

식이성 폴리페놀 (-)-epigallocatechin-3-gallate가 mouse C2C12 myoblast 분화에 미치는 영향

김혜진 · 이원준*

이화여자대학교 건강과학대학 체육과학과

Received January 24, 2007 / Accepted March 13, 2007

Effects of dietary polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the differentiation of mouse C2C12 myoblasts. Hye-Jin Kim and Won Jun Lee*. *Department of Exercise Science College of Health Science, Ewha Womans University* – In the present investigation, we studied the modulating effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on the differentiation of mouse C2C12 myoblasts. We found that the strong inhibitory effect of EGCG on DNA methyltransferase-mediated DNA methylation induced transdifferentiation of C2C12 myoblasts into smooth muscle cells demonstrated by both morphological changes and immunofluorescent staining. C2C12 myoblasts treated with EGCG for 4 days expressed smooth muscle α -actin protein. Real-time PCR data revealed that smooth muscle α -actin mRNA was induced by EGCG treated C2C12 myoblasts in a concentration-dependent manner. Smooth muscle α -actin mRNA concentration increased 330% and 490% after 2 and 3 days of 50 μ M of EGCG treatment. The expression of another smooth muscle marker, transgelin, mRNA was also increased up to 9-fold by 4 days of EGCG treatment compared with control in a concentration-dependent manner. These results suggested that C2C12 enables to transdifferentiate into smooth muscle when gene expression patterns are changed by the inhibition of DNA methylation induced by EGCG. In conclusion, transdifferentiation of C2C12 myoblasts into smooth muscle is resulted from the modulating effects of EGCG on DNA methylation which subsequently results in changing the expression pattern of several genes playing a critical role in the differentiation of C2C12 myoblasts.

Key words – DNA methylation, smooth muscle, differentiation, EGCG, C2C12 myoblasts

서 론

DNA 메틸화(methylation)란 DNA의 염기 중 cytosine 5 번째 탄소에 메틸 그룹(CH₃)이 첨가되는 반응이다. 이 반응은 DNA methyltransferase라는 효소에 의해 반응이 일어나며[7], 포유동물 세포내의 유전자 발현을 조절하는 중요한 기전이다. DNA 메틸화는 DNA coding sequence에는 변화가 없는 상태에서 세포의 분화[3], genomic imprinting[14], X-염색체불활성화(X-chromosome inactivation)[1], 발암과정(carcinogenesis)[18]등과 같은 다양한 기능을 함으로서 후천적 기작(epigenetic mechanism)이라고 불린다[16]. DNA 메틸화는 이러한 기능뿐만 아니라 특정 유전자의 발현을 조절하는데 있어 매우 중요한 역할을 한다. 유전자내 promoter에서의 DNA 메틸화는 유전자발현의 억제를 조절하며, 특히 거의 모든 암에서 DNA 과메틸화(hypermethylation)가 일어난다[6,8,9]. DNA는 항상 DNA 메틸화와 탈메틸화(demethylation)가 유기적으로 일어나면서 특정 유전자의 발현을 조절한다. 이와 같이 DNA 메틸화는 histone 메틸화와 histone 아세틸화와 함께 chromatin remodeling을 통한 유전자 발현과

억제에 중심적인 역할을 한다.

최근 많은 연구들이 DNA methyltransferase 효소 억제를 통해 새롭게 형성되는 DNA의 메틸화를 억제하고, 과메틸화로 인해 억제되었던 유전자의 재 발현에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 왜냐하면, 많은 종류의 암세포에서 cell cycle regulators[18,19], tumor suppressor genes[9,12,13], DNA repair genes[4]등과 같은 암세포의 증식을 조절하는 중요한 유전자들이 과메틸화로 인해 발현이 억제 또는 조절되기 때문이다. 또한 많은 유전자들의 발현을 조절하는 기전인 DNA 메틸화가 최근 암세포가 아닌 세포의 분화에도 영향을 미친다고 보고되고 있다. Cheng 등[2]은 mouse embryo 10T1/2 세포를 DNA 메틸화 억제제인 zebularine으로 처리한 후 10일이 경과하자 골격근의 대표적인 특징인 다핵의 myotube로 분화되었다고 보고하였다.

C2C12 myoblast는 근육으로 분화되기 전단계의 세포로서 여러 가지 호르몬이나 외부 자극에 의해 다핵의 myotube로의 형태적인 분화로 특정 지어진다. 많은 선행연구들이 골격근 세포에 기초한 근육 형성과정을 밝히는데 있어서 분화가 진행되지 않은 C2C12 세포를 많이 이용하였다. 대부분의 연구들은 C2C12 myoblast 세포를 배양한 후 confluent한 상태가 되면 분화 배지로 세포를 배양하여 myotube로의 분화를 유도하였으며[5,11,17,21], 이 과정에서 일어나는 근육 형성

*Corresponding author

Tel : +82-2-3277-2563, Fax : +82-2-3277-2846

E-mail : jun@ewha.ac.kr

과정의 분자적 기작을 연구하였다. C2C12 myoblast는 성체 조직 줄기 세포(adult tissue-specific stem cells)의 한 종류로서 다른 조직으로의 분화가 가능한 multipotent한 세포지만, 앞에서 언급하였듯이 주로 분화 배지 환경에서의 myotube로의 분화에 관련된 기전 연구가 주를 이루어 왔다. 따라서 유전자 발현에 중요한 역할을 하는 후천적 기작의 하나인 DNA 메틸화의 억제제가 C2C12 myoblast의 분화에 어떠한 영향을 미치는지와 과연 DNA 메틸화 억제제가 C2C12 myoblast를 myotube로 분화시킬 것인지에 대한 연구는 거의 이루어 지지 않았다.

