

Insulin-like Growth Factor-I Induces Plectin and MACF1 Expression in C2C12 Myotubes

Hye Jin Kim¹, Ji Sun Hwang¹, Yi-Sub Kwak² and Won Jun Lee^{1*}

¹Department of Exercise Science, College of Health Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

²Department of Physical Education, College of Sport Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received October 19, 2012 / Revised November 28, 2012 / Accepted December 5, 2012

Plectin and microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) are architectural proteins that contribute to the function of skeletal muscle as generators of mechanical force. However, the influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I), a master regulator of skeletal muscle cells, on plectin and MACF1 in skeletal muscle cells has not been demonstrated. The effect of IGF-I on plectin and MACF1 gene expression was investigated by treating differentiated C2C12 murine skeletal muscle cells with 20 ng/ml of IGF-I at different time points. The IGF-I treatment increased plectin protein expression in a dose-dependent manner. The mRNA level of plectin was measured by real-time quantitative PCR to determine if plectin induction was regulated pretranslationally. IGF-I treatment resulted in a very rapid induction of plectin mRNA transcript in C2C12 myotubes. Plectin mRNA increased by 140 and 180% after 24 and 48 hours of IGF-I treatment, respectively, and returned to the control level after 72 hours of IGF-I treatment. MACF1 mRNA increased 86 and 90% after 24 and 48 hours of IGF-I treatment, respectively, and returned to the control level after 72 hours of IGF-I treatment. These results suggested that the plectin gene is regulated pretranslationally by IGF-I in skeletal muscle cells. In conclusion, IGF-I induces a rapid transcriptional modification of the plectin and MACF1 genes in C2C12 skeletal muscle cells and has modulating effects on a cytolinker protein as well as on contractile proteins.

Key words : Skeletal muscle cell, cytoskeleton, cytolinker proteins, insulin-like growth factor-I (IGF-I), plectin, microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1)

서 론

세포 골격(cytoskeleton)은 세포내막과 핵외막 사이 세포질 기질에 뻗어 있는 형태로 존재하며 세포의 움직임과 형태 유지 및 세포내 물질 수송과 유사분열(mitosis) 등 생존에 필수적인 역할을 하고, 세포 외부로부터의 자극을 세포 내부로 전달하는 신호전달의 매개체로서 중요한 역할을 한다[16,27,30]. 이러한 세포 골격은 액틴(actin)/마이오신(myosin), 미세소관(microtubule), 그리고 중간 필라멘트(intermediate filament)라는 세 가지 섬유 단백질로 구성되어 있다[30]. 이 섬유들은 plakins라 불리는 연결 단백질(linker protein)을 통해 세포내막과 연결되고, 세포 연결(cell junction) 및 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)에 결합하여 세포의 형태를 유지하며, 세포 내 신호 전달 체계(intracellular signaling pathway)에 연결된다[26]. 이렇듯 세포 골격을 연결하는 부수적인

단백질 분자들은 세포의 특성 유지 및 세포-세포간 상호작용과 신호전달 기능을 가능하게 해준다.

지금까지 7개의 Plakin family가 발견되었는데 desmoplakin, plectin, envoplakin, periplakin, epiplakin, microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1), 그리고 bullous pemphigoid antigen1 (BPAG1)이 속해있으며, 피부, 신경 및 근육 세포를 포함한 다양한 조직들에서 세포골격 요소들과 부차 구조의 안정성을 매개하는 능력을 가진다[4].

Plectin은 포유류의 세포 및 조직에서 높게 발견되며 세포골격과의 교차결합(cross-linking)에 필수적인 요소로 알려진 연결 단백질 중 하나이다[30]. Plectin은 골격근에서 근섬유를 둘러싸고 있는 근초(sarcolemma)의 내막으로부터 뻗어있는 중간 필라멘트와 근섬유의 Z선을 연결하는 desmin 단백질과 함께 복합체를 이루어 Z선 내에 위치하고 있으며[14], 액틴 섬유와도 연결되는 결합영역(binding domain)을 가지고 있어 다양한 세포골격 단백질들과의 연결 능력을 가지고 있다[1,10,30]. Z선과 중간 필라멘트를 연결해주는 costamere 뿐만 아니라 골격근 세포의 미토콘드리아(mitochondria)와 핵(nuclei)을 지지하는 세포 골격들과의 연결에도 중요한 역할을 한다[18]. 또한 Plectin은 심장근육(cardiac muscle)의 세포들을 연결하여 심장의 기계, 전기적 활동을 조절하는 구조물인 사이원반(intercalated disc)에서도 desmin과 함께 중요한 지

*Corresponding author

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

E-mail : jun@ewha.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지대로써의 역할을 한다[5].

