

## Gene Expression According to Electromyostimulation after Atrophy Conditions and Muscle Atrophy in Skeletal Muscle

Chang-Eun Park<sup>†</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, Namseoul University, 21 Maeju-ri,  
Seonghwan-eup, Seobuk-gu, Cheonan-city, Choongnam 331-707, Korea

Numerous biochemical molecules have been implicated in the development of muscular atrophy. However, control mechanisms associated with muscular disease are not clear. The present study was conducted to investigate gene expression profiles of rat muscle during the denervation to atrophy transition processes. We isolated total RNA from rats suffering from partial muscle atrophy (P) and electromyostimulated atrophy (PE) and synthesized cDNA using annealing control primers. Using 20 ACPs for PCR, we cloned 18 DEGs using TOPO TA cloning vector, sequenced, and analyzed their identities using BLAST search. Sequences of 14 clones significantly matched database entries, while one clone was ESTs, and 3 clones were unidentified. Different expression profiles of selected DEGs between P and PE were confirmed. The troponin T, Fkbp1a, RGD1307554, Phtf1, Atp1a1 and Commd3 were highly expressed genes in the P and PE groups, while Krox-25 and TCOX2 were only expressed genes in the P group, the Sv2b and Marcks were only expressed genes in PE group. also, Cox8h was highly expressed genes in PE groups. The ASPH, ND1, and ARPL1 were highly expressed genes in the P and PE groups. List of genes obtained from the present study might provide an insight for the study of mechanism regulating muscle atrophy and electrostimulated muscle atrophy transitions. These data suggest that troponin T, Fkbp1a, RGD1307554, Phtf1, Atp1a1, and Commd3 are potentially useful as clinical biomarkers of age-related muscle atrophy and dysfunction.

**Key Words:** Rat, Muscle atrophy, Differential gene expression, ACP

### 서 론

근육의 통증 (muscle pain)은 가장 흔하게 경험하게 되는 근골격계 증상 중의 하나이며, 직접적인 접촉에 의한 좌상, 열상 등과 같은 거대손상 (macro-trauma)과 운동에 의해 유발되는 근육손상과 같은 미세손상 (micro-trauma)으로 구분되어 진다 (Marc and Craig, 2007). 이러한 변화와 함께 운동과 관련된 근육의 통증은 운동 후의 근육 통증과 지연된 근육 통증 (delayed-onset muscle soreness: DOMS)으로 나눌 수 있다. 손상과 통증의 정도는 여러

요소의 작용으로 다양하게 나타나며, 개인에 따라 차이는 있으나 미세조직 손상, 근력 약화, 관절가동 범위의 감소가 더불어 나타난다 (Yoon and Lee, 2005).

장기적인 침상생활, 노화, 기아, 지속적인 활동 제한 등 다양한 원인에 의해 근육에 주어지는 흥분성의 감소가 일어날 수 있다 (Berg et al., 2007). 골절된 뼈와 반복된 손상으로 부터 조직을 보호하기 위해 보조기나 부목을 이용한 관절의 고정으로 인해 발생하는 근 위축을 무용성 근 위축 (disuse atrophy)이라고 하며, 관절 고정 후 나타나는 뚜렷한 문제로 임상에서 흔히 발생한다 (Caron et al., 2009).

최근 국내에서는 65세 이상의 노인 인구가 증가함에 따라 만성퇴행성 근육 질환자의 비율이 증가하고 있다. 이는 신경근 질환 (neuromuscular diseases) (Tews, 2002), 무용성 근 위축 (muscle disuse atrophy) (Dirks and Leeuwenburgh, 2005), 근육 감소증 (sarcopenia)에 의한 골격근의 근 위축에서 노화에 이르기까지 변화를 보면, 노

\*Received: 27 December, 2011 / Revised: 28 March, 2012  
Accepted: 30 March, 2012

<sup>†</sup>Corresponding author: Chang-Eun Park. Department of Biomedical Laboratory Science, Namseoul University, 21 Maeju-ri, Seonghwan-eup, Seobuk-gu, Cheonan-city, Choongnam, 331-707, Korea.  
Tel: 82-41-580-2722, Fax: 82-41-580-2932  
e-mail: pce@nsu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

화와 관련된 근 위축으로 근 위약은 노인의 신체 활동 및 기능을 감소시키며 60~70대의 근육량이 젊은 연령에 비해 25~30% 감소하며, 주로 근세포 수는 유지되지만 근섬유의 단면적의 감소가 일어나는 것으로 알려져 있다 (Walston and Friedl, 1999).

