

배양계배 근원세포의 분화에 미치는 Fe³⁺의 영향

유병제 · 지승완 · 김상호 · 손종경* · 민봉희** · 양재섭***

대구대학교 자연과학대학 생물학과 · ***분자생물학과 · **사범대학 생물교육과 ·
*경북대학교 사범대학 생물교육과

계배 근원세포의 분화 및 증식에 미치는 Fe³⁺의 영향을 조사하였다. 철이 없는 배양액은 근원 세포의 분화와 증식을 억제하는 것으로 나타났으며, 따라서 근원세포의 분화에 철과 transferrin (Tf)은 필수적이다. 또한, 철 대신에 Co²⁺가 부착된 Tf가 첨가된 배양액에서도 근세포의 분화가 정상적으로 일어나는 것으로 나타났다. Lysosomotropic amine(chloroquine, μM 수준; ammonium chloride, mM 수준)은 근세포의 분화와 증식을 억제시켰으며, 근세포 분화의 철에 대한 의존성은 분화됨에 따라 둔화되었다.

세포내로의 Tf의 수송량은 MEM과 8102 배양액에서 비슷하였고, 근세포가 분화됨에 따라 감소하였다. Lysosomotropic amine은 최소한 3시간이내에서는 세포내로 수송되는 Tf의 양에 영향을 미치지 못 하였다.

KEY WORDS: Chick myoblast, Transferrin, Fe³⁺, Lysosomotropic amine

일반적으로 배양액에 첨가되는 계배 추출물은 근세포의 분화와 증식에 필수적인 것으로 알려져 있으며, 그 필수성은 계배 추출물에 들어 있는 transferrin(Tf)에 기인하는 것으로 알려져 있다 (Slater, 1976; Yoo *et al.*, 1988). 근세포의 분화에는 Tf가 필수적인 것으로 보고되어 있으며, Tf는 근세포의 분화 뿐만아니라, 근세포의 증식에도 필요한 것으로 보고되고 있으며, Fe³⁺는 세포의 증식과 세포분열의 중지에 필요한 것으로 알려져 있다 (Li *et al.*, 1988). 그리고 Tf는 다른 각종 조직 세포의 분화에도 필수적인 것으로 알려져 있다 (Karin and Mintz, 1981).

그리고 Tf는 세포 내에 철을 공급하는 단백질로 수용체와 결합하여 endocytosis되어 lysosome과 결합한 후 주위의 pH가 낮아짐에 따라 철을 해리하고 exocytosis에 의해 세포 밖으로 방출되었다가 재차 사용되는 것으로 알려져 있다 (Aisen and Listowaky, 1980; Renswoude *et al.*, 1982; Schnider *et al.*, 1982; Snider *et al.*, 1985). 또한 발암물질이며 protein kinase C의 촉진제인 4β

-phorbol 12β-myristate 13α-acetate(PMA)는 Tf의 receptor(TfR)의 변화없이 철의 수송만 촉진시키는 것으로 보고되어 있다 (Sorokin *et al.*, 1988). TfR은 공유결합성 이량체로 단량체는 세포막에 없으며 Tf와의 결합력이 없는 것으로 보고되어 있고 (Reckhow and Enns, 1988), 주위의 pH가 낮아지면 이량체 TfR끼리 결합하여 Tf와의 결합력을 상실하는 것으로 보고되어 있다 (Turkiwitz *et al.*, 1988). 그리고 쥐의 간세포에서 철의 결핍은 세포막 TfR의 양을 증가시키는 것으로 보고되어 있으며 (Muller-Eberhard *et al.*, 1988), murine erythroleukemia cell에서는 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 분화를 유도하면 총 TfR의 양은 변화가 없는데 세포막 TfR은 감소하는 것으로 보고되어 있다 (Mulford and Lodish, 1988).

그리고 lysosomotropic amine은 lysosome의 pH를 상승시켜 Tf로부터 철 해리의 억제와 근세포의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Kent, 1982; Renswoude *et al.*, 1982).

위와 같은 근거를 바탕으로, 본 연구에서는 근세포분화에 필수적인 철과 Tf의 작용기구를 알아 보고자, 근원세포의 분화에 미치는 철과 Tf의 영

본 연구는 1989년도 문교부기초과학 연구과제 학술연구 조성비와 1989년도 학술진흥재단 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었음.

