

Induction of Muscle Atrophy by Dexamethasone and Hydrogen Peroxide in Differentiated C2C12 Myotubes

Cheol Park¹, Jin-Woo Jeong^{2,3} and Yung Hyun Choi^{2,3*}

¹Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Donggeui University, Busan 47340, Korea

²Anti-Aging Research Center and Blue Bio Industry RIC, Donggeui University, Busan 47340, Korea

³Open Laboratory for Muscular and Skeletal Disease Control, Department of Biochemistry, Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

Received August 22, 2017 / Revised September 25, 2017 / Accepted October 24, 2017

Muscle atrophy due to aging, starvation, and various chronic diseases leads to a decrease in muscle fiber area and density due to reduced muscle protein synthesis and increased protein breakdown. This study investigated the effect of dexamethasone and hydrogen peroxide on the induction of muscle atrophy and expression of atrophy-related genes in differentiated C2C12 myotubes. C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes in differentiation medium. During myoblast differentiation, muscle-specific transcription factors, such as myogenin, and MyoD expression increased. Differentiated C2C12 myotubes exposed to noncytotoxic levels of dexamethasone and hydrogen peroxide showed a decrease in myotube diameter, which was associated with up-regulation of muscle-specific ubiquitin ligases, such as muscle atrophy F-box (MAFbx)/atrogin-1 and muscle RING finger-1 (MuRF1), and down-regulation of myogenin and MyoD. These results demonstrated that dexamethasone and hydrogen peroxide induced atrophy through regulation of muscle-specific ubiquitin ligases and muscle-specific transcription factors in C2C12 myotubes. In this study, we confirmed the process of differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes in *in vitro* experiments in the presence of atrophy. This muscle atrophy model of C2C12 cells induced by dexamethasone or hydrogen peroxide seems suited to studies of the mechanism of muscle atrophy suppression and to exploit the experiment for excavating new muscle atrophy.

Key words : C2C12 myotubes, dexamethasone, hydrogen peroxide, muscle atrophy

서 론

근위축(muscle atrophy)은 노화, 영양부족 및 만성질환 등과 같은 여러 가지 원인에 의하여 유발되며, 단백질 합성 조절, protease 활성화, ubiquitin conjugation 및 autophagy 등과 같은 많은 세포 내 변화가 관여하는 것으로 알려져 있다[11, 13, 31]. 이러한 근위축은 삶의 질을 떨어뜨릴 뿐 만 아니라 병적 상태 및 사망률을 증가시키는 원인이 될 수 있기 때문에 이와 관련된 기전을 규명하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 최근 연구에 따르면 근위축은 ubiquitin-proteasome 경로의 활성화에 의한 단백질 분해 증가가 중요한 원인이며, 특히 근위축 과정의 초기에 muscle-specific ubiquitin ligase에 해당되는 muscle atrophy F-box (MAFbx)/atrogin-1 및 muscle

RING finger-1 (MuRF1)이 발현되어 근육 단백질 분해에 직접적으로 관여하는 것으로 보고되고 있다[2, 4, 5, 8]. 또한 근위축이 유발되면 근육 특이적인 유전자 발현을 활성화시킴으로서 myogenic differentiation에 관여하는 muscle-specific transcription factor인 myogenin 및 MyoD와 같은 유전자들의 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다[10, 30].

합성 glucocorticoid인 dexamethasone은 생체 내 또는 배양 세포에서 근육에서의 단백질 합성 속도를 감소시키고 단백질 분해 속도를 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 생체 내 또는 배양세포에서 근육 단백질 분해를 유도하기 위하여 사용되고 있다[12, 20, 27]. 선행 연구에 따르면 dexamethasone은 ubiquitin-proteasome 경로를 통하여 단백질 분해를 증가시키고 이와 관련된 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 보고되고 있다[6, 7, 28]. 또한 산화적 스트레스는 당뇨병, 암, 심부전, AIDS 및 폐혈증 등에 의한 근위축 모델에서 유발되는 골격근 위축과 관련이 있다[16, 18, 21, 24, 29]. 이러한 산화적 스트레스는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 통하여 ubiquitin-proteasome 경로를 활성화시킴으로서 단백질 파괴의 증가 및 myosin 발현의 감소를 유발하게 되고, 최종적으로 근위축을 일으키는 것으로 보고되고 있다[9, 17, 19]. *In vitro* 실험 모델에서 dexamethasone 및 hydrogen peroxide에 의하

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.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.