동물실험에서도 무용이 근육에 미치는 영향에 고령과 젊은 연령 모두 유사한 정도의 근 위축을 보였으나, 회복 정도는 고령에서 현저하게 저하되는 것으로 보고하고 있다 (Chakravarthy et al., 2000). 이에 근감소증은 척수 알파 운동단위의 감소를 통해 신경계의 기능 퇴화와 테스트스테론, 에스트로겐, 성장호르몬, IGF-1 (insulin like growth factor-1) 등의 감소로 호르몬의 부정적인 변화, 인테루킨 등과 같은 염증유발 마커가 되는 각종 사이토카인의 증가를 통하여 신체기능의 퇴화를 초래하는 것으로 보고하고 있다 (Barton, 2006). 그러나 이러한 보고들은 임상적인 결과로 그 기전에 대한 연구결과는 전무한 실정이다. 또한 탈신경으로 인한 근육의 위축 및 퇴행성에서는 탈신경 근육의 크기 감소와 근세포의 소실로 일종의 세포 사멸의 결과로 보고하고 있는 실정이다 (Siu and Alway, 2005).

이에 골격근의 경련과 통증은 가동성 및 기능을 경감하기 위해 초음파와 치료를 통해 통증 저하 치료 기법 중 열 인자, 전기적 자극, 마사지를 포함하는 많은 치료적 기법을 제시하며, 이 기법은 정상적인 기능의 보다 나은 회복을 촉진하는 것이다 (Gurovich et al., 2006). 따라서 본 연구는 근 위축에서 특이적으로 발현하는 유전자의 발굴과 근 위축 후 전기자극에 의해 변화하는 다양한 유전자들의 변화 양상을 발굴하여 그 기전을 규명하고 유전자 수준의 정보를 제공하고자 연구를 계획하였다. 따라서 둘 또는 여러 시료 간의 유전자 발현 차이를 연구하는 방법으로 differential display PCR (DD-PCR), suppression subtractive hybridization (SSH), DNA chips 등을 예로 들 수 있는데, 본 연구에서는 비교하고자 하는 시료에서 서로 다르게 발현되는 유전자 (DEG; differentially expressed genes)를 탐색한다는 점에서 앞의 세 가지 방법과 같은 의미를 갖지만, 위양성 (false positive)이 없고 효율성 면에서 더 좋다고 알려진 annealing control primer technology (ACP; Seegene, Seoul, Korea)를 이용하였다. ACP는 template에 annealing temperature에서 특이적으로 결합함으로써 두 시료 간에 서로 다르게 발현하는 유전자를 발굴하는 새로운 방법이다 (Hwang et al., 2003).

이에 따라 본 연구의 목적은 실험적으로 근 위축 (무용

과 탈신경)을 유발한 동물모델에서 현저한 발현 차이를 보이는 유전자를 찾고자 하는 것이다. 따라서 정상근육군과 골격근의 근 위축군과 손상 정도에 따라 전기자극을 한 군에서 각각 근육을 적출하여 ACP Technology를 통해 그룹 간에 서로 다르게 발현하는 유전자들을 발굴하고 유전자 발현의 패턴을 통해 그 기전을 규명하는데 활용하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 연구 재료