향과 lysosomotropic amine(chloroquine, ammonium chloride)의 영향 및 근원세포의 분화에 따른 Tf의 수송양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 근세포의 배양

1) 배양액의 조성

본 실험에서 근세포 배양시 사용된 배양액은 MEM Eagle's Medium(MEM, Sigma), 910 배양액, 8102 배양액, 811 배양액이며, 이들의 조성비는 다음과 같다. 910 배양액은 MEM에 말혈청(Horse Serum, Gibco)이 10%, 항생제(Antimycotic-Antibiotic Solution, Gibco)가 1% 포함된 것이다. 8102 배양액은 MEM에 말혈청이 10%, 항생제가 1% 그리고 계배 추출물(Embryo Extract)이 2% 포함된 것이다. 811 배양액은 MEM에 말혈청을 10%, 항생제가 1% 그리고 계배 추출물(Embryo Extract)이 10% 포함된 것이다.

본 실험에 사용한 MEM과 EBSS 및 다른 시약들은 Sigma로부터 구입하였으며, 말혈청은 GOBCO로부터 구입하였다.

2) 근세포의 배양법

근세포 배양은 부란 12일령의 계배 가슴근육을 재료로 하여 O'Neill과 Stockdale(1972)의 방법에 따라 행하였다. 근세포 현탁액을 811 배양액으로 5×10^5 cells/ml로 희석하여 근세포를 collagen이 잘라진 배양기에 심은 후, 37°C, 5% 이산화탄소하에서 배양하였다. 배양 24시간에 배양액을 8102 배양액으로 갈아준 후, 근세포를 배양하면서 실험 목적에 따라 일정 시간 간격으로 근세포를 에탄올:포르말린:조산(20:2:1) 혼합액으로 고정시켜 Erlich's haematoxylin으로 5분간 염색하였다. 광학 현미경하에서 150배율로 근세포를 관찰하면서 관찰 시야안의 전체 핵 수와 융합한 근섬유의 핵 수를 측정하여 융합지수와 증식도를 구하였다. 세포 융합지수는 융합된 근섬유의 핵 수를 전체 핵 수로 나눈 값으로 나타내었으며, 전체 핵 수를 증식도로 간주하였다.

즉, 융합지수(%) = (융합된 근섬유의 핵 수 / 전체 핵 수) × 100.

2. Transferrin의 순수분리

Transferrin의 순수 분리는 계배 추출물로부터 Yoo 등(1988)의 방법에 따라 행하였으며, 분획물들은 수확하여 Ultrafiltration을 이용하여 MX50 Membrane(M.W. 50,000 cut-off, Amicon)으로 농축하여 사용하였다.

철의 침가는 철이 부착되어 있지 않은 시료를 250배량의 철 침가 완충용액으로 4°C에서 1일 동안 투석시켜 행하였다. 철 침가 완충용액의 조성은 다음과 같다. 1 mM ferric chloride, 0.1 M sodium citrate, 0.1 M sodium bicarbonate(pH 8.6). 또한 철대칭에 코발트(Co²⁺)를 부착시킨 경우에는 1 mM ferric chloride 대신에 1 mM cobalt chloride가 첨가된 완충용액을 사용하였다.

철의 제거는 시료의 250배가 되는 완충용액으로 4°C에서 12시간 간격으로 2번 투석시켜 행하였다. 철 제거 완충용액의 조성은 다음과 같다. 10 mM EDTA, 0.1 M acetate, 0.1 M sodium bicarbonate(pH 4.5).

철의 침가와 제거 후 단백질에 부착되어 있지 않은 유리 철의 제거와 더불어 시료를 배양액에 첨가하기 위하여 철이 첨가된 시료 또는 철이 제거된 시료를 250배량의 EBSS로 4°C에서 6시간 간격으로 3회 각각 투석하여 배양액에 첨가하였다.

3. 세포내로 소송된 Tf의 측정

순수분리한 Tf에 ¹²⁵I(Amersham, 2 mCi/0.2 ml)를 이용한 방사능 표지는 chloramine-T 방법에 따라 다음과 같이 행하였다. Transferrin(1.5 mg/ml, pH 7.6, 250 mM phosphate) 1 ml에 NaI¹²⁵ 40 μl(0.4 mCi)을 가한 후, 위 용액에 chloramine-T(12 mg/ml, Sigma) 0.2 ml을 2분 간격으로 3회 첨가하였다. Sodium metabisulfite(6 mg/ml) 0.3 ml과 KI(160 mg/ml) 2 ml을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 위와 같이 ¹²⁵I를 transferrin에 표지한 후, 단백질에 부착되지 않은 ¹²⁵I를 제거하기 위하여 표지된 transferrin을 250배량

의 pH 7.4, 10 mM Hepes Hank's balanced salt solution(HBSS)로 4°C에서 6시간 간격으로 5회 투석한 후, Tf가 0.2 mg/ml되게 희석하여 시료로 사용하였다.

