al.*, 2004). 한편 화학적으로 합성된 nandrolone은 운동선수의 경기력 향상, 노화방지, 빈혈 치료제, 골다공증 치료제, 소비성근육질환(AIDS 환자의 경우) 치료제, 남성 생식기능 저하 치료제, 피임약의 성분 등으로 사용되어 왔다(Amory and Bremner, 2000; Bhasin *et al.*, 1997; Fairfield *et al.*, 2001; Sheffield-Moore *et al.*, 2006). 그러나 운동선수와 일반인들이 근육강화와 경기력 향상을 위해 과도하게 사용할 경우, 고지혈증, 정자 수 감소, 여성의 남성화 등의 부작용이 발생하여 사용이 금지되거나 제한되는 이중적인 성격을 가진 물질이다(Ayotte, 2006). 위에서 언급한 것처럼 인간의 경우 nandrolone의 과다 사용시 여러 가지 부작용이 나타남에도 불구하고 이러한 nandrolone이 대량 생산되는 돼지의 경우에는 지금까지 큰 문제 없이 진화해 올 수 있었다는 것은 흥미로운 사실이다. 지금까지 이러한 아나볼릭 스테로이드가 사람의 근육형성과 발달에 영향을 미치는 요인에 대하여 다양한 연구들이 세포 주(cell line)를 중심으로 이루어져 왔다(Chen *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2008). 그러나 본 연구에서는 세포주에 비해 상대적으로 *in vivo* 와 좀 더 유사한 동물세포의 초대배양(primary culture) 방법을 통해 근육위성세포에 대한 연구를 실시하였다. 따라서, 본 연구에서는 돼지고기에 존재하는 천연 아나볼릭 스테로이드를 분리하고 정제하여 근육의 증식 및 분화에 미치는 영향을 조사하고 이를 통해 돼지고기의 섭취가 인체의 건강에 미칠 수 있는 긍정적인 효과를 증명하고, 이에 따른 돼지고기의 소비 촉진 효과를 얻기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

공시 재료는 (주)삼세 도축장(경상북도 영천시)에서 랜드레이스 중 돼지(암컷; 180-190일령, 평균 체중 105 kg (100-110 kg), 수컷; 170-180일령, 평균 체중 112 kg(110-

115 kg), 거세 수컷; 175-185 일령, 평균 체중 112 kg(110-115 kg)의 근육, 지방, 혈액을 암, 수, 거세 수돼지로부터 각각 5개씩 채취하였다. 정소는 도축한 170-180일령 수돼지(평균 체중 110 kg) 랜드레이스 중 10마리를 공시하였다. 돼지 정소에서 가장 효율적으로 스테로이드 호르몬을 분리 정제하기 위하여 부정소 및 정소의 상피조직은 모두 제거하고 10-30 g 크기로 잘라서 분석 전까지 -20°C에 보관하였다.

다양한 추출방법을 활용한 아나볼릭 스테로이드 분리, 정제

분리한 정소는 Fig. 1과 같이 처리하여 스테로이드 호르몬을 분리 및 정제하였다. 스테로이드 호르몬을 추출하기 위하여 정소 조직 10 g당 클로로포름/메탄올(=50/50, v/v) 혼합용액을 100 mL 비율로 첨가하여 3분 동안 균질화 하였다. 균질화가 끝난 후 Whatman filter paper No.2(Whatman International, Maidstone, UK)를 이용하여 여과하였다. Method 1(M1)은 0.9% 생리 식염수용액을 동량 첨가하여 가볍게 흔들어 준 뒤 약 10분간 정치하였다. 분리된 아래층을 회수하고 회전식 감압 농축기(EYELA, Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압하여 농축하였다. Method 2(M2)는 여과액을 회전식 감압 농축기로 농축 후 남은 용액의 동량으로 85% 에탄올과 5 M NaOH 용액 첨가하고 80°C에서 45분간 중탕 후 상온으로 식혔다. 이 용액에 6 N 황산용액을 첨가하여 pH 2-3으로 조정하고, 3배 양의 에테르를 첨가 후 상층액을 회수하여 회전식 감압 농축기로 감압하여 농축하였다. Method 3(M3)은 M1으로 얻어진 아나볼릭 스테로이드를 M2로 추가 정제한 것으로써, 0.9% 생리 식염수용액을 동량으로 첨가하여 가볍게 흔들어 준 뒤 약 10분간 정치하고 아래층을 회수하였다. 회수한 물질을 회전식 감압 농축기로 농축 후 남은 용액의 동량으로 85% 에탄올과 5 M NaOH 용액 첨가하고 80°C에서 45분간 중탕 후 상온으로 식혔다. 이 용액에 6 N 황산용액으로 pH를 2-3으로 조정하고 에테르를 3배의 양으로 첨가한 후 상층액을 회수하여 회전식 감압 농축기로 감압하여 농축하여 사용하였다. 근육과 지방은 각각 5 g씩 M3를 이용하여 스테로이드를 분리, 정제하였다. 또한 혈중 스테로이드를 조사하기 위하여 도축 후 개체 별 혈액을 채취하고 원심분리를 이용하여 혈청을 분리하고 4°C에 보관 후 즉시 사용하였다.