많은 선행연구들에서 DNA 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine과 zebularine과 같은 일반적으로 널리 알려진 물질을 이용하여 DNA 메틸화를 연구하였으나, 여러 가지 부작용과 독성(toxicity)이 이러한 물질들을 사용하는데 있어서 큰 걸림돌이 되고 있다. 보다 효과적이고 비독성적인 DNA 메틸화 억제물질의 개발에 많은 연구가 집중되어, 많은 연구들이 대체물질에 대한 연구를 집중한 결과 음식물에 포함된 여러 가지 폴리페놀, 즉 마시는 차에 함유된 catechin과 과일에 다량 함유된 bioflavonoids들이 DNA 메틸화억제제로서의 역할을 한다는 것을 밝혀내었다[12,13]. 그 중 (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)는 최근 가장 주목받는 식이성 DNA 메틸화 억제제중 하나로서 catechol 구조를 포함하는 녹차에 함유되어 있는 폴리페놀(polyphenol)성분이다(Fig. 1). EGCG는 암세포의 증식에 관련된 유전자의 발현을 조절함으로써 암세포의 증식을 억제하는데 매우 효력이 있는 것으로 알려지고 있지만, 식이성 EGCG 폴리페놀이 골격근 C2C12 myoblast 세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 녹차에서 추출된 폴리페놀 EGCG가 C2C12 myoblast 세포 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 세포주

Fetal bovine serum, antibiotic, 세포배양 plate는 BioClone,

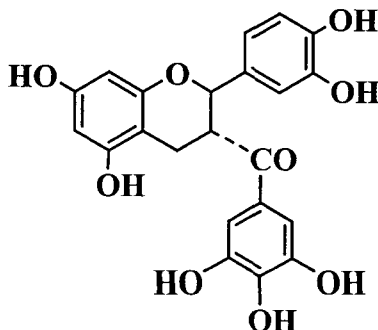


Fig. 1. Structure of (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)

Sigma, Falcon사로부터 각각 구입하였다. PCR primer는 Cosmo사로부터 제작하여 사용하였으며, EGCG는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다.

세포 배양 및 EGCG 처리

Mouse C2C12 myoblast 세포는 10% FBS(fetal bovine serum), 100 U/ml의 페니실린 G, 100 µg/ml streptomycin sulfate를 함유하고 있는 Dulbecco's Modified Eagles' Medium (DMEM) 을 이용하여 37°C(5% CO₂)의 incubator에서 배양하였다. 세포는 30 mm plate에 2 ml당 1x10⁴ 세포를 분주하고 24시간 후 여러 가지 농도 (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µM)의 EGCG를 처리하여 4일 동안 배양하였다. 배지는 3일 후 교환해 주었으며, EGCG 또한 배지 교환 시 재처리하였다. EGCG 처리 시간의 경과에 따른 smooth muscle α-actin과 transgelin mRNA의 변화를 알아보기 위하여 C2C12 세포를 분주한 뒤 24시간 후 50 µM의 EGCG를 0, 24, 48, 72시간동안 처리하였다.

Immunofluorescent staining

C2C12 myoblast 세포를 6 wells 배양 plate에 고정(fix)시키기 위하여 3.7 % formaldehyde (pH 7-8)를 함유하고 있는 PBS 1ml를 각각의 well에 10분간 처리하였다. 그 후 PBS 용액으로 fix된 세포를 씻어낸 후 0.2 % trinton X-100과 10 % goat serum을 포함하고 있는 PBS로 상온에서 15 분간 처리하여 세포를 permeabilization을 시켰다. 다음은 C2C12 myoblasts 세포에 mouse IgG smooth muscle α-actin primary 항체 (Sigma, St. Louis, MO)를 1:1000 비율로 희석시킨 600 ml를 각각의 well에 상온에서 30분간 배양시켰다. 다음 세포는 PBS로 3번 씻은 후 1:250 비율로 희석된 Alexa488-conjugated goat anti-mouse IgG secondary 항체(Molecular Probes, Eugene, OR)로 상온에서 30분간 더 배양하였다. 마지막 단계로서 세포를 PBS로 3번 헹군 후 핵의 변화를 살펴보기 위하여 1.5µg/ml의 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 이용하여 세포를 staining한 후 PBS로 3번 헹구어 내었다. 세포 배양 plate상에서의 smooth muscle α-actin protein 단백질의 발현 정도는 디지털 이미지 system을 갖춘 Axiovert 200 epifluorescence 현미경(Zeiss, Germany)을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