일정 배양시기(배양 24, 36, 48, 60, 72 시간)에 300 μ l의 배양액(24 well, MEM 또는 8102 배양액)에 125 I-Tf를 10 μ l 첨가한 후, 37°C 5% 이산화탄소하에서 배양을 계속하였다. 동시에 chloroquine을 10 μ M로 또는 ammonium chloride를 10 mM로 첨가하여 Tf의 수송에 미치는 lysosomotropic amine의 영향도 조사하였다. 125 I-Tf를 첨가한 후, 10분, 30분, 1시간, 2시간 3시간에 배양액을 제거하였고, 차가운 EBSS로 5회 세척한 후, 10 mM acetate Ringer 용액(pH 5.0)에서 0°C로 15분간 방치하였다. 이 용액을 제거한 후, 근세포를 1 N NaOH 50 μ l로 3회 수확하여 LSC로 방사선을 측정하였다.

결 과

근세포 분화에 미치는 철과 Tf의 영향을 알아보기 위하여, 배양 24시간에 배양액을 지시된 배양액(Fig. 1)으로 교환한 후, 배양을 지속하다가 배양 72시간에 근세포를 고정 및 염색하여 근세포

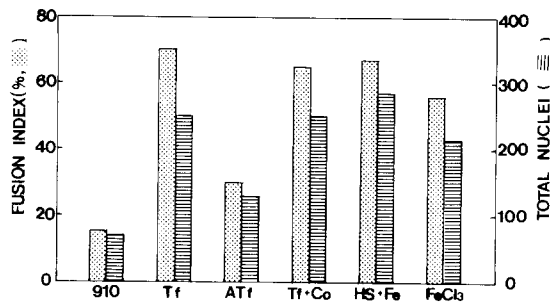


Fig. 1. Effects of Fe^{3+} and transferrin on the differentiation and the proliferation of cultured myoblasts. At 24 hour of culture, indicated media were added, and at 72 hour of culture myoblasts were fixed and stained. 910, 910 medium; TF, 910 medium containing 20 μ g/ml of transferrin; ATF, 910 medium containing 20 μ g/ml of transferrin removed Fe^{3+} ; Tf + Co, 910 medium containing 20 μ g/ml of transferrin added Co^{2+} ; HS + Fe, medium containing horse serum added Fe^{3+} ; $FeCl_3$, 910 medium containing 0.1 mM $FeCl_3$.

의 증식도와 융합지수를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 1과 같다. 여기에서 보듯이, 기본 배양액인 910 배양액(910)과 철이 제거된 apotransferrin (ATf)를 첨가한 경우(ATf)에는 근세포의 증식도(■)와 융합지수(▨)가 매우 낮게 나타났으며, Tf가 첨가된 경우(Tf)와 철대신에 Co^{2+} 가 부착된 Tf의 경우(Tf + Co)에는 증식도(■)와 융합지수(▨)가 높게 나타났다. 또한 철이 부착된 말린철을 함유한 배양액의 경우(HS + Fe)와 유리 철이 첨가된 경우에도 증식도(■)와 융합지수(▨)가 높게 나타났다. 따라서 철이 공급되지 않는 경우(910, ATf)에는 근세포의 분화와 증식이 억제되는 것을, 철이 공급되는 경우(Tf, HS + Fe, $FeCl_3$)에는 근세포의 분화와 증식이 정상적으로 일어나는 것을 알 수 있다. 또한, 철대신에 코발트가 첨가된 Tf의 경우(Tf + Co)에도 근세포의 분화와 증식이 정상적으로 일어나는 것을 알 수 있다.

Lysosome의 pH를 상승시킴으로써 철의 수송을 억제하는 것으로 알려진 lysosomotropic amine(chloroquine, ammonium chloride)이 근세포 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 이것들이 여러 농도로 첨가된 배양액에서 키운 근세포의 증식도와 융합지수를 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 2(chloroquine)과 Fig. 3(ammonium chloride)에 나타내었다. 배양 24시간에 배양액을 811 배양액에서 lysosomotropic amine이 첨가된 8102 배양액으로 교환한 후, 배양을 지속하다가 배양 72시간에 세포를 고정 및 염색하여 광학 현미경하에서 세포를 관찰하였다. 여기에서 보듯이, lysosomotropic amine의 농도가 증가할수록 근세포의 융합지수와 증식도가 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서, lysosomotropic amine의 농도가 증가할수록 근세포의 분화와 증식도 억제되는 것을 알 수 있었으며, 또한 ammonium chloride은 mM 수준에서 chloroquine은 μ M 수준에서 근세포의 분화와 증식을 억제시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 배양시기에 따른 lysosomotropic amine의 영향을 조사하기 위하여 배양 24시간에 배양액을 811 배양액에서 8102 배양액, 910 배양액 그리고 lysosomotropic amine(ammonium chloride, chloroquine)이 첨가된 배양액으로 교