호르몬 분석

3가지 방법(M1, M2와 M3)으로 돼지 정소로부터 얻어진 아나볼릭 스테로이드 호르몬의 농도 분석은 testosterone, estrone, 17 β -estradiol, androstenedione ELISA(DRG International, Inc., Marburg, Germany), 19-nortestosterone EIA (Euro-diagnostica, Arnhem, Netherlands)를 이용하여 450 nm 파장의 ELISA 측정기(Microplate Autoreader, Bio-Rad,

Fig. 1. Extraction and purification process.

USA)로 각 샘플당 2반복하여 측정하였다.

근육 위성세포(myogenic satellite cell) 분리 및 배양

근육은 (주)삼세 도축장에서 한우 수소(24-26개월, 550-600 kg)를 도축 해체되는 과정 중 다리 근육을 채취했다. 근육위성세포의 분리는 Lee 등(2007)의 방법을 이용하였다. 채취된 근육은 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고 지방과 결합조직 등을 clean bench에서 제거하였다. 근육조직은 0.5-1 mm³ 조각의 크기로 절단하고 0.25% trypsin-EDTA(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)용액에 넣어 37°C 항온기에 2시간 동안 반응하였다. 반응 후 조직 혼합물은 4°C에서 3분 동안 원심분리(90 g)하고 상층액을 40 µm cell strainer(BD Falcon, NC, USA)로 여과하였다. 여과된 부유물은 4°C에서 20분간 원심분리(1,000 g)한 후 상층액을 제거하고 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) + 10% FBS(fetal bovine serum; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)가 첨가된 배양액을 첨가 후 4°C에서 5분간 원심분리(1,000 g)하고 상층액을 제거하였다. 회수된 세포 부유물은 DMEM + 10% FBS첨가된 배양액을 첨가 후 100 mm dish에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

24시간 후 DMEM으로 1회 세척 후 새로운 DMEM + 10% FBS로 교환해준 뒤 2-3일 간격으로 교환해 주었다.

증식능의 측정

DMEM + 10% FBS가 첨가된 6-well 배양접시에 1×10⁵ cells/well의 세포를 넣고 세포의 안정화를 위하여 2시간 동안 배양하였다. 그 후 추출방법(M1, M2, M3)에 따른 아나볼릭 스테로이드를 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10 µg/mL의 농도로 각각 첨가된 배양액으로 교체하고 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 회수된 세포를 세포 수 측정기(hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 측정하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

추출방법에 따라 추출된 스테로이드를 첨가하여 근육위성세포를 7일 동안 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 세척 후 TRIzol™ reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 mL을 100 mm 배양접시를 첨가한 후 세포를 수집하고, sonicator를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 그 후, 4°C에서 10분간 원심분리(10,000 g)하여 상층액을 회수하였다. 얻어진 상층액에 클로로포름(Sigma, St. Louis, MO, USA)