Total RNA 추출과 cDNA 합성

대조군과 EGCG로 처리된 세포를 TRIzol reagent(Life Technologies, Grand Island, NY)를 각 well당 600 µl 넣은 후 total RNA를 RNeasy RNA extraction kit(Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 얻었다. 추출된 RNA를 ultrapure water에 용해시킨 후 UV 260 nm에서 농도를 측정하였다. 그 다음 0.5 µg의 total RNA와 first strand cDNA synthesis

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primers	Reverse primers
Smooth muscle α -actin	CAGGCATGGATGGCATCAATCAC	ACTCTAGCTGTGAAGTCAGTGTCG
Transgelin	ACCAAGCCTTCTCTGCCCTAAC	GCCCACTGCACTACAATCCAC
GAPDH	ATGACAATGAATACGGCTACAGCAA	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT

kit(Roche)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성조건은 25 °C에서 10분, 42 °C에서 60분, 95 °C에서 5분순으로 진행되었고, final volume은 20 μ l였다.

Real-time qunatitative PCR

Transgelin(smooth muscle 22 protein)과 smooth muscle α -actin messenger RNA(mRNA) 발현을 측정하기 위하여, double-stranded DNA dye인 SYBR Green(Perkin Elmer, Boston, MA)을 이용하여 fluorescence real-time PCR을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 primer sequence는 Table 1에 나타난 바와 같다. SYBR Green 분석은 ABI PRISM 7700 system(Perkin Elmer, Applied Biosystems)을 이용하였으며, 모든 샘플은 최소한 2회 이상 반복 측정하였으며, 각각의 target mRNA의 발현은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) mRNA양으로 보정하였다.

결 과

Immunofluorescent staining

다양한 농도의 EGCG를 C2C12 myoblast 세포에 4일간 처리한 후 phase 상에서의 사진을 관찰한 결과 형태학적인 측면에서 C2C12 myoblast가 EGCG 처리 후 smooth muscle 세포로 분화되는 것을 관찰하였다. 세포의 형태로 보았을 때 Fig. 2a 에서 보는 바와 같이 대조군에서는 C2C12 myoblast 세포의 형태가 둥근 형태를 보이며, plate상에 1X10⁴로 세포를 분주한 후 4일이 경과하자 세포의 수가 많이 증식되었음을 확연히 관찰할 수 있다. 하지만 EGCG로 처리한 후 4일이 경과하자 Fig. 2c의 phase 사진에서 보듯이 C2C12 myoblast 세포의 형태가 elongation이 되었고 주변 세포들과의 fusion이 일어나서 smooth muscle의 형태를 보임을 알 수 있다. 또한 세포를 분주한 후 4일이 지났음에도 불구하고 EGCG로 처리한 세포에서는 세포의 밀도가 대조군에 비해서 확연히 낮음을 볼 수 있다. 세포의 증식 정도를 좀 더 명확히 알기 위하여 DAPI로써 C2C12 myoblast 세포의 핵을 염색하였다. Fig. 2의 b와 d에서 보듯이 파란색으로 염색된 것이 각 세포의 핵을 나타낸다. Fig. 2의 b에서 보듯이 대조군에서는 핵의 숫자가 EGCG 처리된 세포에 비해 그 수와 밀도가 많이 증가하였음을 알 수 있다. 본 연구에서는 서론에서 언급하였듯이 C2C12 세포를 분화배지 조건에서 배양을 하지 않고, 10% FBS 상태에서 EGCG를 처리하였다. 따라서 핵의 숫자가 EGCG 처리군에 비해 대조군에서 확연히 높다는 것은

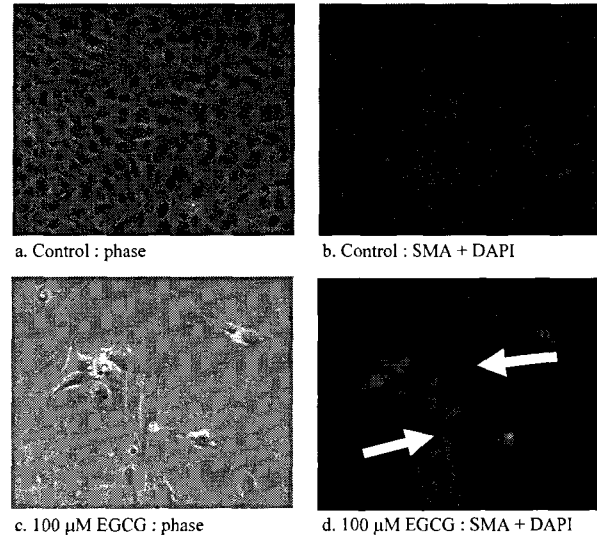


Fig. 2. Immunofluorescent staining images of differentiating C2C12 myoblasts after EGCG treatment. Smooth muscle α -actin and DAPI immunofluorescence and corresponding phase contrast images. Smooth muscle α -actin(SMA) is stained fluorescent green(arrow) and nuclei are fluorescent blue.