8주령의 수컷 (Sprague Dawley) 랫드 11마리 (정상군 1마리, 부분손상군 5마리, 부분손상 후 전기자극이군 5마리)를 실험 재료로 하였다. SD 랫드를 선택한 이유는 좌골신경 손상모델에 널리 사용되고 있는 동물종으로서 시술이 용이하고 손상 후 근육 변화에 대한 기존의 참고 자료가 상당히 축적되어 있기 때문이다. 이에 사용된 근 위축 (탈신경) 모델을 위해서 Ketamin (50 mg/kg)과 Xylazine (10 mg/kg body weight)을 복막내 주사하여 마취한 다음, 우측 좌골신경을 후대퇴부위에서 주위 조직과 박리하여 노출시켰다. 따라서 불완전 손상 즉 부분손상 모델은 좌골신경을 노출시킨 후 좌골근원위 10 mm 부위를 forceps으로 3분간 고정 후 풀어줌으로써 압쇄손상에 의한 부분손상모델 (부분 탈신경군; PD (partial denervation))을 만들었다 (Ide, 1996), 정상군의 데이터 값을 얻기 위해 무처리의 한 마리의 흰 쥐를 사용하고, PD군은 손상 후 4주 후에 각 5마리씩 희생시켜 양측비복근 (gastrocnemius)을 절제하여 조직을 얻어냈다. 또한 부분 탈신경군에 대해 무작위로 선택하여 각각 절반의 개체에 수술 후 1주일 후부터 우측비복근내 근육에 전기자극을 2주일간 수행하였다. 이때 전기자극은 Lim (2006)의 방법을 이용하였으며, 우측비복근을 촉진한 다음 치료할 부위에 알코올 솜으로 잘 닦고, 감겨진 구리 손잡이가 달린 살균된 0.25\*30mm의 스테인리스 철을 사용하여 직각 방향으로 자침하여 테이프를 이용하여 고정한다. 이때 침에 전극을 연결하고 전류강도를 10분간 자극을 주었다. 주파수는 1, 2, 4, 9, 10, 15, 30, 60, 90 Hz가 자동으로 변하는 방식을 이용하였다 (Deeav-120, ITC. Korea). 실험동물은 남서울대학교 동물실험윤리위원회의 인준 규정에 따라 사용되었다.

## GeneFishing: ACP를 이용한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

적출한 정상근육군 (N), 부분손상군 (P), 부분손상 후 전기자극군 (PE)에서 얻은 근육에 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 용액을 넣고 균질화 시킨 후 상온에서 5분간 두었다가 여기에 전체 부피의 1/5에 해당하는 chloroform을 넣고 다시 상온에서 15분 후 4°C에서 12,000 g로 20분간 원심분리한 뒤, RNA를 포함하는 무색의 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 여기에 동일한 양의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 두었다가 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라 버린 후 75% ethanol을 넣고 4°C에서 10분간 8,000 g로 원심분리하여, RNA 침전물을 공기 중에서 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 용해시켜 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

역전사 (reverse transcription) 반응에는 분리된 total RNA 3 µg과 GeneFishing DEG Kit (Seegene, Seoul, Korea)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 최종 cDNA 합성물이 20 µl이 되도록, DNase I (Invitrogen) 1 U/µl 처리된 total RNA 3 µg에 10 µM dT-ACP1 2 µl를 첨가하여 80°C에서 3분간 수행하고, M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) 200 U/µl (1 µl), RNase inhibitor (Promega) 40 U/µl (1 µl), 5X RT buffer (4 µl), 10 mM dNTP (1 µl) 첨가하여 42°C에서 90분, 94°C에서 2분간 수행하여 cDNA를 합성한 뒤 5배 희석하여 사용하였다. PCR은 총 25 µl로 25 mM MgCl<sub>2</sub> (2.5 µl), 5 µM arbitrary ACP (1 µl), 10 µM dT-ACP2 (0.5 µl), 10 mM dNTP (0.5 µl), BioTherm DNA Polymerase (GeneCraft, Munster, Germany) 5 U/µl (0.25 µl), 10X buffer (2.5 µl)를 사용하였다. GeneFishing PCR은 기존의 PCR 조건과는 달리 2단계로 PCR이 진행되는데, PCR 조건은 94°C에서 5분, 50°C에서 3분, 72°C에서 1분간 첫 번째 단계의 PCR을 1회 수행한 후 94°C에서 40초, 65°C에서 40초, 72°C에서 40초의 조건으로 40회 반복 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 수행하여 두 번째 단계의 PCR을 마쳤다. 이를 통해서 얻어진 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동 하여 세 그룹 간에 뚜렷한 차이를 보이는 DEG를 선택하여 gel extraction kit (QIAGEN, Santa Clara, USA)을 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA 단편을 TOPO vector (Invitrogen)에 ligation하여 cloning한 후, 얻어진 plasmid는 miniprep kit (QIAGEN)으로 추출하였다.