200 μ L를 첨가하고 혼합한 후, 4°C에서 10분간 원심분리(10,000 g)하여 다시 상층액을 취하고, 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가 후 원심분리(10,000 g)하여 RNA pellet를 획득하였다. 획득된 RNA pellet은 70% 에탄올을 이용하여 세척한 후 건조하고, diethylpyrocarbonate(DEPC; Sigma)를 처리한 멸균증류수에 녹였다. 추출된 RNA는 ND-1000 spectrophotometer(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 농도를 측정하였고, 1.2% agarose gel에서 total RNA상태를 확인하였다. 유전자 발현분석을 위하여 추출된 total RNA는 cDNA kit(Superscript II RNase-H Reverse transcriptase; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Total RNA 1 μ g에 oligo-dT primer, 10 mM dNTP를 첨가하고 DEPC를 처리한 증류수로 총 12 μ L가 되도록 하였다. 65°C에서 5분간 변성 후 즉시 얼음 위에서 냉각 후 5 $\times$ first strand buffer 4 μ L, 0.1 M DTT 2 μ L, RNase out(RNase inhibitor, Takara, Japan) 1 μ L, Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 μ L를 첨가하여 42°C에서 50분간 반응시킨 후, 70°C에서 15분간 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화 시킨 후 real time PCR의 주형으로 사용하였다.

Real time PCR을 통한 유전자 발현분석

합성된 cDNA 0.2 μ g을 주형으로 2 $\times$ PCR Master Mix (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix; ABI, Warrington, UK), 증류수, 각각의 primer set(Table 1)을 넣어 총 20 μ L으로 하여 7500 Real time PCR system(Applied Biosystems, Warrington, UK)을 통하여 분석하였다. 각 PCR 반응은 95°C에서 10분간 예비 변성한 후 denaturation 시간은 95°C에서 33초, annealing 시간은 33초, extension 시간은 72°C에서 33초로 하였고, annealing temperature는 유전자 별로 Table 1에서와 같다. PCR 반응 종결 후 melting curve 작성을 통하여 유전자 증폭의 정확성을 재확인하였

다. 유전자 발현양의 내부 보정을 위하여 GAPDH(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase)를 이용하였고, 상대적 유전자 발현양은 Ct 방법을 통하여 분석하였다. Real-time PCR 결과인 PCR product size를 agarose gel을 통해서 확인했다. 본 실험에 이용된 프라이머는 NCBI에서 각 유전자의 정보를 확인한 이후 Primer 3 software(<http://frodo.wi.mit.edu>)를 이용하여 제작하였다(Table 1).

통계분석

아나볼릭 스테로이드에 따른 개체별 호르몬 농도, 아나볼릭 스테로이드를 이용한 세포의 증식은 대조구와 처리구의 세포 수를 비교하고, 세포의 분화는 대조구와 처리구의 유전자 발현 양을 비교하여 SAS program(9.0 SAS Institute Inc., USA)을 통하여 분산분석을 실시하였고, 대조구와 처리구 간의 효과는 Turkey test와 Duncan's multiple range test에 의하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

아나볼릭 스테로이드의 추출

돼지고기에 존재하는 스테로이드의 분리 및 정제 기술을 개발하기 위해 먼저 이 스테로이드를 합성하는 돼지의 정소를 이용하여 3가지 추출 방법(M1, M2와 M3)으로 분리하였다. 분리된 호르몬은 ELISA 방법을 이용하여 testosterone, estrone, 17 β -estradiol, androstenedione, 19-nortestosterone(nandrolone)의 양을 측정하였고 그 결과는 Table 2와 같다. 추출방법에 따라서 정소 1g에 대한 스테로이드 호르몬 회수율은 M3에서 가장 높았다. 또한 M1, M2 와 M3의 추출방법에 따른 각 호르몬의 회수율도 차이가 있었으며 testosterone 비율은 각각 73.7%, 72.7%와 28.8%이고 nandrolone 비율은 18.3%, 17.0%와 60.8%로 나타났다. M1과 M2에서는 testosterone이 가장 높게 회수되고 M3에서는 nandrolone의 농도가 가장 높게 나타났다.