MACF1은 actin cross-linking factor 7 (ACF7)이라고도 부르며, 다양한 조직들에서 미세소관 및 액틴과 연결된다. 이는 쥐 배아(embryo)의 신경계에서 높게 발현되며, 그 다음으로 골격근과 심근(myocardium)에서 높게 발현된다고 보고되어 있다[20]. MACF1은 골지체(golgi complex)의 구조 안정성 및 유지에 중요한 역할을 하며, 상피세포(epithelial cell)와 그 아래 조직을 강하게 부착시키는 역할을 하는 반접착반(hemidesmosome)과 피부, 손톱 등을 구성하는 케라틴(keratin)을 포함한 중간 필라멘트를 연결하는 역할을 한다[21]. 포유류뿐만 아니라 초파리(*Drosophila melanogaster*)와 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서도 MACF1 과 상동성을 가지는 Kakapo/shortstop (shot)라는 유전자가 존재하는데, 이들 역시 근육 발생 및 구조적 안정성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[13].

최근 골격근에 있어 IGF-I (insulin-like growth factor-I)이라는 성장 인자에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다. IGF-I은 인슐린과 화학적으로 유사한 구조를 가지고 있어 인슐린 유사 성장인자로도 불리며, 중, 고강도의 운동 시 약 10 분 내에 체내 분비량이 약 10-30% 증가하였다고 보고된 바 있다[19,28]. 또한 IGF-I은 근육 세포의 증식(proliferation) 및 분화(differentiation)과정에 있어 중심적인 역할을 하며, 근육 관련 전사 인자(transcription factor)들의 발현을 증가시키고 근단백질의 합성을 증가시켜 골격근의 발달, 성장, 회복, 그리고 근부피 유지 및 증대에 필수적인 요소로 알려져 있다[3,7,11].

이와 같이 골격근에서 IGF-I의 중요성을 주장하는 연구들이 상당히 많이 진행되어 왔으며, 근육조직 및 세포에서 IGF-I에 의한 근육관련 유전자 발현과 신호 전달 체계에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 세포의 구조 안정화 및 골격근의 근수축 기전에 관여하는 세포 골격 단백질 및 연결 단백질들에 있어 IGF-I이 어떠한 영향을 미치는가에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 IGF-I이 골격근 구조의 안정화 및 수축 기전에 필수적인 역할을 하는 plectin과 MACF1 유전자 발현 조절에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약 처리

본 연구에서 사용한 C2C12 골격근 세포는 American Type of Culture Collection (ATCC, USA)으로부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml의 penicillin G, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate (Welgene, Korea)를 함유하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, Korea)으로 37°C, 5%

CO₂의 환경에서 배양하였다. 세포는 35 mm plate에 2.5×10⁵개씩 분주하고 90% 이상 자라면, 배지를 제거하고 2% horse serum (HS) (Hyclone, Logan, UT)이 함유된 분화 배지, IGF-I을 함유한 분화배지로 각각 교체하여 배양하였다. Plectin과 MACF-1 유전자의 단백질 및 mRNA 발현의 변화를 알아보기 위하여 시간에 따라 20 ng/ml의 IGF-I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)을 처리하였다.

면역 형광 염색

C2C12 세포를 PBS로 한번 씻어낸 뒤, plate에 고정시키기 위하여 1 ml의 4% formaldehyde를 상온에서 20 분간 처리한 뒤 TBS로 2번 씻어내고, 0.2% triton X-100을 함유한 TBS (0.2% TBST)로 5 분간 상온에서 permeabilizing 하였다. 그 다음 0.1% TBST로 5 분간 3번 씻어낸 후 5% BSA를 함유한 0.1% TBST로 상온에서 1 시간 동안 blocking 하였다. 이후 TBS로 한번 씻어낸 뒤 3% BSA를 함유한 TBS에 Plectin polyclonal rabbit antibody, α-tubulin monoclonal mouse antibody (Abcam, Cambridge, UK)를 각 1:500으로 희석하여 4°C에서 12 시간 동안 반응시켰다. 그 후, 0.1% TBST로 5 분간 3번 씻어낸 뒤 alexa 594-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody, alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)를 3% BSA에 1:250으로 희석하여 상온에서 20 분간 반응시킨 후 0.1% TBST로 5 분간 3번 씻어내었다. 사진은 digital imaging system이 갖춰진 Axiovert 200 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany)로 촬영하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA추출은 TRIzol 용액(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 이용한 phenol-chloroform 기법을 사용하였다. TRIzol 용액을 well당 각각 1 ml 씩 넣고, 200 µl의 chloroform을 처리하여 섞어준 뒤 4°C, 13,000 rpm에서 15 분간 원심분리를 하였다. 상층액을 분리하여 isopropanol과 1:1 비율로 섞어준 뒤, 4°C, 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리를 하였다. 생성된 pellet을 DEPC로 희석한 75% ETOH을 첨가하여 씻어내고, 4°C, 12,000 rpm에서 5 분간 원심분리를 하였다. 최종 추출된 pellet을 상온에서 10 분간 완전히 말린 뒤 ultra pure water 30 µl에 녹인 후, UV 흡광도 260 nm에서 농도를 측정하였다. 1 µg/µl의 RNA를 cDNA master mix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)와 혼합하여 25°C에서 10 분, 42°C에서 60 분, 그리고 95°C에서 5 분간 PCR을 이용해 cDNA를 합성하였다.