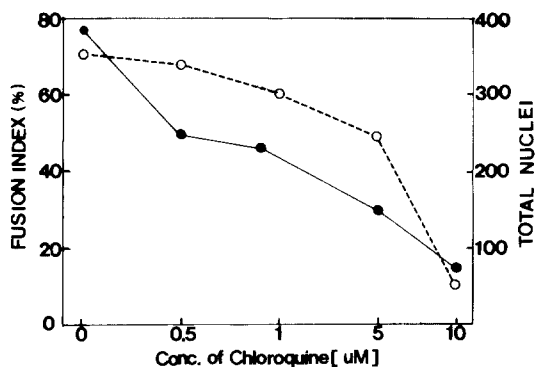


Fig. 2. Effects of chloroquine on the differentiation and the proliferation of cultured myoblasts. At 24 hour of culture, the 8102 media containing various concentration of chloroquine were added, and then cells were cultured for 48 hours and fixed and stained. Fusion index, ○—○; total nuclei, ●—●.

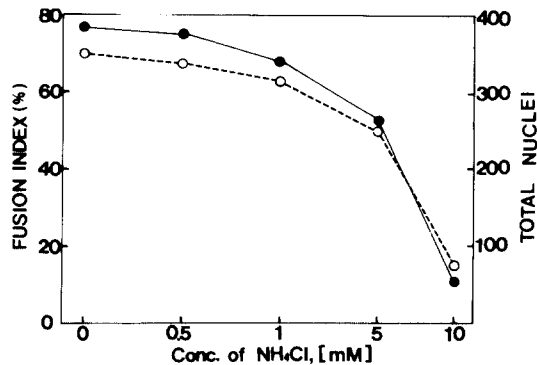


Fig. 3. Effects of ammonium chloride on the differentiation and the proliferation of cultured myoblasts. At 24 hour culture, the 8102 media containing various concentration of ammonium chloride were added, and then cells were cultured for 48 hours and fixed and stained. fusion index, ○—○; total nuclei, ●—●.

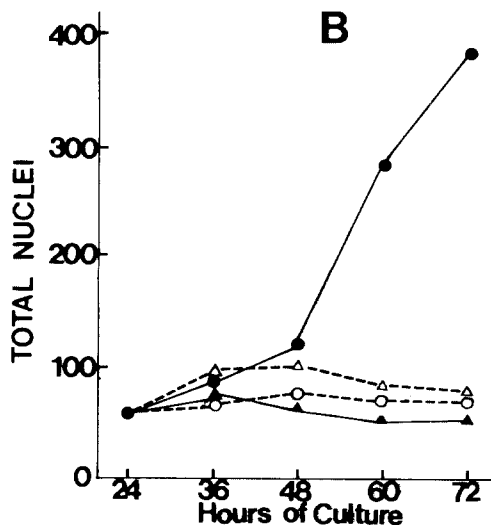
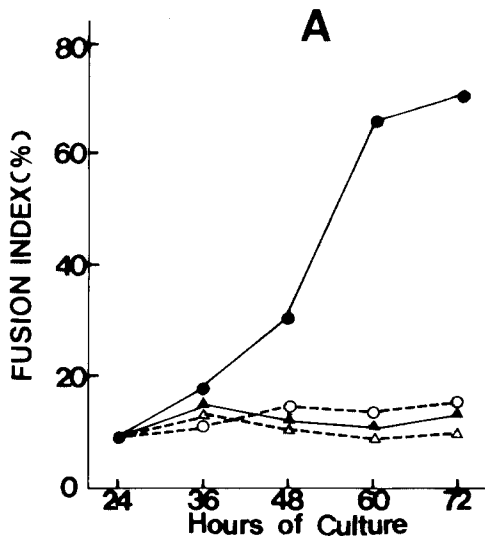


Fig. 4. Effects of ammonium chloride and chloroquine on the differentiation (A) and the proliferation (B) of cultured myoblasts. At 24 hours after plating, the 811 media was changed to each media. At indicated time, cells were fixed and stained. 8102 medium (●—●), 910 medium (○—○), Ammonium chloride (▲—▲), Chloroquine (△—△).