Table 1. PCR primer information

Gene	Full Name		Primer	Size (bp)	Tm (°C)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	F	5'-gggtcatcatctctgcacct-3'	211	52
		R	5'-acagtcttctgggtggcagt-3'		
ER- α	Estrogen receptor- α	F	5'-caggtgccctattacctgga-3'	204	52
		R	5'-gcctgaggcatagtcattgc-3'		
AR	Androgen receptor	F	5'-tctccaagaatttgatgg-3'	219	52
		R	5'-ggagcttggtgagctggtag-3'		
MyoD	MyoD	F	5'-gatgaccgtgtttcgactc-3'	229	56
		R	5'-tagtctgtctgctgttgac-3'		
Desmin	Desmin	F	5'-tgtcgaaaccagacctcaca-3'	185	57
		R	5'-gtggcgggtactccatcatct-3'		
Myogenin	Myogenin	F	5'-tgggcgtgtaaggtgtgtaa-3'	197	57
		R	5'-tgcaggcgtctctgtactg-3'		

Table 2. Amount of anabolic steroid hormone extracts per 1 g of testis

Hormone	M1		M2		M3	
	ng/g	(%)	ng/g	(%)	ng/g	(%)
Nandrolone	3.2±0.36	(18.3)	4.0±0.29	(16.9)	118.8±1.0	(60.8)
Testosterone	13.0±1.06	(73.3)	17.2±1.11	(72.6)	56.3±0.17	(28.8)
Androstenedione	0.4±0.05	(2.3)	0.4±0.01	(1.8)	2.5±0.06	(1.3)
17 β -estradiol	0.7±0.03	(3.8)	0.7±0.01	(2.9)	10.2±0.05	(5.2)
Estrone	0.4±0.03	(2.3)	1.4±0.30	(5.8)	7.6±0.32	(3.9)

M1, M2 and M3 represent methods 1, 2 and 3, respectively. Concentrations of the hormones are represented in ng per a gram of testis. The numbers in the parentheses mean the relative percentages of the hormone to the total hormone (analyzed from the present study). Mean±SD.

본 연구는 다양한 방법에 의한 추출을 시도 하였으며, 추출방법에 따라 추출된 호르몬 농도와 각 호르몬의 비율에 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 개발한 M3의 경우 다른 두 가지 방법(M1, M2)에 비해 훨씬 많은 양의 스테로이드를 회수할 수 있었다.

개체에 따른 돼지의 근육, 지방, 혈청에서 스테로이드 호르몬의 비교

개체별(암컷, 수컷, 거세수컷) 돼지의 근육, 지방, 혈액에

서의 스테로이드 호르몬 분석에 대한 결과는 Fig. 2와 같다. 개체 별로 비교해 보면 수컷이 암컷, 거세 돼지보다 nandrolone, testosterone, estrone, 17 β -estradiol이 유의적으로 높았다($p<0.05$). 근육, 지방, 혈청 별 비교에서는 19-nortestosterone은 혈청, testosterone은 근육, estrone은 근육, 17 β -estradiol은 근육과 지방에서 높게 나타났다. 호르몬에 따라 비교해 보면 19-nortestosterone, testosterone이 estrone, 17 β -estradiol 보다 상대적으로 높게 나타났다. Seo(2008)는 GC/MS를 이용하여 유통중인 돈육에 progesterone은 존

Fig. 2. Steroid hormones concentration in muscle, fat and serum from female, castrated male and intact male porcine. Nandrolone, testosterone, estrone and 17 β -estradiol were quantified in the gender-specific samples from porcines. Hormones were quantified as ng of hormones per gram of tissue or ng of hormones per ml of serum. Means with different letters are significantly different ($p<0.05$).

재하나 17 β -estradiol, estrone, testosterone의 경우는 거의 검출되지 않는 것으로 보고하였다. De Wasch 등(2001)의 연구 결과에 따르면 본 연구의 결과처럼 돼지 고기에 nandrolone(1~2.5 ng/g 고기)이 존재함을 관찰하였다. 본 연구의 결과에서 보여지는 것처럼 돼지고기에서 스테로이드 양은 성별, 거세 여부 그리고 스테로이드의 추출방법에 따라 크게 차이를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 최소한 De Wasch 등(2001)의 연구결과와 비교했을 때 돼지고기에 nandrolone이 존재하는 것은 확실한 것으로 사료되며, nandrolone 합성에 필요한 전구체인 testosterone과 같은 그 밖의 스테로이드가 존재한다고 판단하는 것이 타당할 것으로 사료된다.