여 유발되는 근위축과 관련된 일련의 변화가 환자에서 나타나는 근위축과 관련된 변화와 유사하므로 근위축 기전 연구에 사용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 실험 모델을 이용한 근위축 연구를 위하여 근아세포(myoblast)에서 근관세포(myotube)로의 분화과정을 구축하고, 분화가 유발된 myotube에서 dexamethasone 및 hydrogen peroxide를 이용한 인위적인 근위축 모델의 확립을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 세포배양 및 분화를 위하여 사용된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS), penicillin/streptomycin (PS)은 ㈜WEL-GENE (Daegu, Korea)에서 구입하였고, dexamethasone, hydrogen peroxide 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질 분석을 위하여 사용된 1차 항체인 MAFbx/atrogen-1, MuRF1, myogenin 및 MyoD와 2차 항체인 goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) 및 goat anti-rabbit IgG-HRP은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

세포 배양 및 분화 유도

실험에 사용된 세포주인 C2C12 myoblast는 American Type Culture Collection (Manassa, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. C2C12 myoblast는 90% DMEM, 10% FBS 및 100 unit/ml PS가 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간마다 계대 배양을 실시하여 적정수의 세포를 유지하였다. C2C12 myoblast를 myotube로 분화시키기 위하여 90% DMEM, 10% HS 및 100 unit/ml PS가 포함된 분화배지를 사용하였다. 또한 분화과정 중 나타나는 형태 변화를 확인하기 위하여 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Gottingen, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 관찰하였다.

Trypan blue 염색을 이용한 세포 생존율 측정

Dexamethasone 및 hydrogen peroxide 처리에 따른 C2C12 myoblast의 생존율을 측정하기 위하여 세포 배양용 6 well plate에 C2C12 myoblast를 분주하여 100% confluent 상태까지 배양한 후 dexamethasone 및 hydrogen peroxide를 적정 농도로 처리하였다. 일정 시간 경과 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphatebuffered saline (PBS)를 각 well 당 적정량을 첨가

하여 세포를 모았다. 이렇게 모인 세포를 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 세포만 남긴 다음 각각 1 ml의 PBS와 0.5% trypan blue solution (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 2분간 염색을 실시하고 hemocytometer에 적용시킨 다음 도립 현미경을 이용하여 살아있는 세포를 계수하였다.

MTT assay를 이용한 성장억제 조사

Dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 C2C12 myoblast에서 유발하는 성장억제 정도를 확인하기 위하여 상기와 동일한 방법으로 처리된 세포를 대상으로 배지를 제거하고 성장배지와 희석된 0.5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 2 ml 씩 분주하고 빛을 차단한 다음 동안 CO₂ incubator에서 배양시켰다. 2시간 경과 후 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco, Solon, OH, USA)를 적정량 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 다음 96 well plate에 200 μ l씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 분리 및 Western blot analysis

근위축에서 중요한 역할을 하는 muscle-specific ubiquitin ligase 및 muscle-specific transcription factor 들의 발현 변화를 확인하기 위하여 준비된 세포를 대상으로 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였으며, 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분자량에 따라 분리한 후 electroblotting을 실시하여 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane에 각각의 1차 및 2차 항체를 처리하여 반응시킨 다음 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 특정 단백질의 발현 변화를 분석하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 SPSS ver. 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 나타냈다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성 검증은 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 한 후, Student t-test를 이용하여 * $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