환해준 후, 배양을 지속하다가 여러 배양시기 (36, 48, 60, 72시간)에 세포를 고정 및 염색하여 세포의 증식도와 융합지수를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다. 여기에서 보듯이, 정상적인 8102 배양액에서 키운 근세포의 경우에는(●—●) 융합지수와 증식도는 48시간에서 현저히 증가하여, 60시간 이후에는 거의 변화가 없는 것으로 나타났으며, 910 배양액에서 키운 근세포

(○—○)와 lysosomotropic amine이 첨가된 배양액에서 키운 근세포의 경우에는 [ammonium chloride(▲—▲), chloroquine(△—△)], 전 배양시기에 걸쳐 세포의 증식도와 융합지수가 극히 낮은 것으로 나타났다. 따라서 분화 배양액인 8102 배양액에서 근세포가 정상적으로 분화되는 것을 알 수 있었으며, Tf가 없는 배양액(910 배양액)과 lysosomotropic amine이 첨가된 배양액에

서는 근세포가 분화되지 않는 것을 알 수 있었다. 그리고 분화 시기에 따른 철의 영향을 조사하기 위하여, 여러 배양시기(24, 30, 36, 42, 48시간)에 배양액을 정상 배양액인 8102 배양액에서 910 배양액 또는 chloroquine 10 μ M로 첨가된 8102 배양액으로 갈아준 후 배양을 지속하다가 배양 72 시간에 근세포를 고정 및 염색하여 세포의 증식도와 융합지수를 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 여기에서 보듯이, 근세포의 융합지수(A)와 증식도(B)는 배양액의 교환(철 공급의 억제)이 늦어짐에 따라 chloroquine이 함유된 배양액에서 키운 세포(●—●)와 910 배양액에서 키운 세포(○—○)에서 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 근세포가 분화됨에 따라 910 배양액과 chloroquine에 의한 근세포 분화의 억제 효과는 작아지는 것을 알 수 있었다.

근세포의 분화에 따른 Tf의 수송양상과 그것에 미치는 lysosomotropic amine의 영향을 조사하였는데, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 여기에서 보듯이, 125 I-Tf를 MEM과 8102 배양액에 처리한 경우 세포내로 수송된 125 I-Tf의 양은 모든

배양시간에서 거의 비슷한 양상으로 나타났으며, 정상인 경우(●—●)와 lysosomotropic amine이 첨가된 경우[chloroquine(▼—▼); ammonium chloride(□—□)]도 모든 배양시기에서 거의 비슷한 양상으로 나타났다. 따라서 세포내로 수송된 125 I-Tf는 non-specific binding에 의한 것이 아님을 알 수 있었으며, lysosomotropic amine은 3시간 이내에서는 Tf의 수송에 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있었다. 또한 MEM과 8102 배양액 모두에서 오래 배양된 근세포일수록 세포내로 수송된 125 I-Tf의 양이 작아지는 것으로 나타났으며, 세포내로 수송된 125 I-Tf의 양이 24시간 배양한 근세포(24)에서는 3시간 동안 지속적으로 증가하는 것으로, 36시간 배양한 근세포(36)에서는 1시간까지는 증가하며 그 이후에는 변화가 없는 것으로, 48시간 이상 배양한 근세포(48, 60, 72)에서는 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서 근세포가 분화됨에 따라 세포내로 수송되는 Tf의 양이 작아지는 것을 알 수 있었다.

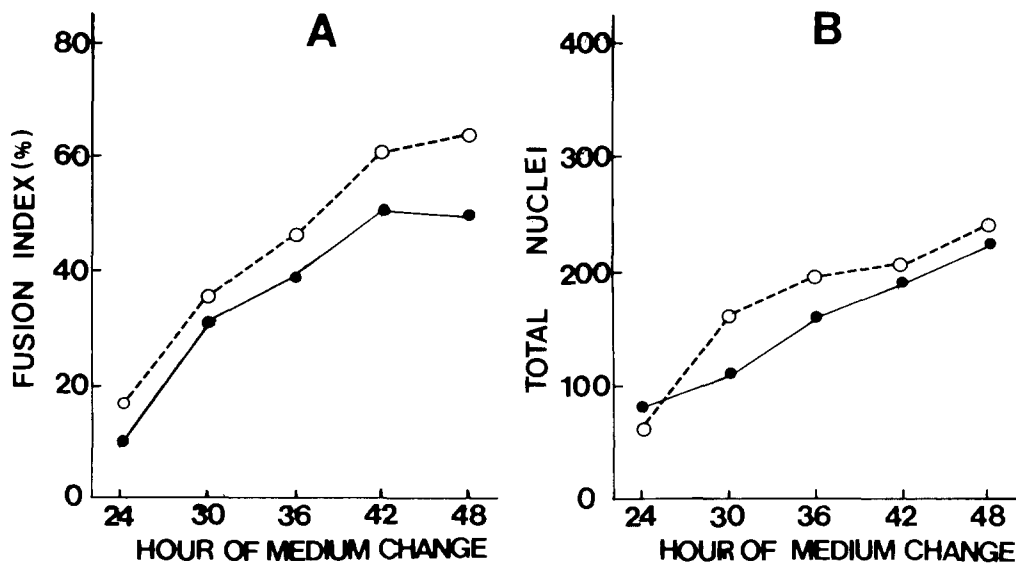


Fig. 5. Effects of adding time of the media suppressing the transport of iron on the differentiation (A) and the proliferation (B) of cultured myoblasts. At 24 hour of culture, 8102 medium was added. At the indicated time, 8102 media were removed, and 910 medium (○—○), or 8102 medium containing 10 μ M chloroquine (●—●) were added. at 72 hour of culture, cells were fixed and stained.