EGCG가 세포의 증식을 억제하는 역할을 한다고 사료된다. 또한 이러한 결과가 단지 EGCG의 독성에 의한 결과일 가능성을 생각해 보지 않을 수 없다. 만약 독성에 의한 증식 억제라면 세포의 숫자에서는 EGCG 처리군이 적다고 하더라도 형태적으로도 같은 모양이 관찰되어야 할 것이다. 하지만, Fig. 2c의 phase 사진에서 보듯이 형태적으로 대조군과 비교하였을 때 전혀 다른 형태의 세포로 분화되었음을 알 수 있다.

Transgelin mRNA

Transgelin 유전자는 smooth muscle에 특징적으로 발현되는 유전자로서 smooth muscle의 지표(marker)로서 널리 쓰이고 있다. 따라서 C2C12 myoblast 세포에 EGCG를 4일간 처리한 후 smooth muscle marker인 transgelin mRNA에 어떠한 변화가 일어났는지를 real-time PCR을 이용하여 살펴보기 위하여 세포를 6 wells plate에 1X10⁴으로 분주를 한 후 24시간 후 EGCG를 대조군에는 처리하지 않았으며, EGCG 처리 군에는 각각 다른 농도(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μ M)로서 4일간 처리하였다. 그 결과 EGCG로 4일간 처리한 세포에서는 transgelin mRNA 발현이 대조군 세포와 비교하였을 때 농도 의존적으로 증가함을 보여준다(Fig. 3). 가장 낮

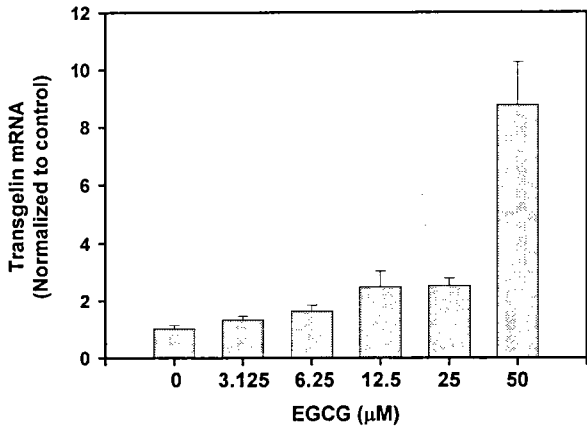


Fig. 3. Real-time PCR analysis of transgelin mRNA after treatment with EGCG for 4 days in C2C12 myoblasts. C2C12 cells were treated with 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, or 50 μM of EGCG for 4 days. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean ± S.E. of 3 parallel replica experiments.

은 농도인 3.125 μM에서는 transgelin mRNA 발현이 대조군 세포와 비교하였을 때 34%정도 유의하게 증가하였다. 더 나아가 6.25 μM의 EGCG는 transgelin mRNA 발현을 63% 정도 유의하게 증가시켰으며, 12.5 μM의 EGCG로 처리된 C2C12 myoblast 세포에서는 148% 정도 증가치를 나타내었다. 본 실험에서 사용한 EGCG의 농도 중 최고 농도인 50 μM의 EGCG를 4일간 처리하자 transgelin mRNA 발현이 약 9배정도 유의하게 증가되었다. 본 실험의 mRNA 결과는 real-time PCR을 실시할 때 각각 샘플의 cDNA copy 수를 보정하기 위하여 transgelin mRNA 발현 정도를 각 샘플의 GAPDH mRNA로 보정하였다.

시간의 변화에 따른 transgelin mRNA 발현 정도를 살펴 보기 위하여 50 μM의 EGCG를 각각 24, 48, 72 시간 동안 C2C12 myoblast 세포에 처리한 후 transgelin mRNA 발현 변화를 살펴보았다(Fig. 4). 50 μM의 EGCG을 24시간동안 세포에 처리한 결과 transgelin mRNA 발현은 대조군과 비교하였을 때 변화가 없었지만 48시간과 72시간동안 EGCG를 처리한 후에는 5-6배 가까이 유의하게 증가하였다.

Smooth muscle α-actin mRNA

앞에서 언급한 바와 같이 4일 동안 EGCG를 C2C12 myoblast에 처리 후 smooth muscle α-actin 단백질이 발현됨을 immunofluorescent staining을 통해 입증하였다. 본 연구에서는 더 나아가 EGCG가 smooth muscle α-actin mRNA의 발현에 어떠한 영향을 미쳤는지를 알아보기 위해 smooth muscle α-actin primer를 이용하여 real-time PCR을 실시하였다(Fig. 5). EGCG의 농도가 낮을 때(3.125, 6.25 μM) C2C12 myoblast 세포에서의 smooth muscle α-actin mRNA 발현은

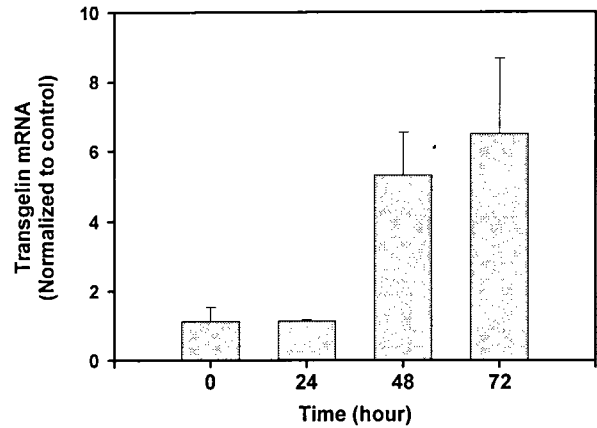


Fig. 4. Real-time PCR analysis of transgelin mRNA after treatment with EGCG at different time points. C2C12 cells were treated with 50 μM of EGCG for 0, 24, 48, or 72 hours. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean ± S.E. of 3 parallel replica experiments.