## Differentially Expressed Gene (DEG)의 cloning 및 sequencing

Cloning 여부를 확인하기 위해서 TOPO vector 상의 제한효소 인식부위 중에 PCR 생성물 삽입 시에 양쪽에 존재하게 되는 *EcoRI*과 *HindIII*를 처리하여 삽입유전자의 존재여부를 확인하였다. Plasmid DNA 5 µl에 20 U/µl *EcoRI* 또는 20 U/µl *HindIII* 제한효소를 37°C에서 3시간 동안 처리한 뒤 1.5% agarose gel 상에서 전기영동 하여 insert를 확인하였다. 제한효소 처리를 통해서 삽입유전자의 크기를 확인한 검체는 1 µg의 농도로 염기서열분석 (Macrogen, Seoul, Korea)을 의뢰하였고, 그 결과를 BLAST 프로그램을 통하여 분석하였다. 확인된 유전자는 GeneSpring (Silicon Genetics, Redwood, CA) 프로그램으로 생물학적 기작 및 기능, 세포 내에서의 위치에 대한 분석을 하였다. 또한 생물정보학적 분석을 위해 NCBI gene bank에 등록된 데이터 중 근육과 관련된 유전자 검색을 통해 염기서열을 확인하여 차이점을 분석하고 정상근육군, 근 위축군, 근 위축 후 전기자극군에 대해 데이터베이스를 통해 발현하는 유전자 정보를 분석하였다.

## 통계분석

결과의 통계분석은 *t-test*를 사용하여 검증하였으며 유의차에 대한 수준은 *P*값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 분석하였다.

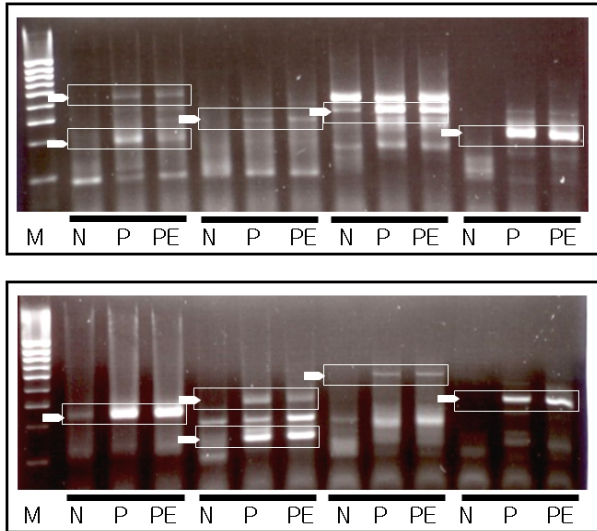
## 결 과

### ACP를 통한 DEG 발굴결과

정상근육, 근 위축, 근 위축 후 전기자극의 과정에 관여할 것으로 생각되는 유전자를 찾기 위해 쥐의 비복근에서 얻은 동량의 cDNA로 ACP를 이용하여 PCR을 수행하였다. 총 20개의 ACP를 사용하여 14개의 DEG를 얻었다. Fig. 1은 20개 중 1번부터 8번까지의 8개 ACP를 이용하여 10개의 DEG를 관찰한 PCR 결과이고 나머지 9번부터 20번까지의 ACP에서는 4개의 DEG를 얻었는데, 이때 유전자 발현 패턴은 Fig. 1과 동일한 결과를 보였다. 정상근육군, 근 위축군, 근 위축 후 전기자극군 간에 서로 다른 유전자 발현 양상을 보이는 대표적인 젤의 사진을 보여주고 있다. 사용한 ACP의 개수에 비하여 적은 수의 DEG를 얻은 것은, 각각의 ACP에 대한 발현하는 유전자의 수는 훨씬 많았음에도 불구하고 두 그룹 간의 발현

차가 확실하게 나는 유전자 band만을 선택하였고, 클로닝, 염기서열분석, BLAST 검색까지 마친 유전자만을 포함시켰기 때문이다. 14개의 DEG는 BLAST에 등록되어 있는 유전자와 일치하였고, 반면에 1개는 expressed sequence tag (EST)이고 3개의 clone은 일치하지 않는 유전자이다 (data not shown).

Table 1에 14개의 DEG의 리스트를 정리하였다. 각 실험



**Fig. 1.** Typical expression patterns with DEGs in rat muscles of normal, partial atrophy and electrostimulated atrophy by Gene-Fishing PCR. RNA samples from normal (N), partial atrophy (P), and electrostimulated atrophy (PE) were analyzed by using ACPs.