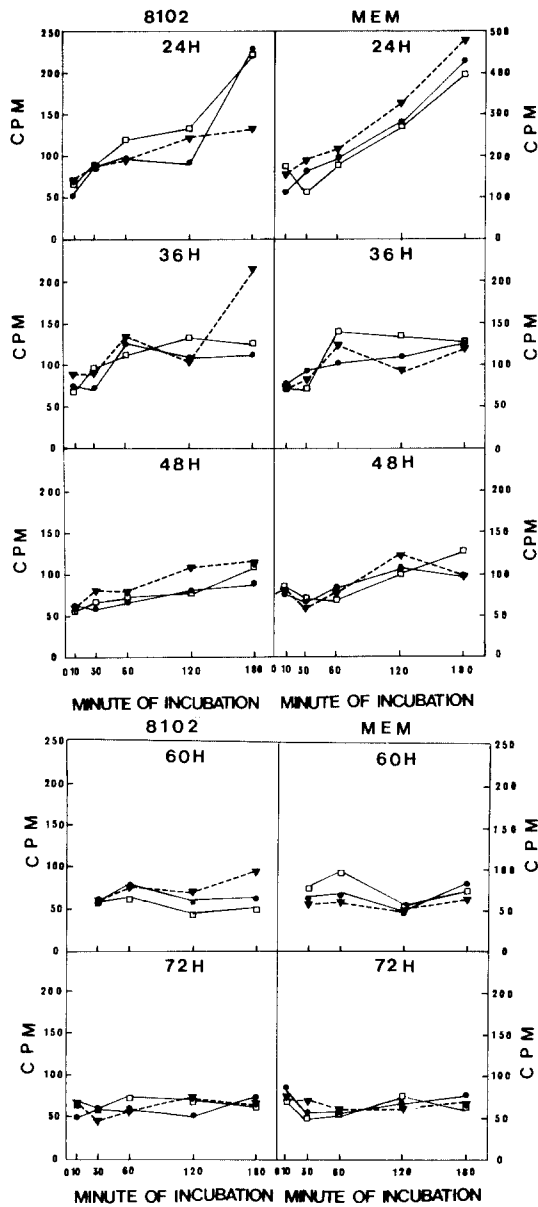


Fig. 6. Amounts of ¹²⁵I-Tf of endocytosis. MEM on the top indicates muscle cells in MEM, 8102 on the top indicates muscle cells in 8102 medium, and each numerals in figures indicate cultured hours of muscle cells. ● - ●, blank; ▼ - ▼, 10 μM chloroquine; □ - □, 10 mM ammonium chloride.

고찰

말 혈청과 계배 추출물에 transferrin이 존재하는 것으로 알려져 있으며(Yoo *et al.*, 1988), transferrin은 세포내로 철을 공급하는 단백질로 알려져 있고(Aisen and Listrowsky, 1980), 또한 transferrin은 근세포의 분화 뿐만아니라, 근세포의 증식에도 필요한 것으로 보고되고 있으며, 철은 세포의 증식과 세포분열의 증식에 필요한 것으로 알려져 있다(Li *et al.*, 1982; Yoo *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1989). 근세포 분화에 미치는 철과 Tf의 영향에 대한 실험의 결과가 Fig. 1인데, 여기서 보듯이 배양액에 철이 없는 경우(910: ATf)에는 근세포의 융합지수(●)와 증식도(■)가 낮은 것으로, 철이 있는 경우(Tf: HS + Fe)에는 융합지수(○)와 증식도(■)가 높은 것으로 나타났다. 또한 유리상태의 철(FeCl₃)을 910 배양액에 첨가하여 처리한 경우에도 융합지수(○)와 증식도(■)가 높은 것으로 나타났다. 이는 유리상태의 철이 910 배양액에 함유되어 있는 말 혈청에 다량 존재하는 말 Tf(ATf)과 서로 결합되어 나타나는 결과로 사료된다. 따라서 근세포의 분화에 Tf이 필수적이며, 이러한 Tf의 필수성은 철이 있는 경우에만 나타나는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구 결과도 상기한 연구와 잘 일치되고 있음을 알 수 있다. 그런데 Fig. 1에서 보듯이, 철 대신 cobalt가 부착된 Tf(Tf + Co)을 첨가시킨 경우에도 근세포의 분화와 증식이 정상적으로 일어나는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 근세포의 분화에 필수적인 Tf의 작용이 Tf에 꼭 철만이 부착되어야만 정상적으로 일어난다는 것을 부정하는 것으로 사료되며, 철과 가장 유사한 철이 금속인 코발트가 부착된 Tf가 정상적으로 Tf-담체와 결합하여 철과 유사한 방법으로 작용하는 것에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 이러한 사실은 근세포 분화에 작용하는 철의 기구에 코발트가 작용함으로써 일어나는 것으로 사료된다.