Real-time quantitative PCR

Plectin과 MACF1의 mRNA 발현을 측정하기 위하여 double-stranded DNA dye인 SYBR Green PCR master mix

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Genes	Forward primers	Reverse primers
Plectin	GAGTACAACCTCCGGCTGAA	CGACGCTGGTTCCTCTAC
MACF-1	CCAAAGCGAGTTGGCTCAGCAGACGGAAC	CCTCTTGTTCTCTGCCAGCTCTGTCGCTGC
GAPDH	ATGACAATGAATACGGCTACAGCAA	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT

(Finnzyme, Espoo, Finland)를 이용하여 real-time PCR (ABI PRISM 7700 system) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)을 실시하였다. 사용한 primer sequence는 Table 1에 제시하였으며, 모든 Primer는 코스모사(Cosmo Genetech, KOREA)에서 제작 및 구입하여 사용하였다. 모든 샘플은 3회 반복 실험하여 합성시킨 cDNA를 2회 이상 반복 측정하였다. 95°C 15 초, 60°C 30 초간 40 cycle을 측정하여 CT 값을 얻어내고, 용해 곡선 확인을 위해 40 cycle 이후 dissociation stage를 2번 반복하여 현광 신호의 크기를 측정하였다. 반응이 완료된 후 증폭곡선의 S 커브가 급격히 올라가는 지점과 CT 값의 추출 지점이 일치하였음을 확인하고, 용해 곡선 그래프의 단일 증폭 곡선을 확인한 뒤 최종적으로 CT 값을 데이터 처리 하였다. 결과는 단순 CT 값 비교 분석 방법을 사용하였으며, mRNA 발현양은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 CT값으로 상대 정량하여 보정하였다.

자료처리

IGF-I 처리에 따른 C2C12 세포에서의 plectin과 MACF-1 유전자 mRNA 발현의 유의성 검증을 위하여 SPSS 12.0 for window를 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다($p < 0.05$).

결 과

단백질 발현

단핵의 근원세포가 다핵의 골격근 세포로 분화하는 과정에서 20 ng/ml의 IGF-I을 각각의 처리 시간(24, 48, 72, 96 시간)에 따라 처리하였을 때, plectin 유전자의 단백질 발현에 어떠한 변화가 나타나는지 관찰하기 위해 면역 형광 염색(immuno cytochemistry) 기법을 사용하여 세포를 관찰하였다. Fig. 1에 제시된 바와 같이 성장 배지(growth medium, GM) 조건에서 IGF-I을 처리하지 않고 배양하자 분화가 진행되지 않은 상태의 근원세포의 형태를 관찰 할 수 있었다. 이후, 분화 배지(differentiation media, DM)로 배양액을 갈아주고 분화를 유도하며 20 ng/ml의 IGF-I을 처리하였을 때 24 시간에서 plectin의 발현 정도가 눈에 띄게 변화하지 않았지만 보다 명확한 myotube의 형태를 관찰 할 수 있었다. 동일한 조건으로 24 시간을 더 관찰하여본 결과 48 시간 동안 IGF-I을 처리하였을 때에는 myotube의 형태가 더 많이 관찰 되었으며, 세포의 더 많고 넓은 부분에 걸쳐 plectin의 발현이 증가되어 나타났음을 볼 수 있었다. 계속해서 72 시간, 96 시간 동안 장시간 IGF-I을 처리하였을 때에는 앞서 24-48 시간 동안의 변화와 매우 다른 변화를 관찰 할 수 있었는데, 72 시간 동안 IGF-I을 처리하지

