

골격근의 수축과 가소성에 대한 신호전달-매개 단백질 및 관련 효소의 상관성

김중환

용인대학교 물리치료학과

Relationship of the Signal Transduction-mediated Proteins and Enzymes to Contractility and Plasticity in Skeletal Muscles

Jung-Hwan Kim, PT, PhD

Department of Physical Therapy, Yongin University

Background: It is generally accepted that skeletal muscle contraction is triggered by nerve impulse and intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) released from intracellular Ca^{2+} stores such as sarcoplasmic reticulum (SR). Specifically, this process, called excitation-contraction (E-C) coupling, takes place at intracellular junctions between the plasma membrane, the transverse (T) tubule L-type Ca^{2+} channel (dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channel, DHPR, also called tetrads), and the SR Ca^{2+} release channel (ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channel, RyR, also called feet) of internal Ca^{2+} stores in skeletal muscle cells. Furthermore, it has been reported that the Ca^{2+} -dependent and -independent contraction determine the expression of skeletal muscle genes, thus providing a mechanism for tightly coupling the extent of muscle contraction to regulation of muscle plasticity-related excitation-transcription (E-T) coupling. **Purpose:** Expression and activity of plasticity-associated enzymes in gastrocnemius muscle strips have not been well studied, however. **Methods:** Therefore, in this study the expression and phosphorylation of E-C and E-T coupling-related mediators such as protein kinases, ROS(reactive oxygen species)- and apoptosis-related substances, and others in gastrocnemius muscles from rats was examined. **Results:** I found that expression and activity of MAPKs (mitogen-activated protein kinases, ERK1/2, p38MAPK, and SAPK/JNK), apoptotic proteins (cleaved caspase-3, cytochrome c, Ref-1, Bad), small GTP-binding proteins (RhoA and Cdc42), actin-binding protein (cofilin), PKC (protein kinase C) and Ca^{2+} channel (transient receptor potential channel 6, TRPC6) was observed in rat gastrocnemius muscle strips. **Conclusion:** These results suggest that MAPKs, ROS- and apoptosis-related enzymes, cytoskeleton-regulated proteins, and Ca^{2+} channel may in part functionally import in E-C and E-T coupling from rat skeletal muscles. (*J Kor Soc Phys Ther 2007;19(4):1-14*)

Key Words: Excitation-contraction coupling, Excitation-transcription coupling, Signal transduction

논문접수일: 2007년 3월 14일

수정접수일: 2007년 5월 24일

게재승인일: 2007년 6월 23일

교신저자: 김중환, junghwankim3@hanmail.net

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임" (KRF-2006-331-E00275)

1. 서론

골격근은 체중의 약 40~50% 이상을 차지하는 거대한 결합조직으로써 부하와 활성의 증가 및 그 반대 자극 등에 대해 대처하는 능력 즉, 적응-

용량(adaptive capacity) 및 가소성(plasticity)이 매우 큰 조직이다(이운호 등, 2006; Berchtold 등, 2000; Flück와 Hoppeler, 2003).

이러한 수축 및 가소성 유발기전의 근간을 이루는 수축-이완 반응에서 전령의 역할을 하는 것이 세포내 Ca^{2+} (intracellular Ca^{2+} ; $[Ca^{2+}]_i$)의 증감이다(Kim 등, 1992; Berchtold 등, 2000; Chin, 2005). 이러한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 T-소관의 형질막을 통해 전도된 활동전압을 감지할 수 있는 부위를 지닌 디하이드로피리딘-민감성 Ca^{2+} 통로(dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channel 혹은 dihydropyridine receptor; DHPR)와 근장그물의 종말수조(terminal cisternae) 부위에서 전자치밀구조를 보이는 이유로 "feet(triad junctional foot proteins 혹은 junctional feet)"로 명명한 라이아노딘-민감성 Ca^{2+} 통로(ryanodine-sensitive Ca^{2+} channel; RyR)의 복합체가 형성하는 "tetrads-feet"가 열림으로서 근장그물의 종말수조 부위에 고농도로 존재하고 있는 Ca^{2+} 이 세포질로 유리됨으로써 수축반응의 근간이 된다(김중환 등, 2005).

이러한 Ca^{2+} 의 유리는 트로포닌 복합체에서 트로포닌 C와 결합을 촉발시키고 일련의 작용기전을 거쳐 마이오신의 부분절편-1(subfragment-1; S-1) 부위 즉, ATP결합의 반대 측이 액틴단백질과 결합하는 것을 허용하게 되어 근수축이 유발된다(Berchtold 등, 2000; Gordon 등, 2001; 山本啓一과 丸山工作, 1986)(Figure. 1). 특히 평활근과 결정적 차이는 증가된 $[Ca^{2+}]_i$ 이 Ca^{2+} -결합단백질인 칼모둘린(calmodulin; CaM)과 결합하여 마이오신에 작용하는 것이 아닌 트로포닌과 결합하여 액틴의 마이오신 결합의 친화성을 조절한다는 것이다(Karaki 등, 1997). 이러한 흥분-수축 연결구조(excitation-contraction; E-C coupling)의 양상은 근조직의 특성과 그 신호전달 기전에 따라 차이가 나타남이 보고되어 주목을 받고 있다(김중환 등, 2005).