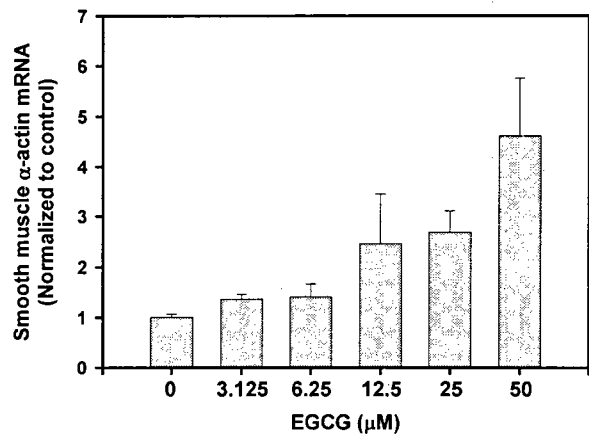


Fig. 5. Real-time PCR analysis of smooth muscle α-actin after treatment with EGCG for 4 days in C2C12 myoblasts. C2C12 cells were treated with 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, or 50 μM of EGCG for 4 days. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean ± S.E. of 3 parallel replica experiments.

대조군과 비교하였을 때 적은 폭이지만 유의하게 약 40%정도 증가하였다. 농도가 점점 더 높아질수록 smooth muscle α-actin mRNA는 이에 비례하여 증가하는 경향을 보였으며, 가장 높은 농도인 50 μM의 EGCG는 C2C12 myoblast 세포의 smooth muscle α-actin mRNA 발현을 약 4.5배정도 유의하게 증가시켰다.

시간에 따른 smooth muscle α-actin mRNA의 발현 변화를 보기 위하여 50 μM의 EGCG로 세포를 처리한 후 24, 48, 72 시간이 경과한 후 각 시점에서 mRNA 농도 변화를 살펴본 결과 transgelin mRNA 발현 변화와 비슷한 경향으로 증가하

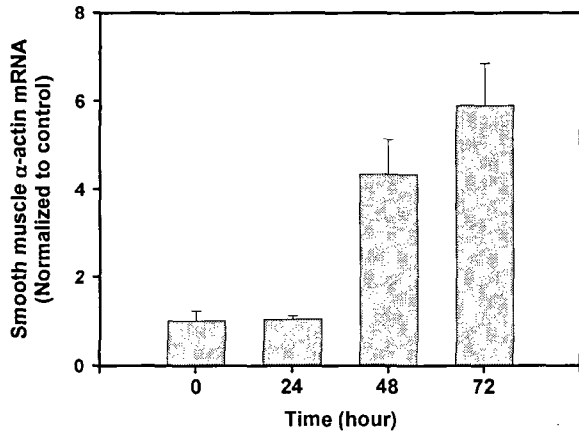


Fig. 6. Real-time PCR analysis of smooth muscle α-actin after treatment with EGCG at different time points. C2C12 cells were treated with 50 μM of EGCG for 0, 24, 48, or 72 hours. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean ± S.E. of 3 parallel replica experiments.

였으며, 72시간 처리 후에는 약 6배정도 대조군과 비교하였 때 smooth muscle α-actin mRNA가 증가하였다(Fig. 6).

고찰

DNA 메틸화와 같이 DNA 염기서열의 변화 없이 유전자의 발현을 조절하는 기전인 후천적 기작은 최근에 많은 연구들에 의해 더욱 더 그 중요성이 증대되고 있는 것이 사실이다[3,16,18]. 따라서 많은 연구들이 진행되고 있는 상황에서 그 역할과 중요성이 하나씩 밝혀지고 있지만 대부분의 연구들이 인류의 불치병의 하나로 여겨지는 암세포에서의 DNA 메틸화의 연구가 주로 진행되어 왔다. 또한 이제까지의 많은 연구들이 가장 보편적으로 널리 알려진 DNA 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine과 zebularine 등과 같은 물질에 대한 연구가 주를 이루어 왔으나, 이러한 물질들이 세포내에 미치는 여러 가지 부작용과 독성(toxicity)으로 인해 최근 부작용과 독성이 없는 DNA 메틸화 억제제의 대체 물질에 대한 관심이 한층 고조되고 있는 실정이다.