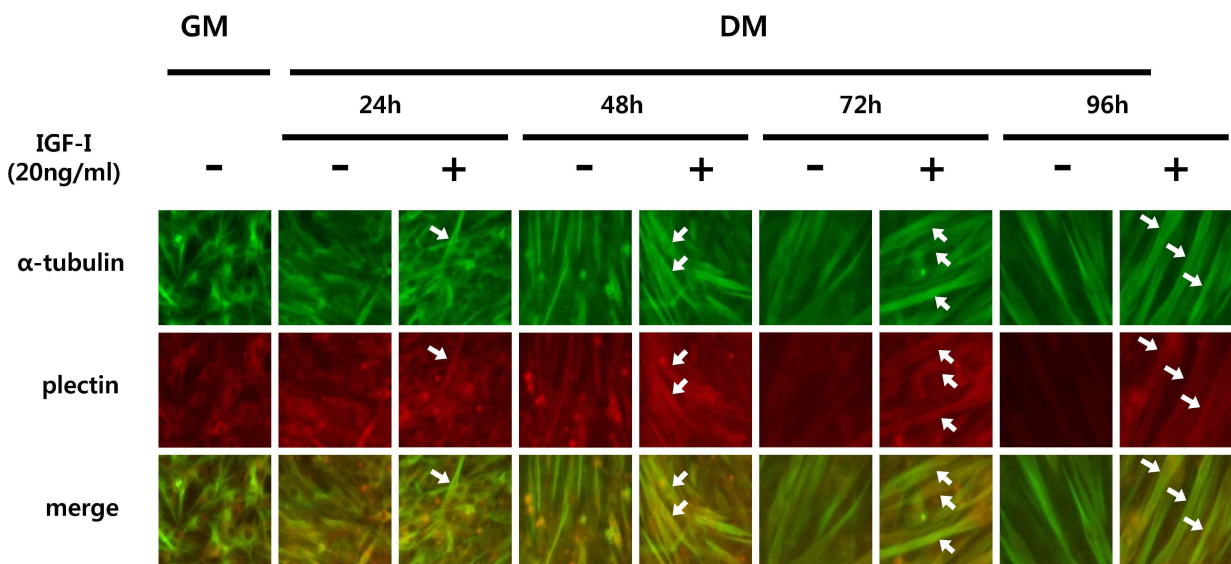


Fig. 1. Immunocytochemistry image showing the effect of IGF-I-induced plectin expression in C2C12 myotubes. C2C12 cells were treated with 2% horse serum media (differentiation media, DM) containing 20 ng/ml of IGF-I for various periods of time (24-96 hr). Plectin is stained fluorescent red and α-tubulin is stained fluorescent green.

않은 세포에서는 plectin의 발현이 희미하게 감소하는 경향을 관찰하였으나 IGF-I을 처리한 세포에서는 myotube가 더욱 굵어졌을 뿐만 아니라 plectin의 발현이 myotube 형태 전반에 걸쳐 더욱 뚜렷하게 나타났음을 관찰할 수 있었다. 96 시간 동안 IGF-I을 처리하였을 때는 보다 더 뚜렷한 차이를 볼 수 있었는데, 그림에서 보여주듯이 IGF-I을 처리하지 않은 세포에서는 plectin의 발현이 형태적으로 흐릿하게 거의 보이지 않는데 비하여 IGF-I을 처리한 세포에서는 장시간 분화배지 조건에서 배양되었음에도 불구하고 myotube의 형태와 거의 유사한 형태로 선명하게 plectin 유전자가 발현되고 있음을 관찰할 수 있었다.

근원세포를 골격근의 성질을 가진 다핵의 myotube 형태로 분화시키는 실험 기법으로 성장인자인 혈청액의 함유량을 낮춰 배양액하는 방법이 널리 사용되고 있는데, 배양액에서 세포 성장인자의 농도가 낮아짐으로 인해 분화가 유도되지만 세포는 시간이 지날수록 충분한 영양공급을 받지 못해 스트레스를 받게 된다. 그러나 장시간(72, 96 시간) 분화배지 조건에서 IGF-I을 처리한 세포에서는 IGF-I을 처리하지 않은 세포와 비교하였을 때 세포 골격인 튜블린과 plectin의 발현이 보다 선명하게 나타난 것으로 미루어 볼 때, IGF-I이 세포의 형태가 변화하는 과정에서 plectin의 발현을 유지시켜 줌으로써 세포 골격을 유지시켜 주는 것으로 해석된다.