험군에서 동량의 RNA로부터 cDNA를 합성하였기에 동일조건에서 발현양의 차이를 비교 관찰하였다. 실험결과, 정상근육 (N)에서만 특이적으로 발현되는 유전자는 찾을 수 없었으나 근 위축군 (P)보다 근 위축 후 전기자극군 (PE)에서 더 많이 발현되는 유전자가 1개, 정상근육 (N)에는 발현되지 않고 근 위축군 (P)에서만 발현되는 유전자가 2개, 근 위축 후 전기자극군 (PE)에서만 발현되는 유전자가 2개, 정상근육 (N)보다 근 위축 (P) 및 근 위축 후 전기자극군 (PE)에서 더 많이 발현되는 유전자를 3개, 근 위축군 (P)과 근 위축 후 전기자극군 (PE)에서 발현되는 유전자가 6개를 얻었다.

이 중 정상근육 (N)에서는 발현되지 않으면서 근 위축 (P)보다 근 위축 후 전기자극군 (PE)에서 더 많이 발현되는 1개의 유전자는 cytochrome oxidase activity에 관여하는 것이었으며, 정상근육 (N)보다 근 위축 (P)과 근 위축 후 전기자극군 (PE)에서 더 많이 발현하는 유전자는 protein transport와 peptidyl-aspartic acid modification DNA binding protein 기능에 관여하는 것이었다. 근 위축 (P)과 근 위축 후 전기자극군 (PE)에서만 발현되는 유전자는 mitochondrial electron transport, regulation of transcription, regulation of translation에 관여하는 것으로 나타났으며 또한 세포와 기질간의 결합, 유전자 및 단백질 발현, 세포주기 저해, 세포성장 조절, 대사과정 등에 관여하는 것이었다 (Table 2).

**Table 1.** List of differentially expressed genes on rat muscle of normal, partial atrophy, and electrostimulated atrophy

Expression patterns	Genes Name	GI
P <sup>a</sup> < PE <sup>b</sup>	Cytochrom c oxidase subunit VIII-H (heart/muscle) (Cox8h), mRNA	315583344
<sup>c</sup> N < P, PE	Aspartate-beta-hydroxylase	55249792
	nd1 gene for NADH dehydrogenase subunit 1	13472
	Acidic ribosomal phosphoprotein P1	57709
P	Trihydroxycoprostanoyl-CoA Oxidase	1684746
	KRUPPEL-TYPE ZINC FINGER PROTEIN KROX-25	10086310
PE	Synaptic vesicle protein 2B (Sv2b) mRNA	17901860
	Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate (Marcks), mRNA	293356891
P, PE	Troponin T class proteins	207363
	FK506 binding protein 1a (Fkbp1a), mRNA	47271543
	Similar to CG16812-PA (RGD1307554), mRNA	157821282
	Putative Homeodomain transcription factor 1 (Phtf1), mRNA	300797887
	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide (Atp1a1), mRNA	6978542
	COMM domain containing 3 (Comm3)	38454209

<sup>a</sup>P, partial atrophy; <sup>b</sup>PE, electrostimulated after atrophy; <sup>c</sup>N, normal muscle

**Table 2.** Classification of DEGs regarding to their function

Function	P<PE (1 genes)	N<P, PE (3 genes)	P or PE (10 genes)
Cell cycle / Apoptosis			1
Cell adhesion			1
Metabolism			3
Etc. <sup>a</sup>	1	2	3
Unknown Function		1	2

a, functions other than the above listings such as cell communication, cytochrome-c oxidase activity, protein transport, peptidyl-aspartic acid modification DNA binding protein, mitochondrial electron transport, regulation of transcription, regulation of translation.

## 고 찰

본 연구는 정상 근육조직과 부분적 탈신경을 유도한 위축근육, 부분탈신경 후 전기자극을 수행한 근육을 ACP를 이용한 PCR 방법으로 각 군의 근육에서 발현하는 유전자들의 목록을 확보하여 비교 분석하였다. 이는 근 위축군과 근 위축 후 전기자극군에서 서로 다르게 발현하는 유전자를 찾아 무용, 근 위축 등의 근육손상 질환의 재활 치료에 접목하는 전기자극의 유용성을 유전자 수준에서 규명하고자 하였다.