EGCG와 같은 식이에 함유된 폴리페놀(polyphenols) 성분이 우리 인체에 이롭다는 것은 최근 많이 연구를 통해 알려지고 있다. 특히 많은 연구들이 녹차가 암을 예방하고 암세포의 증식을 막는 작용을 한다고 보고하면서, 많은 사람들이 녹차에 관심을 가지고, 또한 실질적으로 복용하고 있다. 단지 암세포에서의 DNA 메틸화가 가지는 기능뿐만 아니라 다른 세포에서의 DNA 메틸화의 중요성과 기능에 대한 연구에 대한 관심이 한층 고조되고 있다. 이러한 연구들에서 도출된 결론은 DNA 메틸화를 포함한 histone 메틸화, histone 아세틸화(acetylation)와 같은 후천적 기작이 세포 운명의 전환

(cell-fate conversion)에 중심적인 역할을 하는 기작이라는 것이다. 최근의 연구는 histone deacetylase 억제제인 valproic acid와 DNA 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine가 골수세포(bone marrow stromal cell)를 신경 줄기 세포(neural stem cell)로 전환시킨다는 것을 보고하였다[20,24]. 또한 DNA 메틸화 억제제인 zebularine과 5-aza-2'-deoxycytidine으로 mouse embryo 10T1/2 줄기세포를 처리하자 골격근 형성에 있어서 필수적인 요소인 다핵(multinucleated)의 myotube로 분화되는 것을 관찰하였다[2]. 이렇듯, 과거에는 성체 조직 줄기 세포(adult tissue-specific stem cells)는 embryonic 줄기세포가 다른 조직으로 분화할 수 있는 pluripotent한 능력을 가지고는 있는 것과는 달리 일반적으로 그 조직에 제한된 lineage-restricted progenies라고 봤던 이론에 반하여 최근에 들어 성체 조직 줄기세포 또한 다양한 조직으로의 분화가 가능하다는 것을 밝혀지게 되었다[10,25]. 하지만, 현재까지 폴리페놀 성분으로서 DNA 메틸화 억제제로 알려진 EGCG가 mouse C2C12 myoblast 세포 분화에 미치는 영향에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않았다.

본 연구에서 EGCG를 사용한 이유는 앞서 언급하였듯이 EGCG가 녹차에 많이 함유된 catechol을 포함하고 있는 폴리페놀로서 많은 선행 연구에서 DNA 메틸화를 억제시키는 효과를 나타내었기 때문이다[4,12]. 비록 catechol 구조를 함유하고 있는 여러 가지 다른 폴리페놀들, 예를 들어, catechin, epicatechin, quercetin, fisetin, myricetin, caffeic acid, chlorogenic acid들도 DNA 메틸화를 억제시켰지만 EGCG가 가장 강력하게 DNA 메틸화를 억제하였다[4,12,13]. 배양된 유방암 세포인 MCF-7과 MDA-MB-231 세포에 EGCG를 처리하자 종양억제 유전자(tumor suppressor genes)인 retinoic acid receptor-β(RAR-β)의 메틸화가 현저히 줄어들며, 그로인해 억제되었던 RAR-β유전자의 mRNA와 단백질이 재 발현되었다[4,12]. 또한 EGCG는 일반적인 폴리페놀 성분이 조직내의 catechol-O-methyltransferase(COMT) 효소에 의한 폴리페놀 자체의 메틸화에 의해 생성되는 S-adenosyl-homocysteine(SAH)의 증가에 의한 feedback 기전에 의해 DNA 메틸화를 억제하는 것과는 달리 EGCG의 DNA 메틸화 억제 기전은 modeling 연구에서 직접적으로 DNA methyltransferase 효소와 결합을 함으로서 탁월한 억제기능을 발휘한다고 보고하였다[12,13]. 다른 폴리페놀 성분과는 달리 EGCG만이 가지고 있는 독특한 구조인 gallic acid moiety가 높은 친화력(affinity)으로 DNA methyltransferase의 catalytic site와 결합하기 때문이다(Fig. 1). 이와 같이 많은 폴리페놀 중 EGCG의 독특한 화학구조가 DNA 메틸화를 억제하는데 있어서 중요한 역할을 하며, 이로 인해 많은 연구들이 암 예방 차원에서 EGCG의 효능을 연구하는 주된 이유가 되고 있다. 이러한 강력한 EGCG의 DNA 메틸화 억제작용이 암세포에서 여러 가지 유전자의 발현을 조절하듯이 암세포

가 아닌 C2C12 myoblast 세포의 분화와 관련 유전자 발현에 영향을 미칠 것이라는 가설 아래 본 연구에서는 최대 50 μM 의 EGCG를 4일 동안 mouse C2C12 myoblast 세포에 처리하였다.