mRNA 발현

동일한 조건으로 IGF-I 처리에 따른 plectin 과 MACF-1 유전자의 mRNA 발현을 측정해 본 결과 Fig. 2A에 제시된 바와 같이 plectin의 경우 24 시간 동안 IGF-I을 처리한 그룹이 같은 시간 동안 IGF-I을 처리하지 않은 그룹에 비해 약 136%

($p=0.000$), 48 시간에서는 약 184% ($p<0.01$) plectin의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였으며 ($p<0.05$), 72 시간에서는 약 12% 가량 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았으며, 96 시간에서는 발현이 오히려 감소하였다. MACF1 유전자의 mRNA는 24 시간 동안 IGF-I을 처리하자 약 86% ($p<0.05$), 48 시간에서는 89% ($p=0.000$), 72 시간에서는 25% 발현이 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았으며, 96 시간에서는 plectin과 마찬가지로 발현이 오히려 감소하였다(Fig. 2B).

앞서 단백질 발현의 경우 24-48 시간 동안에는 IGF-I에 의한 plectin 발현이 통계군과 차이를 보이지 않았고, 72-96 시간인 늦은 시간에서 차이를 보였던 결과와는 차이가 있지만, 이러한 현상은 IGF-I에 의한 plectin 유전자의 mRNA가 발현된 후에 단백질의 안정화 및 번역(translation) 능력 및 효율성 증대와 같은 번역 전(pre-translational) 단계에서의 유전자 발현 조절 메커니즘에 기인한 것으로 사료된다.

고 찰

포유류 세포 골격의 구성 요소인 액틴, 중간필라멘트, 미세소관 섬유는 기본적으로 세포의 모양을 유지 시키는 물리적 기능을 수행할 뿐만 아니라, 세포의 이동과 유사분열을 조절하는 증식의 기능과 더불어 세포 생존에 필요한 물질을 세포 내로 들여오고, 사용된 물질을 세포 밖으로 배출하는 물질 수송 역할 등의 화학적 기능 및 신호전달 기능에 있어서도 필수적인 요소이다[12,16,18,27,30]. 따라서 신체 각 조직을 구성하는 다양한 세포들이 세포 골격을 정상적으로 유지하는 것은 신체의 생리적 항상성 유지에 기본이 된다. 만약, 세포 골격의 손실 또는 비정상적 결합이 일어날 경우 세포는 변형된 발달

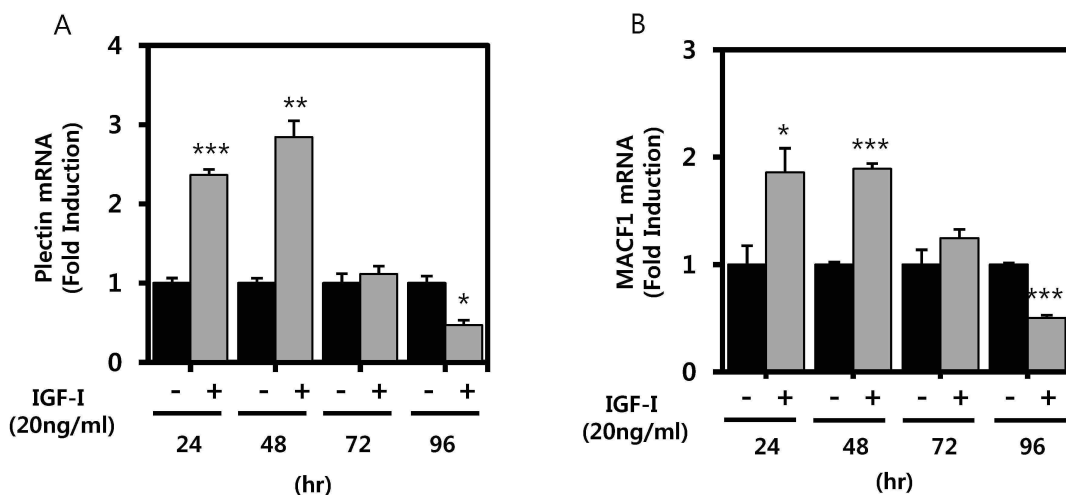


Fig. 2. Plectin (A), MACF1 (B) mRNA levels determined by real-time PCR in C2C12 myotubes for 24 hr, 48 hr, 72 hr, or 96 hr in the absence (control) or presence of IGF-I (20 ng/ml). Target mRNA values are shown normalized to the GAPDH mRNA level for each sample. Samples were analyzed in duplicate in parallel with GAPDH. Values are means±SE from three independent experiments. * $p<0.05$ vs. control.