C2C12 myoblast에서 myotube로의 분화 조건 확립

일반적으로 근위축과 관련된 *in vitro* 연구를 위하여 사용되는 모델로는 mouse 골격근 유래의 C2C12 myoblast를 myotube로 분화시켜 사용하고 있다. 분화되기 전 상태인 myoblast의 경우에는 매우 빠르게 증식하며, myotube로의 특징을 가지고 있지 않지만 분화배지 처리에 의한 분화 유도 시 myoblast는 증식억제와 더불어 세포융합이 유발되어 다핵의 myotube를 형성하는 것으로 알려져 있다[14, 15]. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 실험을 이용한 근위축 연구 모델을 구축하기 위하여 C2C12 세포를 대상으로 myoblast에서 myotube로의 최적의 분화조건을 확립하였으며, 이러한 분화과정에 관여하는 유전자들의 발현에 어떠한 변화가 유발되는지를 관찰하였다. 먼저 C2C12 myoblast를 myotube로 분화시키기 위한 최적의 조건을 확립한 결과는 Fig. 1A에 나타난 바와 같다. 결과에서 나타난 바와 같이 C2C12 myoblast를 대상으로 성장배지를 이용하여 100% confluent한 상태로 배양한 다음 새로운 성장배지로 교환하여 2일간의 전분화과정을 유발하면 세포들 사이의 융합 현상이 나타나는 것으로 확인되었다. 전분화과정이 끝난 후 매 2일마다 분화배지로 교환하여 분화를 유발하면 시간 경과에 따라 분화가 유발되었으며, 7일 경과 후 완전한 형태의 myotube가 형성되는 것으로 나타났다. 또한 Fig. 1B에 나타난 바와 같이 분화 여부의 직접적인 증거를 제시하여 위하여 근육의 분화과정에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 muscle-specific transcription factor인 myogenin과 MyoD의 발현 변화를 확인한 결과, 분화 유도 초기에 발현이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 분화 유도에 따른 형태적 변화와 더불어 C2C12 myoblast에서 myotube로의 분화가 적절히 유도되었음을 의미하는 결과이다.

Dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 C2C12 myoblast의 생존 및 성장에 미치는 영향

근위축 연구를 위한 모델 설정에 사용되는 약물들은 기본적으로 세포독성이 없는 조건에서 근위축을 유발해야 할 것이다. 따라서 본 연구에서 근위축을 위하여 사용된 dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 C2C12 myoblast의 세포독성에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 trypan blue 염색 및 MTT assay를 이용하여 생존율 및 성장 억제 정도를 조사하였다. 먼저 dexamethasone이 C2C12 myoblast에서 유발하는 생존율 및 성장 억제에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 2A 및 Fig. 2B에 나타난 바와 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 0~200 μ M 농도의 dexamethasone을 24시간 및 48시간 동안 처리하였을 경우 100 μ M dexamethasone 처리군까지는 생존율 및 성장 억제 현상이 크게 나타나지 않았지만 200 μ M dexamethasone 처리군에서는 생존율 및 성장 억제가 유발되는 것으로 나타났다. 또한 Fig. 3A 및 Fig. 3B에 나타난 바와 같이 0~200 μ M 농도의 hydrogen peroxide를 6시간, 12시간 및 24시간 동안 처리하였을 경우 100 μ M hydrogen peroxide 처리군까지는 처리농도 및 처리시간에 따른 생존율 및 성장 억제 효과가 거의 나타나지 않았지만 200 μ M hydrogen peroxide 처리군에서는 생존율 및 성장 억제가 유발된다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 생존율 및 성장에 큰 영향을 미치지 않는 조건인 100 μ M dexamethasone의 48시간 처리군 및 100 μ M hydrogen peroxide의 24시간 처리군까지를 실험 조건으로 설정하여 근위축 유발을 실시하였다.

Dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 C2C12 myotube의 근위축에 미치는 영향

Myoblast에서 myotube로 분화가 유발될 경우에는 세포들 사이의 융합에 따른 근섬유의 수가 증가하고 근섬유의 지름이 두꺼워지는 특징을 가지지만 여러 가지 원인에 의하여 근위축이 유발될 경우에는 근육 단백질 분해를 통하여 근섬유의 수