Transferrin은 세포내로 철을 공급하는 단백질로 수용체와 결합하여 endocytosis되어 lysosome과 결합한 후 주위의 pH가 하락함에 따라 철이 해

리되고, exocytosis에 의해 세포 밖으로 방출되었다가 재차 사용되는 것으로 알려져 있다(Aisen and Listowsky, 1980; Renswoude *et al.*, 1982; Schneider *et al.*, 1982; sinder *et al.*, 1985). 또한 lysosomotropic amine은 lysosome의 pH를 상승 시킴으로써 근세포의 분화를 억제시키는 것으로 알려져 있다(Kent, 1982; Renswoude *et al.*, 1982). 근세포 분화에 미치는 lysosomotropic amine(chloroquine, ammonium chloride)의 영향에 대한 실험의 결과(Fig. 2; 3; 4)를 보면, lysosomotropic amine은 근세포의 증식을 억제하여 이후에 일어나는 근세포 분화도 상대적으로 억제하는 것으로 사료되며, 이러한 결과는 Kent (1982)의 보고와도 잘 일치되는 것으로 사료된다. 또한 분화시기에 따른 철의 영향을 조사한 결과(Fig. 5)를 보면, 배양액의 교환(철 공급의 억제)이 늦어짐에 따라 융합지수(A)와 증식도(B)가 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 철 공급의 억제가 일찍 일어날수록 근세포의 분화 증식은 억제되는 것을, 근세포가 분화됨에 따라 철 공급의 억제에 의한 근세포 분화와 증식의 억제효과는 작아지는 것을 알 수 있다. 그러므로 근세포 분화의 철에 대한 의존성은 근세포가 분화됨에 따라 둔화되는 것을 알 수 있으며, 이러한 결과는 근세포가 분화됨에 따라 Tf-담체가 감소되는(Yoo *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1989) 것과 철의 필요성의 감소에 기인하는 것으로 사료된다.

Endocytosis에 의해 세포내로 수송되는 Tf에 대한 실험 결과(Fig. 6)를 보면, MEM(단백질이 없음)과 8102 배양액(단백질이 다량 있음)의 경우 모든 배양시기에서 세포내로 수송된 ^{125}I -Tf이 거의 같은 것으로 나타났다. 따라서 세포내로 수송된 ^{125}I -Tf는 non-specific binding에 의해 수송되지 않았음을 알 수 있다. 또한 8102 배양액과 MEM의 모두에서 근세포가 분화됨에 따라 세포내로 수송되는 ^{125}I -Tf의 양이 감소하는 것으로 나타났다. 24시간 배양한 근세포(분화 전 단계, 미분화 상태)에서는 세포내로 수송된 ^{125}I -Tf의 양이 3시간 동안 지속적으로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 근세포가 분화됨에 따라 Tf-담체가 감소하는 것으로 보고되어 있으며(Yoo *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1989), 비록 Tf-담체의 분석은