과정을 거치고 비 정상적인 세포 주기를 겪게 되어 심각한 유전적 결함이 일어나며, 그에 따른 각종 유전 질환 및 암(cancer)과 같은 질병이 발생된다고 보고되어있다[9,17,25]. 수축과 이완이 크고 작게 반복적으로 일어나는 골격근에 있어 근육 세포 골격의 안정화는 다른 어떤 조직에서보다 중요하다 할 수 있다[15]. 따라서 운동에 의해 골격근에서 발생하는 수축과 이완의 메커니즘을 이해하는데 있어 세포 골격의 주를 이루는 액틴, 마이오신과 같은 주요 섬유들에 관련한 연구는 많이 이루어져 있지만, 근육 세포 내에서 이들을 서로를 연결시켜 원활한 화학적 신호 전달 및 움직임의 가능하게 하는 연결 단백질을 포함한 다른 부수적인 구성 요소들에 대한 연구는 많이 이루어지지 않고 있다.

그럼에도 불구하고 근육에서 integrin과 desmin에 관한 연구는 비교적 많이 이루어져 있고 이들의 근육에서의 역할이 강조되고 있는데, integrin은 막단백질(transmembrane) 중 하나로 주로 액틴과의 결합을 통해 세포 외부의 신호를 세포 내부로 전달하고, integrin의 구조를 변화시키는 방법으로 세포-세포, 세포-기질간의 부착능력을 조절시킨다. 최근 Liu 등 [22]에 따르면, β 1-integrin이 쥐의 골격근 세포의 분화과정을 매개하며, myogenin, myosin heavy chain 유전자의 발현을 조절시킨다고 보고하였으며, Wang 등[29]에 따르면 integrin 활성화 효소의 감소는 근건접합부(myotendinous junction)의 구조 손실을 가져와 근육 소실(muscular dystrophy)을 일으킨다고 보고하였다. 또한 근건접합부, 심장 근육 등에 풍부하게 존재하며 세포 골격과 Z선을 연결하는데 도움을 주는 desmin이 결핍된 근육 조직에서 심각한 근육 괴사 현상이 일어났음을 보고하면서 근육 구조의 안정화에 있어 이러한 연결 단백질의 중요성을 주장하였다[24]. 이러한 앞선 연구 결과들을 바탕으로 본 연구에서는 골격근 항상성 및 근부피 유지 및 증대에 있어 중심적인 역할을 하는 IGF-I이 세포 골격 연결 단백질인 plakin family 중 골격근과 관련된 plectin과 MACF1 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

첫째로, 본 연구에서는 plectin이 근섬유에서 강력한 동화작용 효과를 가지는 것으로 알려진 IGF-I에 의해 발현이 증가되었음을 밝혔다. 지금까지 plectin과 MACF1 유전자와 관련된 선행 연구들은 대부분 이들 유전자가 결핍된 실험 동물 모델을 대상으로 유전자의 역할을 규명하고, 관련되어 발생하는 질병 및 근육에서의 현상을 관찰하는데 집중되어 있었다. 그 결과 plectin의 결핍은 desmin 발현의 감소를 야기 시키며, 그에 따라 액틴과 Z선의 분리, 그리고 Z선과 중간 필라멘트의 분리 현상을 순차적으로 발생 시켜 결과적으로 심각한 근육 소실을 야기한다고 보고하였다[18,23]. 또한 사람에 있어 자가면역 질환이나 유전적 요인의 근육 소실증에 있어서도 plectin과의 연관성이 보고되어있다[6]. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 지금까지 plectin 유전자의 발현을 조절하는 조절자에 관한 연구는 이루어지지 않았었기 때문에 본 연구에서의

IGF-I에 의한 plectin 유전자의 발현 규명은 중요한 의의를 갖는다 하겠다.

두번째로, 본 연구에서는 IGF-I이 MACF1 유전자의 발현을 증가시켰음을 확인하였다. MACF1은 본래 주로 골지체의 구조적 안정성에 중심적인 역할을 하는 단백질로 주로 연구가 되어있었지만, 신경계로부터 신경전달 물질을 전달하여 골격근 수축의 시발점이 되는 근신경접합부(neuromuscular junction)에서 시냅스 후(postsynaptic) 말단으로부터 근초로의 신경 전달을 매개하는 anchoring acetylcholine receptor (AChR)를 근섬유와 간접적으로 연결하는 역할을 한다고도 알려져 있다[2]. MACF1도 plectin과 마찬가지로 mutant 모델에서의 연구가 주로 진행되었는데, 초파리에서 MACF1 (kakpo/shortstop)의 결핍은 근신경접합부의 비정상적인 변형과 날개 형태의 기형을 초래하였다고 보고되어있다[6]. 비록 사람에서 MACF1 결핍에 의한 질병 발생은 보고되고 있지 않지만, 근신경계에 있어 중요한 역할을 수행하는 유전자임이 잘 밝혀져 있다[4]. 지금까지 MACF1의 역할 및 관련 현상에 대해 고찰한 선행 연구들과 달리 본 연구에서는, 골격근 세포에서 IGF-I에 의해 MACF1의 유전자 발현이 증가하였음을 확인하였다.