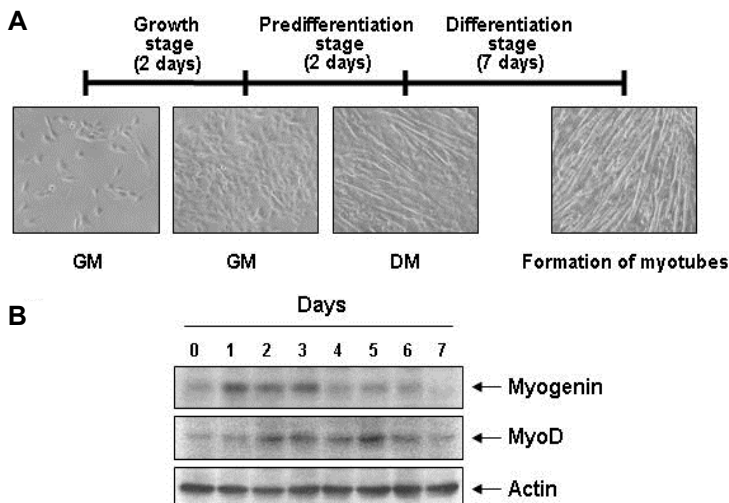


Fig. 1. Differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. (A) Pre-differentiation stage was incubated for 2 days in growth medium containing 10% FBS. Then, differentiation of myoblasts was induced for 7 days in differentiation medium containing 2% HS, and differentiation medium was changed every 48 hours. Photographs were taken under an inverted microscope. (B) Expression levels of myogenin and myoD were compared across the differentiation stages. Cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

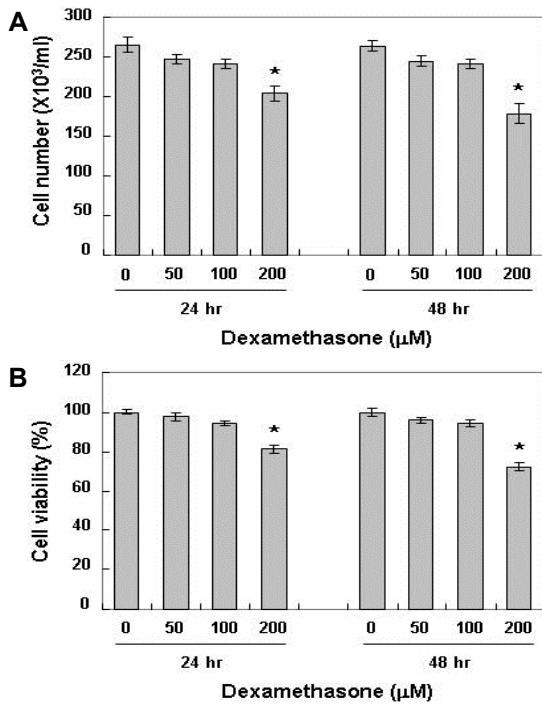


Fig. 2. Effects of dexamethasone on the cell growth in C2C12 myoblasts. Cells were treated with the indicated concentrations of dexamethasone for 24 and 48 hr. Cell number (A) and viability (B) were determined by hemocytometer counts of trypan blue excluding cells and MTT assay, respectively. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test (* p <0.05 vs. untreated control).

와 지름이 감소함으로써 전체적인 근육량의 감소가 나타나게 된다[3, 22]. 이러한 근위축 현상을 설정하기 위한 *in vitro* 연구를 위하여 dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 인위적인 근위축 유도인자로서 활용될 수 있는지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 충분히 분화가 유발된 C2C12 myotube에 dexamethasone 및 hydrogen peroxide를 처리하였을 경우 나타나는 근섬유의 형태적인 특징을 도립현미경을 이용하여 관찰하였으며, 근섬유의 지름을 측정하였다. 먼저 분화가 유발된 C2C12 myotube에 dexamethasone을 처리하였을 경우 유발하는 근위축 현상을 확인한 결과, Fig. 4A 및 Fig. 4B에 나타난 바와 같이 dexamethasone 처리시간 및 농도 의존적으로 근섬유의 수가 감소하였으며, 근섬유의 지름도 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 Fig. 5A 및 Fig. 5B에 나타난 바와 같이 hydrogen peroxide를 처리하였을 경우에도 dexamethasone 처리군과 마찬가지로 처리농도 및 시간이 증가할수록 근섬유의 수가 감소하는 것으로 나타났으며, 근섬유의 지름도 감소하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과들을 살펴볼 때 세포독성이 없는 조건의 dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 C2C12 myotube의 근위축을 유발한다는 것을 알 수 있었으며