근육세포의 증식에 미치는 영향

근육세포의 성장은 다양한 인자들에 의해서 영향을 받는다. 이러한 인자들은 FGF, IGF, EGF 등과 같은 펩타이드 성장인자(Cook *et al.*, 1993)와 아나볼릭 스테로이드(Diel *et al.*, 2008) 등이 있다. 본 연구에서는 돼지에서 추출한 아나볼릭 스테로이드가 근육세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 배양을 통한 *in vitro* 실험을 실시하였다. 초대배양(primary culture)방법은 실험에 어려움이 많으나 mouse cell line을 이용하는 것 보다 *in vivo*에 좀 더 가까운 것으로 알려져 있기 때문에 소의 근육에 존재하는 근육위성세포를 본 연구에 사용하였다. 소의 다리에서 근육위성세포를 분리, 배양하고 3가지 방법으로 추출된 아나볼릭 스테로이드가 세포증식에 미치는 영향을 알아 보았으며, 세포 배양이 끝난 후 hemocytometer를 이

용하여 세포 수를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 아나볼릭 스테로이드를 첨가하여 배양한 경우 아나볼릭 스테로이드를 첨가하지 않은 대조구에 비해 농도 의존적으로 근육세포의 증식을 촉진하는 것으로 나타났다. 추출 방법에 따른 근육세포 증식 정도의 변화를 살펴보면 M3는 배양 후 계속 증가하여 0.5 μ g/mL 농도에서 156% 값으로 최고치를 나타냈고 M2는 1 μ g/mL 농도에서 149% 값으로 가장 높게 나타났다. 한편 M1은 10 μ g/mL 농도까지 계속 증가하였다. 세포증식 속도도 아나볼릭 스테로이드의 농도가 가장 높은 M3가 M1과 M2 보다 빠르게 진행되었다. Allouh와 Rosser(2010)는 닭에 nandrolone decanoate를 투여했을 때 근육위성세포의 증식에 효과적이었으며 근육 강화를 유도한다고 보고하였다. 또한 Kamanga-Sollo 등(2004)은 소 근육세포의 성장에서 아나볼릭 스테로이드 처리구가 대조구 보다 효과적이었다고 보고하였다. 본 연구결과와 일치하는 결과를 나타냈다. 따라서 본 연구에서 M3를 처리하였을 때 근육세포 증식에 미치는 영향은 nandrolone이 주된 역할을 한 것으로 사료된다.

근육분화에 미치는 영향

일반적으로 근육이 손상을 받을 경우 근육위성세포는 다양한 유전자의 발현에 의해서 근모세포(myoblast)로 분화하고 많은 수로 분열하여 인접한 세포끼리 융합하여 다수의 핵을 가진 근관(myotube)를 형성한다(Yamaguchi, 1995). 이 근관들은 구조 단백질이 형성되고 수축기가 형성되면서 성숙된 근육의 기본단위인 근섬유(muscle fiber)로 분화된다. 본 연구에서도 추출된 아나볼릭 스테로이드 처리구가 대조구보다 더 많은 근관의 형성을 확인 할 수 있었다(Fig. 4A). Kamanga-Sollo 등(2008)은 아나볼릭 스테로이드가 소 근육세포에서 IGF-1을 자극하여 근육의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 근육분화 과정에서 각 단계에 따라 근육형성 조절인자(myogenic regulatory factor)인 myoD, desmin, myogenin 등의 유전자들이 중요한 역할을 한다(Bonnet *et al.*, 2010). MyoD는 근육모세포로 분화하기 위해 발생초기에 발현되며, desmin은 성숙한 정상근섬유에서 보다는 미성숙 근섬유에서 더욱 강하게 발현된다. 근 발생 조절 유전자인 myoD나 myogenin을 근육세포의 분화를 조정하는 것으로 보고되며(Li *et al.*, 1994), myogenin은 근육모세포의 융합 및 근육 유전자 활성화 그리고 분화인자로서 활동한다(Molkentin and Olson, 1996). 본 연구에서는 돼지에서 추출된 아나볼릭 스테로이드를 이용하여 근육세포에 처리한 후 근육세포 분화에 관련된 유전자를 real time PCR로 확인하였다. 그 결과 androgen receptor(AR), myoD, desmin, myogenin의 발현은 대조구와 비교했을 아나볼릭 스테로이드 처리구에서 현저하게 높게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 특히 AR