결론적으로, 본 연구에서는 주로 근육 관련 전사인자들의 발현을 증가시킴으로써 근부피 증가 등의 다양한 동화작용을 하는 것으로 알려져 있는 IGF-I이 근육 세포 골격의 구조를 지지하는 plakin family인 plectin과 MACF1의 안정화에도 영향을 미친다는 사실을 증명하였다. 골격근의 생리적 기전에 있어 세포 골격을 연결하는 연결 단백질의 역할이 반드시 필요한 요소임에도 불구하고, 이에 관련한 연구들이 부족하며, 특히 운동과 관련한 연구들은 더 더욱 전무한 실정이다. 따라서 IGF-I이 근섬유와 근육 관련 유전자 발현에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 세포 골격 연결 단백질에도 영향을 미친다는 사실을 처음으로 밝혔다는 데서 그 의미가 있다고 하겠다. 본 연구를 바탕으로 이들 유전자의 발현이 향후 운동 유형에 따라, 근섬유 형태의 차이에 따라 어떻게 조절되는지, 다른 부수적 세포 골격 단백질들이 어떠한 상호작용을 통해 근수축 기전을 조절하는지에 대한 연구가 수행된다면, 운동이 골격근 구조 및 근섬유 형태를 변화시키는 메커니즘에 대한 추가적인 정보를 제공할 수 있을 것이다.

References

1. Andrä, K., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fässler, R., Propst, F. and Wiche, G. 1997. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* **11**, 3143-3156.
2. Banks, G. B., Fuhrer, C., Adams, M. E. and Froehner, S. C. 2003. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utro-