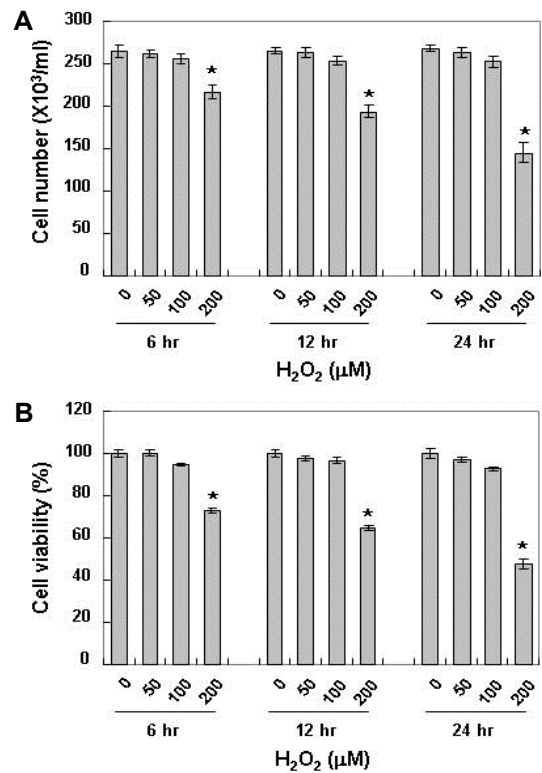


Fig. 3. Effects of hydrogen peroxide on the cell growth in C2C12 myoblasts. Cells were treated with the indicated concentrations of hydrogen peroxide for 6, 12 and 24 hr. Cell number (A) and viability (B) were determined by hemocytometer counts of trypan blue excluding cells and MTT assay, respectively. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test (* p <0.05 vs. untreated control).

로 인위적인 근위축 유도인자로 사용할 수 있을 것으로 생각 된다.

Dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 muscle-specific ubiquitin ligase 및 muscle-specific transcription factor 들의 발현에 미치는 영향

근위축은 ubiquitin-proteasome 경로의 활성화를 통한 근육 단백질의 분해에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다[2, 23]. Ubiquitin-proteasome 경로는 ubiquitin-activating enzymes (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2) 및 ubiquitin ligases (E3)라는 효소들이 매개하여 표적 단백질과 ubiquitin의 공유결합을 유발시킴으로서 단백질 분해 개시를 유도한다 [25, 26]. 특히 심장 및 골격근에서 특이적으로 발현되는 F-box type E3 ligase인 MAFbx/atrogen-1 및 Ring Finger 유형의 E3 ligase인 MuRF1은 근위축을 유발하는 다양한 조건에서 증가하여 세포주기 억제 및 근육 특이적인 유전자 발현의 활성화를 통한 myogenic differentiation에 관여하는 muscle-spe-

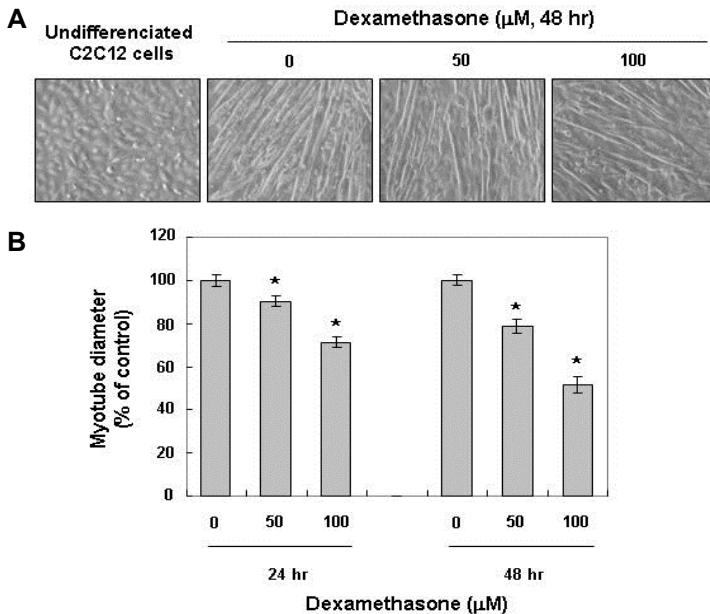


Fig. 4. Induction of muscle atrophy by dexamethasone in C2C12 myotubes. (A) Fully differentiated C2C12 myotubes were treated with dexamethasone (0, 50 and 100 μM) for 48 hr. Photographs were taken under an inverted microscope. (B) Relative changes in myotube diameter determined at intervals of 24 and 48 hr by treatment of dexamethasone (0, 50 and 100 μM). The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test ($*p < 0.05$ vs. untreated control).