Fig. 3. Effect of anabolic steroids extract on the MSC proliferation. Anabolic steroid extracts were isolated by three different methods (M1, M2, M3). MSC were treated with various concentrations of the extracts for 72 h. The result is represented as a proliferation index. Data represent mean $\pm$ SEM of 3 separate experimental replicates (* p < 0.05, ** p < 0.01).

Fig. 4. Effect of anabolic steroids extract on the MSC differentiation. Arrows in the cell pictures point out the myotubes (A). Differential expression of steroid hormones receptors (ER- α and AR) and myogenesis marker genes (myo D, desmin and myogenin) after treatments of anabolic steroids extracts. Data represent mean $\pm$ SEM, expressed as fold induction, compared to the initial state (control) and normalized to the GAPDH as an internal control gene (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

은 아나볼릭 스테로이드의 농도 의존적으로 발현되었으며, myoD는 M1, desmin은 M2, myogenin은 M1, M2, M3 모두 높게 발현되었고 특히 M3에서 유의하게 높게 발현되었다(p <0.001). Chen 등(2008)은 AR이 근육분화를 증가시키는 역할을 하며, Kablar 등(1998)은 생쥐를 이용한 실험에서 myoD는 근육 생성에 중요한 역할을 하며 myoD의 결핍은 발생초기에 세포자멸사로 유도한다고 보고하였다. Myogenin은 근육세포의 분화과정에 필요한 인자로서 Venuti 등(1995)의 연구에 의하면 knock-out된 생쥐에서 몸 분절로부터 근육분절, 피부분절과 뼈 분절은 정상적으로 형성되고 근육의 분화도 일어난다고 보고하였다. 결론적으로 돼지고기에 존재하는 아나볼릭 스테로이드는 근육의 증식과 분화에 효과적이고, 앞으로 인체에 미치는 긍정적 효

과에 대한 추가적인 연구를 통해 돼지고기의 소비 촉진과 잠재적인 건강 이익을 얻는데 기여할 것으로 사료된다.

요 약

성호르몬은 근육의 발달(아나볼릭 효과)에 관여하는 것으로 잘 알려져 왔으며 인체의 치료제로 넓게 사용되고 있다. 돼지고기에는 주로 성선(정소와 난소)에서 생산되어 고기에 축적된 다양한 아나볼릭 효과를 나타내는 성호르몬이 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 돼지고기에 존재하는 아나볼릭 스테로이드를 추출하여 근육세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 파악하고자 실시하였다. 본 연구에서 돼지의 각 조직으로부터 아나볼릭 스테로이드를 추출하는 3가지 방법(M1, M2, M3)을 개발하였다. 3가지 모든 추출방법에서 아나볼릭 스테로이드가 추출되었으며 특히 M3에서 조직 1g당 가장 많은 양을 획득할 수 있었다. M3를 이용하여 아나볼릭 스테로이드를 추출했을 때 돼지고기의 근육과 지방에서는 스테로이드 호르몬 양이 수컷에서 가장 높았고, 혈청에서는 nandrolone과 testosterone의 양은 수컷에서 가장 높았으며, estrone와 17 β -estradiol의 양은 비슷하였다. 근육세포 증식은 돼지 아나볼릭 스테로이드의 농도 의존적으로 촉진되었으며, M3에서 가장 빠르게 증식되었다. 근육세포의 분화는 추출된 아나볼릭 스테로이드 처리구가 대조구보다 더 효과적으로 분화가 잘 되는 것을 세포 모양과 유전자(AR, myoD, desmin, myogenin)를 통하여 확인할 수 있었다. 특히 M3에서 추출된 아나볼릭 스테로이드에서 myogenin과 AR 유전자가 유의적으로 높게 발현되었다(p <0.001). 전체적으로 돼지의 아나볼릭 스테로이드는 근육세포의 성장과 분화를 촉진하였다. 따라서 돼지고기에 있는 아나볼릭 스테로이드의 섭취를 통해 인체 근육의 성장과 발달에 긍정적 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술관리센터의 연구비 지원(108089-03-2-SB010)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Allouh, M. Z. and Rosser, B. W. (2010) Nandrolone decanoate increases satellite cell numbers in the chicken pectoralis muscle. *Histol. Histopathol.* **25**, 133-140.
- Amory, J. K. and Bremner, W. J. (2000) Newer agents for hormonal contraception in the male. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 61-66.
- Ayotte, C. (2006) Significance of 19-norandrosterone in athletes' urine samples. *Br. J. Sports Med.* **40**, 125-129.