0°C에서 행해지고 본 실험은 37°C에서 행하여 졌지만, 본 실험의 결과는 근세포의 분화에 따른 Tf-담체의 감소와 매우 부합되며, 근세포의 분화에 따른 Tf-담체의 감소와 철-필요성의 감소에 기인하는 것으로 사료된다. 그리고 정상인 경우(●—●)와 lysosomotropic amine이 첨가된 경우(chloroquine, ▼—▼; ammonium chloride, □—□)의 세포내로 수송된 ^{125}I -Tf의 양이 모든 배양시기의 근세포에서 거의 비슷한 것으로 나타났다. 따라서 lysosomotropic amine이 최소한 3시간 이내에서는 Tf의 수송에 영향을 끼치지 못하는 것을 알 수 있으며, lysosomotropic amine이 철의 수송을 억제함으로써 근세포의 분화를 억제하는 데에는 최소한 3시간 이상이 요구되는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aisen, P. and I. Listowsky, 1980. Iron transport and storage protein. *Ann. Rev. Biochem.* **49**: 357-393.
- li, I., I. Kimura, and E. Ozawa, 1982. A myotrophic protein from chick embryo extract: Its purification, identity to transferrin, and indispensability for avian myogenesis. *Devel. Biol.* **94**: 366-377.
- Karin, M. and B. Mintz, 1981. Receptor-mediated endocytosis transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma cell. *J. Biol. Chem.* **256**: 3245-3252.
- Kent, C., 1982. Inhibition of myoblast fusion by lysosomotropic amines. *Devel. Biol.* **90**: 91-98.
- Lee, C. H., B. J. Yoo, Y. J. Jeon, C. H. Chung, and D. B. Ha, 1989. Alteration in transferrin receptor during the chick myoblast fusion in culture. *Korean J. Zool.* **32**: 163-175.
- Mulford, C. A. and H. F. Lodish, 1988. Endocytosis of the transferrin receptor is altered during differentiation of murine erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 5455-5461.
- Muller-Eberhard, U., H. H. Lien, J. A. Grasso, S. Giffhorn-Katz, M. G. DeFalco, and N. R. Katz, 1988. Increase in surface expression of transferrin receptors on cultured hepatocytes of adult rats in response to iron deficiency. *J. Biol. Chem.* **263**: 14753-14756.
- O'Neill, B. B. and S. D. Stockdale, 1972. A kinetic analysis of myogenesis *in vitro*. *J. Cell Biol.* **52**: 52-65.
- Reckhow, C. L. and C. A. Enns, 1988. Characterization of the transferrin receptor in tunicamycin-treated A431 cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 7297-7301.

- Renswoude, J. V., K. R. Bridges, J. B. Harford, and R. D. Klausner, 1982. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake Fe in K562 cells: Identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6186-6190.
- Schneider, C., R. Sutherland, R. Newman, and M. Greaves, 1982. Structural features of the cell surface receptors for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. *J. Biol. Chem.* **257**: 8516-8522.
- Slater, C. R., 1976. Control of myogenesis in vitro by chick embryo extract. *Devel. Biol.* **50**: 264-284.
- Snider, M. D. and O. C. Rogers, 1985. Intracellular movement of cell surface receptors after endocytosis: Resialylation of asialo-transferrin receptors in human erythroleukemia cells. *J. Cell Bio.* **100**: 826-834.
- Sorokin, L. M., E. H. Morgan, and G. C. T. Yeoh, 1988. Differences in transferrin receptor function between normal developing and transformed myogenic cells as revealed by differential effects of phorbol ester on receptor distribution and rate of iron uptake. *J. Biol. Chem.* **263**: 14128-14133.
- Turkewitz, A. t., A. L. Schwartz, and S. C. Harrison, 1988. A pH-dependent reversible conformational change of the human transferrin receptor leads to self-association. *J. Biol. Chem.* **263**: 16309-16315.
- Yoo, B. J., C. H. Lee, K. B. Kwak, C. H. Chung, and D. B. Ha, 1988. The presence in embryo extract of a myotrophic protein that affects proliferation and fusion of chick embryonic myoblasts in culture. *Korean J. Zool.* **31**: 207-217.

(Accepted July 30)

Effect of Fe^{3+} on Differentiation of Chick Embryonic Myoblasts Cultured *in vitro*

Byoung Je Yoo, Seung Wan Jee, Sang Ho Kim, Jong Kyung Sonn*, Bong Hee Min**, and Jae Sub Yang*** (Department of Biology and ***Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, **Department of Biology Education, College of Education, Taegu University, Kyungpook 713-714, and *Department of Biology Education, College of Education, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea)

Effects of Fe^{3+} on the differentiation and the proliferation of skeletal muscle cells *in vitro* were studied. Iron-free medium arrest the differentiation and the proliferation of myoblasts *in vitro* and therefore, it seemed that iron (Fe^{3+}) and transferrin (Tf) should be essential for the proliferation and the differentiation of myoblasts. Myoblasts cultured in the Tf-containing medium supplemented with Co^{2+} instead of Fe^{3+} were also normally differentiated. Lysosomotropic amines (chloroquine, μ M-level; ammonium chloride, mM-level) inhibited the differentiation and the proliferation of myoblasts *in vitro*, indicating that iron-dependency on the differentiation of myoblasts were decreased.

The pattern of endocytosized Tf of myoblasts in MEM was similar to that in 8102 medium, and the amounts of endocytosized Tf of myoblasts in MEM and 8102. Chloroquine at 10 μ M concentration and ammonium chloride at 10 mM concentration did not effect on the endocytosis of Tf at least by 3 hours.