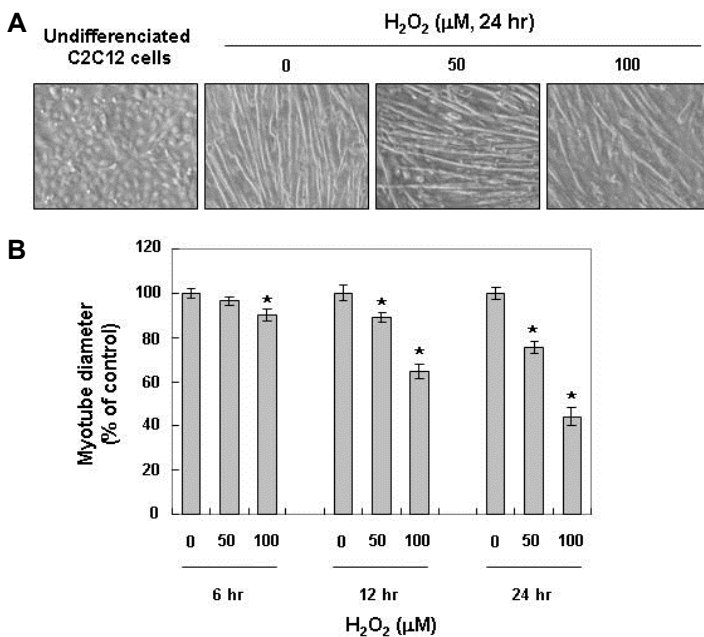


Fig. 5. Induction of muscle atrophy by hydrogen peroxide in C2C12 myotubes. (A) Fully differentiated C2C12 myotubes were treated with hydrogen peroxide (0, 50 and 100 μM) treatment for 48 hr. Photographs were taken under an inverted microscope. (B) Relative changes in myotube diameter determined at intervals of 6, 12 and 24 hr by treatment of hydrogen peroxide (0, 50 and 100 μM). The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The significance was determined by the Student's t-test ($*p < 0.05$ vs. untreated control).

cific transcription factor인 myogenin과 MyoD의 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다[1, 8, 30, 32]. 따라서 dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 유발하는 근위축 현상이 muscle-specific ubiquitin ligase 및 muscle-specific transcription factor의 발현에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하였다. Fig. 6A 및 B에서 나타난 바와 같이 muscle-specific ubiquitin ligase인 MAFbx/atrogen-1 및 MuRF1의 발현 변화를 확인한 결과 근위축을 유발하지 않았을 경우에는 발현이 되지 않았지만 dexamethasone 및 hydrogen peroxide 처리에 의한 근위축이 유발되는 조건에서 처리농도 및 시간에 따른 발현 증가가 유발되었다. 또한 muscle-specific transcription factor들의 경우에

는 myotube로 분화가 유발되었을 경우 발현이 증가되었지만 dexamethasone 및 hydrogen peroxide 처리에 의하여 현저한 발현 감소가 유발되는 것으로 나타났다. 이는 dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 muscle-specific ubiquitin ligase 등의 발현을 증가시켜 ubiquitin-proteasome 경로를 통한 muscle-specific transcription factor 등의 분해를 유발함으로써 근위축을 유발한다는 것을 제시하는 결과이다. 본 연구 결과는 근위축과 관련된 *in vitro* 실험 모델의 구축을 위하여 myoblast에서 myotube로의 최적의 분화조건 확립과 함께 dexamethasone 및 hydrogen peroxide가 근위축을 위한 유도제로 사용될 수 있는 가능성을 제시하는 것으로서 향후 지속적인 연구