4일간의 EGCG 처리가 C2C12 myoblast 세포를 형태적 관점에서 보았을 때 smooth muscle의 형태로 변화시켰으며, 이러한 결과를 분자적으로 검증하기 위하여 smooth muscle의 지표로 널리 알려진 smooth muscle α -actin 단백질의 발현 정도를 immunofluorescent staining 방법을 이용하여 알아보았다. Fig. 2의 d에 나타난 것과 같이 초록색(화살표)으로 나타난 부분이 smooth muscle α -actin 항체에 의해 염색된 smooth muscle α -actin 단백질이다. Fig. 2의 a와 b에서 보듯이 대조군에서는 세포 증식에 의해 핵이 많이 증가하였지만, smooth muscle α -actin 단백질은 전혀 찾아볼 수 없다. 반면, EGCG로 4일 동안 처리된 C2C12 myoblast 세포에서는 smooth muscle α -actin 단백질의 발현을 확연히 관찰할 수 있었다. 또한 EGCG의 농도가 증가하면 할수록 plate 상에서 세포의 증식은 점점 줄어드는 반면, smooth muscle α -actin의 발현 빈도는 증가하였다. 이러한 결과는 EGCG가 C2C12 myoblast 세포에서 smooth muscle로의 분화를 촉진함을 분자적 수준에서 보여주는 것이다. smooth muscle α -actin은 혈관벽 또는 smooth muscle을 가지고 있는 여러 조직에서 발견된다. smooth muscle α -actin은 사실상 발아의 심장근이나 골격근의 분화(embryonic differentiation)과정에서 일시적으로 나타나지만 성인의 심장이나 골격근에서는 나타나지 않는다. Springer 등[23]은 C2C12 골격근 myoblast로부터 기인된 myotube에서 smooth muscle α -actin 단백질이 일시적으로 발현된다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 관찰된 smooth muscle α -actin의 발현으로서 smooth muscle로 분화가 되었다고 단정하기는 어려울 것이라는 가능성을 배제할 수 없었다. 하지만 형태학적으로는 물론 골격근 myotube의 가장 큰 특징 중 하나인 다핵(multinucleated)을 가진 세포 또한 관찰할 수 없었다. smooth muscle α -actin을 발현하는 세포들에서 한 개 또는 두 개의 핵이 존재하였으며, 이러한 한 개 또는 두 개의 핵 수는 smooth muscle에서 나타나는 전형적인 특징 중 하나이다. 또한, 세포의 형태로 보았을 때 EGCG를 처리한 초기에는 길어지는 elongation 현상이 일어났으며, 시간이 점점 더 흐름에 따라 주위의 세포들과 fusion 현상이 일어나면서 형태가 매우 커지는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 근육 myotube가 형성될 때에도 나타나지만, myotube 형성 시에는 굵지만 길고 긴 형태의 tube 모양이 일반적으로 나타난다. 하지만 본 연구에서의 세포 형태는 일반적인 공통점을 찾기 어려울 만큼 다양한 형태의 세포가 형성되었다. 즉, 세포의 형태, 핵의 수, smooth muscle α -actin의 발현을 종합해 볼 때 EGCG가 C2C12 myoblast 세포를 smooth muscle로 분화시킴을 검증할 수 있었다.

본 연구에서는 한층 더 나아가 smooth muscle의 marker인 transgelin과 smooth muscle α -actin mRNA의 변화를 살펴보았다. 그 결과 4일간의 EGCG를 처리한 C2C12 myoblasts 세포에서 transgelin과 smooth muscle α -actin mRNA의 발현이 최대 약 9배와 5배 정도 각각 대조군에 비해 증가함을 나타냈다. 시간적인 개념으로 보았을 때 24시간 동안의 50 μM EGCG는 transgelin과 smooth muscle α -actin mRNA 발현에 영향을 미치지 않았으나, 50 μM 의 EGCG를 48시간, 72시간 동안 C2C12 myoblast 세포에 처리한 후 transgelin과 smooth muscle α -actin mRNA는 약 5-6배 정도 대조군에 비해 높게 발현됨을 나타내었다. 이러한 결과를 바탕으로 볼 때 식이성 폴리페놀인 EGCG가 mouse C2C12 myoblast 세포에서 중요한 후천적(epigenetic) 유전자 발현기전인 DNA 메틸화를 조절함으로써 골격근으로의 분화가 아닌 smooth muscle로의 분화를 유도함을 다시 한 번 검증할 수 있었다.

Smooth muscle 세포는 혈관의 발달과 혈관질환의 형성과 진행에 있어서 중요한 역할을 하지만, smooth muscle의 분화를 조절하는 기전에 대한 이해는 매우 부족한 실정이다. 이러한 smooth muscle의 분화기전에 대한 연구가 어려운 가장 큰 이유 중 한 가지는 골격근 발달과 분화 초기단계의 연구에 주로 사용되는 C2C12 세포와 10T1/2 세포에 상응하는 좋은 *in vitro* 분화 시스템이 부족하기 때문이다[15]. 이러한 문제를 해결하기 위하여 몇몇 학자들이 mouse embryonal carcinoma(p19)세포, 신경관 줄기세포(neural crest stem cell), mouse embryonic 10T1/2 세포를 smooth muscle로 전이분화(transdifferentiation)를 유도함으로써 초기 분화단계에 대한 기초연구를 수행하기에 이르렀다[22]. 따라서 본 연구에서 보고한 mouse C2C12 세포가 녹차 추출성분인 EGCG에 의해 smooth muscle로의 전이분화는 smooth muscle의 형성과 분화초기의 연구에 있어서 훌륭한 시스템을 제공할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 유전자 발현에 중요한 조절 역할을 하는 DNA 메틸화를 식이성 폴리페놀의 하나인 녹차의 대표적인 추출물 EGCG로 억제하였을 때 C2C12 myoblast 세포에 일어나는 현상을 살펴보았다. 그 결과 smooth muscle의 지표인 transgelin, smooth muscle α -actin mRNA와 단백질이 현저히 증가함을 보였고, 형태학적으로도 smooth muscle의 전형적인 모습을 보였다. 식이에 포함된 DNA 메틸화 억제제인 EGCG가 C2C12 myoblast를 smooth muscle로 분화를 유도하였으며, 암 예방 차원에서의 EGCG의 역할 외에 혈관질환과 같은 smooth muscle에 관련된 예방과 치료차원에서 EGCG의 역할이 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 C2C12 myoblast를 smooth muscle로 유도하는 결정적인 신호전달