골격근은 다양한 환경 변화에 대해 높은 가소성(plasticity)을 지닌 조직으로, 주어지는 자극의 양과 형태에 따라 구조와 기능적 요소를 변화하고 적응시키는 능력을 가진다. 이러한 변화는 근육에 가해지는 자극에 따라 단백질의 발현에 따른 조직의 형태와 양의 변화로 나타난다(Baldwin and Haddad, 2002). 근 위축의 과정은 고정 후 초기부터 매우 빠르게 진행되며, 고정기간이 길수록 근 위축을 더욱 크게 하며, 회복하는데 걸리는 기간은 유발기간보다 오랜 기간이 소요된다(Desaphy et al., 2005). 이러한 문제는 환자의 재활기간과 강도에 크게 영향을 미치므로 이를 감소시키고 예방하는 방법에 관해 재활 치료에서 중요한 문제가 되고 있다. 골격근의 근 위축의 유발 순서 및 유발 정도는 근섬유의 유형에 따라 각기 다른 진행 양상을 보이게 된다. 근 위축의 초기에는 서서히 일어나다가 근섬유의 근 위축이 먼저 진행하게 되며, 근의 운동성 감소와 근수축 활동전위의 감소가 일어난다.

근 위축을 방지하고 완화시키기 위한 방법으로는 온열자극에 의해 세포내 열충격단백질(heat shock protein: HSP)의 발현이 증가되어 단백질 합성을 통해 세포를 보

호하고 세포내 손상된 단백질의 복원에 작용하여 근위축의 과정이 억제되고 회복됨이 보고되었다(Akira et al., 2010). 발굴된 유전자 중 근육 특이적인 COX 유전자는 횡문근의 특이적인 조절인자 중 하나로 프로모터 부위에 E box, CARG box, MEF2 (myocyte enhancer factor 2) 도메인을 가진다. 이에 COX VIII (H) 유전자는 골격근이나 심근 세포에서 2개의 중복된 E boxes에 결합하는 인자에 의해 조절된다. 또한 포유동물의 COX 유전자는 핵과 미토콘드리아의 유전자 사이에 상호협력 조절의 기전을 연구하는 시스템에서 중요하다(Lenka et al., 1998).

EGF (epidermal growth factor) 도메인의 aspartyl beta-hydroxylation은 Notch 신호전달을 조절하고, aspartyl beta-hydroxylation은 EGF domains의 또 다른 기능으로 번역 후 변형(post-translational modification)에 관여하여 Notch 신호전달을 조절하는 것으로 알려져 있다(Dinchuk et al., 2002). 이 뿐만 아니라, aspartate beta-hydroxylase 도메인이 포함된 단백질은 줄기세포 형질을 조절하는 기전 중의 하나로 알려져 있다(Seidel et al., 2010).

Krox-25는 초파리의 Krüppel 분절유전자와 유사하며 5개의 zinc finger motifs를 가진다. 또한 protein kinase C 도메인에 결합하는 몇 개의 consensus 아미노산 서열이 존재하여 세포분화를 위한 전사인자로서 중요한 역할을 한다(Lee et al., 2004).

SV2B 유전자는 3'-untranslated region (3'UTR) 부분에 몇몇의 AU-rich (AUR) 부위가 있어 전사 후 조절(post-transcriptional regulating)에 관여하고 SV2B(b)의 발현이 신경변성과정에 관여하는 것으로 보고하고 있다(Heese et al., 2001).

Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)는 생쥐나 개구리, zebrafish의 정상적인 발생에 중추적인 역할을 하며 protein kinase C (PKC)의 기질에 부착하는 액틴유전자가 손실이 발생하면 조직병리학적으로 근육에서 비정상상을 보인다(Ott et al., 2011). 심장의 troponin T의 상승은 심근세포(cardiomyocyte)의 저해에 따른 생의학적 지표로 알려져 있으며 심장질환 환자에게는 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다(Adams et al., 2010).

Matrix metallo proteinase 9 (MMP9)는 직접적으로 Fkbp1a, Fkbp8을 조절하며, FKBP 유전자는 Sdc1 (syndecan 1) 유전자 발현을 유도하여 항침습(antiinvasive)에 협조하고 MMP9 유전자를 통해 사전침습(proinvasive)을 억제한다. 반대로 Fkbp1a의 short interfering RNA에서는 종양세포의 침습과 MMP9 수준이 증가하나, Sdc1 유전자의 발현을

감소시킨다. 따라서 syndecan 1과 MMP9는 FKBP 유전자의 발현에 의해 침습과 전이에 대항하는 역할을 하는 것으로 보고하고 있다 (Fong et al., 2003).