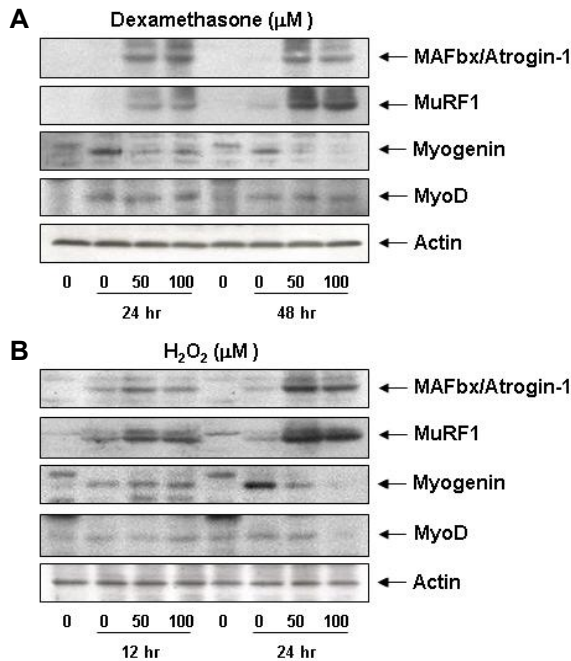


Fig. 6. Effects of dexamethasone (A) and hydrogen peroxide (B) on the levels of muscle-specific ubiquitin ligases (MAFbx/atrogin-1 and MuRF1) and muscle-specific transcription factors (MyoD and myogenin) expression in C2C12 myotubes. Cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

를 위한 귀중한 자료로서의 가치가 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품 기술개발사업(No. 314043-3)의 지원으로 이루어졌음.

References

- Abe, S., Rhee, S., Iwanuma, O., Hiroki, E., Yanagisawa, N., Sakiyama, K. and Ide, Y. 2009. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, myogenin and MRF4 in proliferated myoblasts. *Anat. Histol. Embryol.* **38**, 305-310.
- Attaix, D., Combaret, L., Béchet, D. and Taillandier, D. 2008. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy in cachexia. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* **2**, 262-266.
- Bhatnagar, S., Mittal, A., Gupta, S. K. and Kumar, A. 2012. TWEAK causes myotube atrophy through coordinated activation of ubiquitin-proteasome system, autophagy, and caspases. *J. Cell. Physiol.* **227**, 1042-1051.
- Bodine, S. C. and Baehr, L. M. 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **307**, E469-484.
- Chaudhary, P., Suryakumar, G., Prasad, R., Singh, S. N., Ali, S. and Ilavazhagan, G. 2012. Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy: role of ubiquitin-proteasome pathway and calpains. *Mol. Cell. Biochem.* **364**, 101-113.
- Du, J., Mitch, W. E., Wang, X. and Price, S. R. 2000. Glucocorticoids induce proteasome C3 subunit expression in L6 muscle cells by opposing the suppression of its transcription by NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **275**, 19661-19666.
- Evenson, A. R., Fareed, M. U., Menconi, M. J., Mitchell, J. C. and Hasselgren, P. O. 2005. GSK-3beta inhibitors reduce protein degradation in muscles from septic rats and in dexamethasone-treated myotubes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **37**, 2226-2238.
- Foletta, V. C., White, L. J., Larsen, A. E., Léger, B. and Russell, A. P. 2011. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* **461**, 325-335.
- Gomes-Marcondes, M. C. and Tisdale, M. J. 2002. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* **180**, 69-74.
- Hyatt, J. P., Roy, R. R., Baldwin, K. M. and Edgerton, V. R. 2003. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285**, C1161-1173.
- Jagoe, R. T. and Goldberg, A. L. 2001. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4**, 183-190.
- Jesinkey, S. R., Korrapati, M. C., Rasbach, K. A., Beeson, C. C. and Schnellmann, R. G. 2014. Atomoxetine prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **351**, 663-673.
- Kandarian, S. C. and Jackman, R. W. 2006. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* **33**, 155-165.
- Kiess, M., Gill, R. M. and Hamel, P. A. 1995. Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene* **10**, 159-166.
- Ko, J. A., Kimura, Y., Matsuura, K., Yamamoto, H., Gondo, T. and Inui, M. 2006. PDZRN3 (LNX3, SEMCAP3) is required for the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. *J. Cell. Sci.* **119**, 5106-5113.
- Laviano, A., Meguid, M. M., Preziosa, I. and Rossi Fanelli, F. 2007. Oxidative stress and wasting in cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **10**, 449-456.
- Lawler, J. M., Song, W. and Demaree, S. R. 2003. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 9-16.
- Li, X., Moody, M. R., Engel, D., Walker, S., Clubb, F. J. Jr., Sivasubramanian, N., Mann, D. L. and Reid, M. B. 2000.

- Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation* **102**, 1690-1696.
19. Li, Y. P., Chen, Y., Li, A. S. and Reid, M. B. 2003. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285**, C806-812.
 20. Marinovic, A. C., Zheng, B., Mitch, W. E. and Price, S. R. 2007. Tissue-specific regulation of ubiquitin (UbC) transcription by glucocorticoids: *in vivo* and *in vitro* analyses. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **292**, F660-666.
 21. Mastrocola, R., Reffo, P., Penna, F., Tomasinelli, C. E., Bocuzzi, G., Baccino, F. M., Aragno, M. and Costelli, P. 2008. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 584-593.
 22. Menconi, M., Gonnella, P., Petkova, V., Lecker, S. and Hasselgren, P. O. 2008. Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *J. Cell. Biochem.* **105**, 353-364.
 23. Murton, A. J., Constantin, D. and Greenhaff, P. L. 2008. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 730-743.
 24. Otis, J. S., Ashikhmin, Y. I., Brown, L. A. and Guidot, D. M. 2008. Effect of HIV-1-related protein expression on cardiac and skeletal muscles from transgenic rats. *AIDS Res. Ther.* **5**, 8.
 25. Passmore, L. A. and Barford, D. 2004. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* **379**, 513-525.
 26. Pickart, C. M. and Eddins, M. J. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 55-72.
 27. Qin, J., Du, R., Yang, Y. Q., Zhang, H. Q., Li, Q., Liu, L., Guan, H., Hou, J. and An, X. R. 2013. Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy was associated with upregulation of myostatin promoter activity. *Res. Vet. Sci.* **94**, 84-89.
 28. Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W. O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* **14**, 395-403.
 29. Talarmin, H., Derbré, F., Lefevre-Orfila, L., Léon, K., Droguet, M., Pennec, J. P. and Giroux-Metgès, M. A. 2017. The diaphragm is better protected from oxidative stress than hindlimb skeletal muscle during CLP-induced sepsis. *Redox Rep.* **22**, 218-226.
 30. Tintignac, L. A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M. P. and Leibovitch, S. A. 2005. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **280**, 2847-2856.
 31. Wing, S. S. 2005. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **37**, 2075-2087.
 32. Yamamoto, D., Ikeshita, N., Matsubara, T., Tasaki, H., Herningtyas, E. H., Toda, K., Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., Chihara, K. and Okimura, Y. 2008. GHRP-2, a GHS-R agonist, directly acts on myocytes to attenuate the dexamethasone-induced expressions of muscle-specific ubiquitin ligases, Atrogin-1 and MuRF1. *Life Sci.* **82**, 460-466.

초록 : C2C12 근관세포에서 dexamethasone 및 hydrogen peroxide에 의한 근위축 유도

박 철¹ · 정진우^{2,3} · 최영현^{2,3*}

(¹동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, ²동의대학교 항노화연구소, ³동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 근-골격계 질환제어 융합연구실)

일반적으로 노화, 영양부족 및 다양한 만성질환에 의하여 유발되는 근위축은 근육 단백질 합성 억제 및 분해 증가를 통하여 근섬유 및 근육의 밀도를 감소시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 근위축과 관련된 *in vitro* 실험을 위한 C2C12 근아세포에서 근관세포로의 분화과정을 확립하고, 분화가 유발된 C2C12 근관세포를 대상으로 dexamethasone 및 hydrogen peroxide에 의한 근위축 유발 및 관련 단백질들의 발현 변화를 조사하였다. 먼저 C2C12 근아세포에 분화배지를 처리하였을 경우 근관세포로 분화가 유발되었으며, 분화와 관련된 단백질인 myogenin 및 myoD의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 분화가 유발된 C2C12 근관세포에 세포독성이 없는 조건의 dexamethasone 및 hydrogen peroxide를 처리하였을 경우 근관의 지름이 감소하였으며, 이러한 현상은 muscle-specific ubiquitin ligases인 MAFbx/atrogin-1 및 MuRF1의 발현 증가와 함께 muscle-specific transcription factor 인 myogenin 및 MyoD의 발현 감소와 관련이 있다는 것을 확인하였다. 본 연구 결과는 근위축과 관련된 *in vitro* 실험 모델의 구축을 위한 최적의 분화조건 확립과 함께 dexamethasone 및 hydrogen peroxide를 근위축 유도제로 사용할 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.