역할을 하는 유전자에 대한 연구는 수행하지 못하였다. 따라서 EGCG에 의해 변화되는 유전자에 대한 기전연구가 필요하다고 하겠다.

감사의 글

본 연구는 이화여자대학교 신입교수연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. Beard, C., E. Li and R. Jaenisch. 1995. Loss of methylaiton activates Xist in somatic but not embryonic cells. *Genes & Development* **9**, 2325-2334.
2. Cheng, J. C., C. B. Matsen, F. A. Gonzales, W. Ye, S. Greer, V. E. Marquez, P. A. Jones and E. W. Selker. 2003. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 399-409.
3. Esteller, M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427-5440.
4. Fang, M. Z., Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh and C. S. Yang. 2003. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced gene in cancer cell lines. *Cancer Research* **63**, 7563-7570.
5. Fanzani, A., F. Colombo, R. Giuliani, A. Preti and S. Marchesini. 2006. Insulin-like growth factor 1 signaling regulates cytosolic sialidase Neu 2 expression during myoblast differentiation and hypertrophy. *FEBS Journal* **273**, 3709-3721.
6. Herman, J. G. 1999. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **9**, 359-367.
7. Herman J. G. and S. B. Baylin. 2004. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine* **349**, 2042-2054.
8. Jones, P. A. and P. W. Laird. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics* **21**, 163-167.
9. Jones, P. A. and S. B. Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Review of Genetics* **3**, 415-428.
10. Kondo, T. 2006. Epigenetic alchemy for cell fate conversion. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**, 502-507.
11. Langen R. C., A. M. Schols, M. C. Kelder, J. L. Van Der Velden, E. F. Wouters and Y. M. Janssen-Heininger. 2002. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox dependent and -independent pathways. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **283**, C714-C721.
12. Lee, W. J. and B. T. Zhu. 2005. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Molecular Pharmacology* **68**, 1018-1030.
13. Lee, W. J. and B. T. Zhu. 2006. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* **27**, 269-277.
14. Li, E., C. Beard and R. Jaenisch. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **336**, 362-365.
15. Manabe, I. and G. K. Owens. 2001. Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system. *Circulation Research* **88**, 1127-1134.
16. Momparler, R. L. 2003. Cancer epigenetics. *Oncogene* **22**, 6479-6483.
17. Park, I. H., E. Erbay, P. Nuzzi and J. Chen. 2005. Skeletal myocyte hypertrophy requires mTOR kinase and S6K1. *Experimental Cell Research* **309**, 211-219.
18. Paz, M. F., M. F. Fraga, S. Avila, M. Guo, M. Pollan, J. G. Herman and M. Esteller. 2003. A systemic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Research* **63**, 1114-1121.
19. Schmelz, K., M. Wagner, B. Dorken and I. Tamm. 2005. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces p21WAF expression by demethylation of p73 leading to p53-independent apoptosis in myeloid leukemia. *International Journal of Cancer* **114**, 683-695.
20. Schmittwolf, C., N. Kirchhof, A. Jauch, M. Durr, F. Harder, M. Zenke and A. M. Muller. 2005. in vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents. *EMBO Journal* **24**, 554-556.
21. Spangenburg, E. E., D. K. Bowles and F. W. Booth. 2004. Insulin-like growth factor-induced transcriptional activity of the skeletal alpha-actin gene is regulated by signaling mechanisms linked to voltage-gated calcium channels during myoblast differentiation. *Endocrinology* **145**, 2054-2063.
22. Spin, J. M., S. Nallamshetty, R. Tabibiazar, E. A. Ashley, J. Y. King, M. Chen, P. S. Tsao and T. Quertermous. 2004. Transcriptional profiling of in vitro smooth muscle cell differentiation identifies specific patterns of gene and pathway activation. *Physiological Genomics* **19**, 292-302.
23. Springer, M. L., C. R. Ozawa and H. M. Blau. 2002. Transient production of alpha-smooth muscle actin by skeletal myoblasts during differentiation in culture and following intramuscular implantation. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **51**, 177-186.
24. Woodbury, D., K. Reynolds and I. B. Black. 2002. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research* **69**, 908-917.
25. Wu, H. and Y. E. Sun. 2006. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatric Research* **59**, 21R-25R.