4. Barton Pai, A., Chrétien, C., and Lau, A. H. (2002) The effects of nandrolone decanoate on nutritional parameters in hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* **58**, 38-46.
5. Bergink, E. W., Janssen, P. S. L., Turpijn, E. W., and Vander Vies, J. (1985) Comparison of the receptor-binding properties of nandrolone and testosterone under in vitro and in vivo conditions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **22**, 831-836.
6. Bhasin, S., Storer, T. W., Berman, N., Yarasheski, K. E., Clevenger, B., Phillips, J., Lee, W. P., Bunnell, T. J., and Casaburi, R. (1997) Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 407-413.
7. Bonnet, A., Dai, F., Brand-Saberi, B., and Duprez, D. (2010) Vestigial-like 2 acts downstream of MyoD activation and is associated with skeletal muscle differentiation in chick myogenesis. *Mech. Dev.* **127**, 120-136.
8. Chen, Y., Lee, N. K., Zajac, J. D., and MacLean, H. E. (2008) Generation and analysis of an androgen-responsive myoblast cell line indicates that androgens regulate myotube protein accretion. *J. Endocrinol. Invest.* **31**, 910-918.
9. Choi, I., Kim, J. Y., Lee, E. J., Kim, Y. Y., Chung, C. S., Chang, J., Choi, N. J., Chung, H. J., and Lee, K. H. (2009) Ontogeny of expression and localization of steroidogenic enzymes in the neonatal and prepubertal pig testes. *J. Androl.* **30**, 57-74.
10. Cook, D. R., Doumit, M. E., and Merkel, R. A. (1993) Transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor-BB interact to affect proliferation of clonally derived porcine satellite cells. *J. Cell Physiol.* **157**, 307-312.
11. Debruyckere, G. and Van Peteghem, C. (1991) Detection of 19-nortestosterone and its urinary metabolites in miniature pigs by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **564**, 393-403.
12. De Wasch, K., Le Bizec, B., De Brabander, H. Andre, F., and Impens, S. (2001) Consequence of boar edible tissue consumption on urinary profiles of nandrolone metabolites. II. Identification and quantification of 19-norsteroids responsible for 19-norandrosterone and 19-noretioncholanolone excretion in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1442-1447.
13. Diel, P., Baadners, D., Schliupmann, K., Velders, M., and Schwarz, J. P. (2008) C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression. *Mol. Endocrinol.* **40**, 231-241.
14. Fairfield, W. P., Treat, M., Rosenthal, D. I., Frontera, W., Stanley, T., Corcoran, C., Costello, M., Parlman, K., Schoenfeld, D., Klibanski, A., and Grinspoon, S. (2001) Effects of testosterone and exercise on muscle leanness in eugonadal men with AIDS wasting. *J. Appl. Physiol.* **90**, 216-2171.
15. Fuh, M. R., Huang, S. Y., and Lin, T. Y. (2004) Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion trap-mass spectrometer. *Talanta*. **64**, 408-414.
16. Hong, M. H., Sun, H., Jin, C. H., Chapman, M., Hu, J., Chang, W., Burnett, K., Rosen, J., Neoro-Vilar, A., Miner, J. N. (2008) Cell-specific activation of the human skeletal alpha-actin by androgens. *Endocrinology*. **149**, 1103-1112.
17. Kablar, B., Asakura, A., Krastel, K., Ying, C., May, L. L., Goldhamer, D. J., and Rudnicki, M. A. (1998) MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 1079-1091.