Leucine-zipper와 sterile-alpha motif kinase (ZAK)은 심근 세포 비대에서 세포내 증재 단백질로 transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1)에 의해 유도된다. 심장섬유화 진행에서 관여하며 전섬유화의 cytokine으로 규명되었다. ZAK 활성도는 심장의 섬유화 진행을 예방하기 위한 경로를 억제한다 (Cheng et al., 2009).

PHTF1 (putative homeodomain transcriptional factor; HGMW-approved symbol PHTF1)은 사람의 유전체에서 1p11-p13에 위치하며 homeobox 유전자로 추정하고 있으며 Northern blot 분석에서는 PHTF1은 주로 정소에서 발현하고, PHTF2는 현저히 근육에서 발현하였다. 이를 통해 이 두 유전자는 대립과 중복을 통해 다른 기능을 획득하는 것으로 보인다 (Manuel et al., 2000).

Na(+)-K(+) pump는 Cys46의 beta(1) subunit의 glutathionylation에 의존적으로 조절된다. 이는 신경호르몬의 부적절한 조절, 심근의 산화적 스트레스, 근육세포에서 Na(+), K(+)의 증가 등의 병태생리학적 상태에서 나타난다 (Figtree et al., 2009).

COMM (copper metabolism gene MURR1) 도메인은 독특한 motif로 규명되어 있고, 이는 단백질-단백질 상호작용을 위한 매개자로서 기능을 한다. 이와 비슷한 MURR1은 NF-kappa B를 억제하고 몇 가지 인자가 관련되어 있어 COMMD (copper metabolism Murr1 domain) 1에서 10은 다양한 세포의 진핵세포에 잘 보존되어 있다. 이와 유사한 MURR1은 구조적, 기능적으로 유사한 다양한 기능적 단백질로 nuclear factor kappa B (NF-kappa B)를 억제시키고 중앙형성, 세포주기조절, 세포사멸, 선천적인 면역 등 다양한 형질을 나타내는 기능적 전사인자로 알려져 있다 (Burststein et al., 2005).

본 연구를 통해 관찰된 골격근의 위축에서 관여하는 유전자들의 상관관계를 연구하는데 의의가 있을 것으로 사료되고 특히 대사과정, 세포사멸, 세포주기에 관여하는 인자들의 높은 발현은 흥미로운 결과로서, 이들 유전자에 대한 연구를 통해 앞으로 근육의 위축을 주도하는 분자생물학적 기전을 밝히는데 한걸음 더 다가갈 수 있을 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

이 논문은 2011학년도 하반기 남서울대학교 학술연구

비 (자유공모) 지원에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

- Yoon CK, Lee J. Prevention and treatment of muscle damage induced by eccentric muscle contraction. *Journal of Coaching Development*. 2005. 7: 35-45.
- Lim JY. The effect of electromyostimulation on apoptosis in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. Graduate School of Seoul National University, 2006.
- Adams KF Jr, Mehra MR, Oren RM, O'Connor CM, Chiong JR, Ghali JK, Lenihan DJ, Dunlap SH, Patterson JH, Schwartz TA, Felker GM. Prospective evaluation of the association between cardiac troponin T and markers of disturbed erythropoiesis in patients with heart failure. *Am Heart J*. 2010. 160: 1142-1148.
- Akira S, Tomomi O, Tomoaki S. Inhibitory effect of a combination of thermo therapy with exercise therapy on progression of muscle atrophy. *J Phys Ther Sci*. 2010. 22: 17-22.
- Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002. 81: 40-51.
- Barton ER. Viral expression of insulin-like growth factor-I isoforms promotes different responses in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2006. 100: 1778-1784.
- Berg HE, Eiken O, Miklavcic L, Mekjavic IB. Hip, thigh and calf muscle atrophy and bone loss after 5-week bedrest inactivity. *Eur J Appl Physiol*. 2007. 99: 283-289.
- Burststein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, Maine GN, Wilkinson JC, Mayo MW, Duckett CS. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem*. 2005. 280: 22222-22232.
- Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G. A novel hind limb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol*. 2009. 106: 2049-2059.
- Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FW. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2000. 89: 1365-1379.
- Cheng YC, Kuo WW, Wu HC, Lai TY, Wu CH, Hwang JM, Wang WH, Tsai FJ, Yang JJ, Huang CY, Chu CH. ZAK induces MMP-2 activity via JNK/p38 signals and reduces MMP-9 activity by increasing TIMP-1/2 expression in H9c2