- phin/dystrophin-associated complex. *J. Neurocytol.* **32**, 709-726.
3. Booth, F. 2006. The many flavors of IGF-I. *J. Appl. Physiol.* **100**, 1755-1756.
 4. Boyer, J. G., Bernstein, M. A. and Boudreau-Larivière, C. 2010. Plakins in striated muscle. *Muscle Nerve* **41**, 299-308.
 5. Capetanaki, Y., Bloch, R. J., Kouloumenta, A., Mavroidis, M. and Psarras, S. 2007. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* **313**, 2063-2076.
 6. Leung, C. L., Green, K. J. and Liem, R. K. 2002. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol.* **12**, 37-45.
 7. Florini, J. R., Ewton, D. Z. and Coolican, S. A. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* **17**, 481-517.
 8. Foisner, R. and Wiche, G. 1991. Intermediate filament-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 75-81.
 9. Fuchs, E. and Cleveland, D. W. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-519.
 10. Gache, Y., Chavanas, S., Lacour, J. P., Wiche, G., Owaribe, K., Meneguzzi, G. and Ortonne, J. P. 1996. Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **97**, 2289-2298.
 11. Galvin, C. D., Hardiman, O. and Nolan, C. M. 2003. IGF-1 receptor mediates differentiation of primary cultures of mouse skeletal myoblasts. *Mol. Cell Endocrinol.* **200**, 19-29.
 12. Gregor, M., Zeöld, A., Oehler, S., Marobela, K. A., Fuchs, P., Weigel, G., Hardie, D. G. and Wiche, G. 2006. Plectin scaffolds recruit energy-controlling AMP-activated protein kinase (AMPK) in differentiated myofibres. *J. Cell Sci.* **119**, 1864-1875.
 13. Gregory, S. L. and Brown, N. H. 1998. Kakapo, a gene required for adhesion between and within cell layers in *Drosophila*, encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin. *J. Cell Biol.* **143**, 1271-1282.
 14. Hijikata, T., Murakami, T., Imamura, M., Fujimaki, N. and Ishikawa, H. 1999. Plectin is a linker of intermediate filaments to Z-disks in skeletal muscle fibers. *J. Cell Sci.* **112**, 867-876.
 15. Hnia, K., Tronchère, H., Tomczak, K. K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A. H., Payrastré, B., Mandel, J. L. and Laporte, J. 2011. Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **121**, 70-85.
 16. Janmey, P. A. 1998. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* **78**, 763-781.
 17. Kim, S. and Coulombe, P. A. 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* **21**, 1581-1597.
 18. Konieczny, P., Fuchs, P., Reipert, S., Kunz, W. S., Zeöld, A., Fischer, I., Paulin, D., Schröder, R. and Wiche, G. 2008. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J. Cell Biol.* **181**, 667-681.
 19. Kostka, T., Patricot, M. C., Mathian, B., Lacour, J. R. and Bonnefoy, M. 2003. Anabolic and catabolic hormonal responses to experimental two-set low-volume resistance exercise in sedentary and active elderly people. *Aging Clin. Exp. Res.* **15**, 123-130.
 20. Leung, C. L., Sun, D., Zheng, M., Knowles, D. R. and Liem, R. K. 1999. Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J. Cell Biol.* **147**, 1275-1286.
 21. Lin, C. M., Chen, H. J., Leung, C. L., Parry, D. A. and Liem, R. K. 2005. Microtubule actin crosslinking factor 1b: A novel plakin that localizes to the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **118**, 3727-3738.
 22. Liu, H., Niu, A., Chen, S. E. and Li, Y. P. 2011. β 3-Integrin mediates satellite cell differentiation in regenerating mouse muscle. *FASEB J.* **25**, 1914-1921.
 23. McLean, W. H., Pulkkinen, L., Smith, F. J., Rugg, E. L., Lane, E. B., Bullrich, F., Burgeson, R. E., Amano, S., Hudson, D. L., Owaribe, K., McGrath, J. A., McMillan, J. R., Eady, R. A., Leigh, I. M., Christiano, A. M. and Uitto, J. 1996. Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* **10**, 724-735.
 24. O'Neill, A., Williams, M. W., Resneck, W. G., Milner, D. J., Capetanaki, Y. and Bloch, R. J. 2002. Sarcolemmal organization in skeletal muscle lacking desmin: evidence for cytokeratins associated with the membrane skeleton at costameres. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2347-2359.
 25. Toivola, D. M., Tao, G. Z., Habtezion, A., Liao, J. and Omary, M. B. 2005. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* **15**, 608-617.
 26. Vasioukhin, V. and Fuchs, E. 2001. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 76-84.
 27. Vita, G., Monici, M. C., Owaribe, K. and Messina, C. 2003. Expression of plectin in muscle fibers with cytoarchitectural abnormalities. *Neuromuscul Disord.* **13**, 485-492.
 28. Wallace, J. D., Cuneo, R. C., Baxter, R., Orskov, H., Keay, N., Pentecost, C., Dall, R., Rosén, T., Jørgensen, J. O., Cittadini, A., Longobardi, S., Sacca, L., Christiansen, J. S., Bengtsson, B. A. and Sönksen, P. H. 1999. Responses of the growth hormone (GH) and insulin-like growth factor axis to exercise, GH administration, and GH withdrawal in trained adult males: a potential test for GH abuse in sport. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 3591-3601.
 29. Wang, H. V., Chang, L. W., Brixius, K., Wickström, S. A., Montanez, E., Thievensen, I., Schwander, M., Müller, U., Bloch, W., Mayer, U. and Fässler, R. 2008. Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J. Cell Biol.* **180**, 1037-1049.
 30. Wiche, G. 1998. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell Sci.* **111**, 2477-2486.

초록 : C2C12 myotube에서 insulin-like growth factor-I이 plectin과 MACF1 발현에 미치는 영향

김혜진¹ · 황지선¹ · 곽이섭² · 이원준^{1*}

(¹이화여자대학교 건강과학대학 체육학과, ²동의대학교 체육과학대학 체육학과)

본 연구에서는 C2C12 근육 세포에서 IGF-I이 세포골격 연결 단백질인 plectin과 MACF1 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 그 결과 IGF-I이 plectin 유전자의 단백질과 mRNA 발현을 증가시켰으며, MACF1 mRNA 발현을 증가시켰음을 알 수 있었다. 이는 운동에 의해 근육에서 분비가 증가하는 IGF-I이 근육 관련 유전자들의 발현을 조절하여 근부피 유지에 영향을 미친다는 기존의 연구 결과들에서 더 나아가 골격근 구조 안정화 및 근수축 기전에 기여하는 plectin과 MACF1 유전자 발현에도 영향을 미친다는 사실을 증명하였다는데 의의가 있다고 사료된다. 향후 근수축 기전에 있어, 운동 형태, 근섬유의 종류에 따른 세포 골격 단백질의 역할 규명 및 조절자에 관한 연구가 더 수행된다면 운동이 골격근의 생리적 변화에 미치는 영향에 대한 추가적 정보를 제공할 수 있을 것이다.