18. Kamanga-Sollo, E., Pampusch, M. S., Xi, G., White, M. E., Hathaway, M. R., and Dayton, W. R. (2004) IGF-I mRNA levels in bovine satellite cell cultures: effects of fusion and anabolic steroid treatment. *J. Cell Physiol.* **201**, 181-189.
19. Kamanga-Sollo, E., White, M. E., Hathaway, M. R., Chung, K. Y., Johnson, B. J., Dayton, W. R. (2008) Roles of IGF-1 and the estrogen, androgen and IGF-1 receptors in estradiol-17beta- and trenbolone acetate-stimulated proliferation of cultured bovine satellite cell. *Domest. Anim. Endocrinol.* **35**, 88-97.
20. Khalil, M. W., Chung, N., Morley, P., Glasier, M. A., and Armstrong, D. T. (1988) Formation and metabolism of 5(10)-estrene-3 beta, 17 beta-diol, a novel 19-norandrogen produced by porcine granulosa cells from C19 aromatizable androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 144-150.
21. Lee, E. J., Choi, J. H., Hyun, J. H., Cho, K. H., Hwang, I., Lee, H. J., Chang, J. S., and Choi, I. (2007) Steroid effects on cell proliferation, differentiation and steroid receptor gene expression in adult bovine satellite cells. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20**, 501-510.
22. Lee, Y. J., Kim, C. J., Park, B. Y., Seong, P. N., Kim, J. H., Kang, G. H., Kim, D. H., and Cho, S. H. (2009) Warner-bratzler shear force, sarcomere length, total collagen contents and sensory characteristics of honwoo beef (Korean native cattle) quality grade. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 726-735.
23. Li, H., Choudhary, S. K., Milner, D. J., Munir, M. I., Kuisk, I. R., and Capetanaki, Y. (1994) Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulator MyoD and myogenin. *J. Cell Biol.* **124**, 827-841.
24. Molkentin, J. D. and Olson, E. N. (1996) Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 445-453.
25. Raeside, J. I., Renaud, R. L., and Friendship, R. M. (1989) Aromatization of 19-norandrogens by porcine Leydig cells. *J. Steroid Biochem.* **32**, 729-735.
26. Rho, J. H. and Han, C. K. (2007) Effects of Pork on Feeding on Detoxification Process in Rats Intoxicated with Lead *J. Anim. Sci. & Technol.* **49**, 415-428.
27. Saartok, T., Dahlberg, E., and Gustafsson, J. A. (1984) Relative bindingaffinity of anabolic-androgenic steroids-comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. *Endocrinology* **114**, 2100-2106.
28. Schwarzenberger, F., Toole, G. S., Christie, H. L., and Raeside, J. I. (1993) Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta Endocrinol(Copenh)*. **128**, 173-177.
29. Seo, J. (2008) Determination of hormonal active compounds

- in meat. *J. Anim. Sci. & Technol.* **21**, 526-534.
30. Sheffield-Moore, M., Paddon-Jones, D., Casperson, S. L., Gilkison, C., Volpi, E., Wolf, S. E., Jiang, J., Rosenblatt, J. I., and Urban, R. J. (2006) Androgen therapy induces muscle protein anabolism in older women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3844-3849.
31. Venuti, J. M., Morris, J. H., Vivian, J. L., Olson, E. N., and Klein, W. H. (1995) Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell Biol.* **128**, 563-576.
32. Yamaguchi, A. (1995) Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily. *Seminar in Cell Biology*. **6**, 165-173.
33. 농협중앙회 (2007) 축산물 가격 및 수급자료. pp. 104-105.

(Received 2010.6.14/Revised 1st 2010.8.31, 2nd 2010.9.1/
Accepted 2010.9.2)