- cardiomyoblast cells. *Mol Cell Biochem*. 2009. 325: 69-77.
- Desaphy JF, Pierno S, Liantonio A, Luca AD, Didonna MP, Frigeri A, Nicchia GP, Svelto M, Camerino C, Zallone A, Camerino DC. Recovery of the soleus muscle after short- and long-term disuse induced by hind limb unloading: effects on the electrical properties and myosin heavy chain profile. *Neuro Biol Dis*. 2005. 18: 356-365.
- Dinchuk JE, Focht RJ, Kelley JA, Henderson NL, Zolotarjova NI, Wynn R, Neff NT, Link J, Huber RM, Burn TC, Rupar MJ, Cunningham MR, Selling BH, Ma J, Stern AA, Hollis GF, Stein RB, Friedman PA. Absence of post-translational aspartyl beta-hydroxylation of epidermal growth factor domains in mice leads to developmental defects and an increased incidence of intestinal neoplasia. *J Biol Chem*. 2002. 277: 12970-12977.
- Dirks AJ, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Med*. 2005. 35: 473-483.
- Figtree GA, Liu CC, Bibert S, Hamilton EJ, Garcia A, White CN, Chia KK, Cornelius F, Geering K, Rasmussen HH. Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump regulation. *Circ Res*. 2009. 105: 185-193.
- Fong S, Mounkes L, Liu Y, Maibaum M, Alonzo E, Desprez PY, Thor AD, Kashani-Sabet M, Debs RJ. Functional identification of distinct sets of antitumor activities mediated by the FKBP gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100: 14253-14258.
- Gurovich AN, Penailillo L, Reyes A, Plaza P. What is the best treatment to control Delayed Onset Muscle Soreness: Ultrasound, cryotherapy or both on a combined therapy?. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2006. 38: Supplement 689.
- Heese K, Nagai Y, Sawada T. Identification of a new synaptic vesicle protein 2B mRNA transcript which is up-regulated in neurons by amyloid beta peptide fragment (1-42). *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. 289: 924-928.
- Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak CI, Gu YY, Chun JY. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques*. 2003. 35: 1180-1184.
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Research*. 1996. 25: 101-121.
- Kim YJ, Kwak CI, Gu YY, Hwang IT, Chun JY. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Biotechniques*. 2004. 36: 424-426.
- Lee SK, Kim YS, Lee SS, Lee YJ, Song IS, Park SC, Kozak C, Yamada Y. Molecular cloning, chromosomal mapping, and characteristic expression in tooth organ of rat and mouse Krox-25. *Genomics*. 2004. 83: 243-253.
- Lenka N, Vijayarathay C, Mullick J, Avadhani NG. Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998. 61: 309-344.
- Marc RP, Craig R. Eccentric muscle actions: Implications for injury prevention and rehabilitation. *Physical Therapy in Sport*. 2007. 8: 88-97.
- Masuda A, Koga Y, Hattanmaru M, Minagoe S, Tei C. The effects of repeated thermal therapy for patients with chronic pain. *Psychother Psycho Som*. 2005. 74: 288-294.
- Manuel A, Beaupain D, Romeo PH, Raich N. Molecular characterization of a novel gene family (PHTF) conserved from *Drosophila* to mammals. *Genomics*. 2000 Mar 1. 64: 216-220.
- Ott LE, McDowell ZT, Turner PM, Law JM, Adler KB, Yoder JA, Jones SL. Two Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) Paralogs are Required for Normal Development in Zebrafish. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011. doi: 10.1002/ar.21453.
- Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze AT, Nistér M, Reifenberger G, Lundeberg J, Frisén J, Acker T. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*. 2010 Apr. 133(Pt 4): 983-995.
- Siu PM, Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *J Physiol*. 2005. 15: 309-323.
- Tews DS. Apoptosis and muscle fiber loss in neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders*. 2002. 12: 613-622.
- Walston J, Fried LP. Frailty and the older man. *Med Clin North Am*. 1999. 83: 1173-1194.