한편, 세포내 Ca^{2+} 의존성 혹은 Ca^{2+} -비의존성으로 활성화되는 효소인 Ca^{2+} -칼모둘린 의존성 단백질부활효소(Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase; CaMK)의 동위효소를 비롯한 아데노신 일

인산-활성 단백질부활효소(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; AMPK) 등의 활성 증감이 골격근의 가소성과 연관성이 있는 흥분-전사 경로(excitation-transcription; E-T pathway)를 조절하는 내용이 보고되어 있다(Chin, 2005; Koulmann과 Bigard, 2006; Jørgensen 등, 2006)(Figure. 1). 그러나 이러한 흥분-전사 경로의 명확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않으며, CaMK와 AMPK 외에 가소성 조절에 관여 혹은 관여 가능성이 있는 효소역시 정확히 모르고 있다. 따라서 본 연구에서는 골격근의 흥분-수축 및 흥분-전사 연결구조에 관

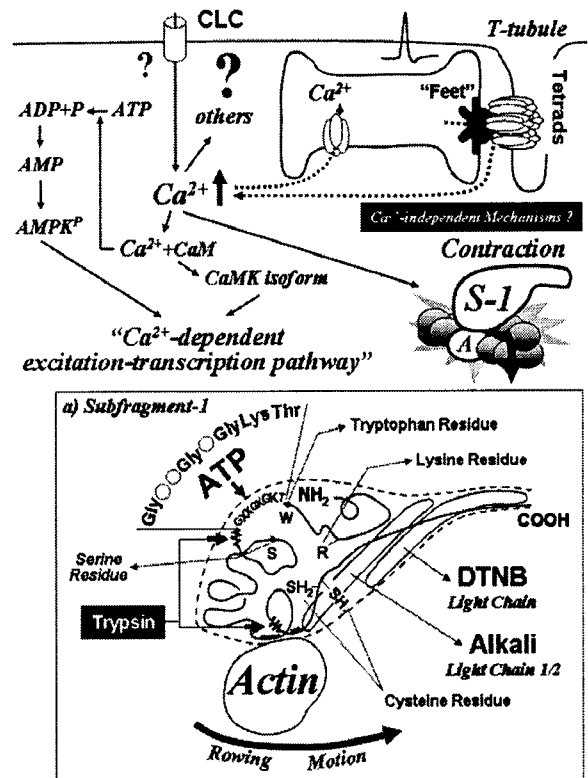


Figure 1. The schematic representation of signal transduction on contraction and excitation-transcription pathway in skeletal muscles.

DHPR; dihydropyridine-sensitive L-type, Ca^{2+} channel, CLC; Ca^{2+} leak channels, T-tubule; transverse tubule, CaM; calmodulin, CaMK; Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase, S-1; subfragment-1, Gly; glycine, Lys; lysine, Thr; threonine, DTNB; 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), A; actin, ATP; adenosine triphosphate, ADP; adenosine diphosphate, AMP; adenosine monophosphate, AMPK; AMP-activated protein kinase, P; inorganic phospholus, PM; plasma membrane. (Figure. 1a: quoted and modified from 山本啓一 and 丸山工作, 1986)

여할 수 있는 효소 등의 상관성을 골격근 조직을 이용한 실험을 통해 확인해보고 그 기전을 추정함으로써 근 질환에 대한 물리치료의 중재와 연구를 위한 기초자료로 도움이 되고자 하였다.

II. 연구방법

1. 실험동물

실험동물은 170~190g의 웅성, SPF(specific pathogen free) 흰쥐 25마리를 사용하였으며(대한바이오링크, 대한민국), 12시간의 명암주기로 사육하였다. 입하 후 1주일은 환경적응 기간으로 사육하였으며, 입하 2주에 해당되는 기간에 본 실험을 실시하였다.

물과 사료(실험동물전용사료)는 충분히 공급하였으며, 사육장의 온도는 자동온도조절시스템(허리케인0300, 천우이엔씨)을 이용하여 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 또한 본 실험을 위해 실험동물에 CO₂ 가스를 흡입시켜 도살시킨 후, 좌측과 우측 하지를 절개하여 비복근(gastrocnemius muscle)을 적출하여 본 연구에 사용하였다. 채취한 골격근 조직은 생리적 식염수(Krebs solution [mM]; NaCl: 118.0, KCl: 4.8, glucose: 10.0, NaHCO₃: 24.9, KH₂PO₄: 1.2, CaCl₂: 2.5, MgSO₄: 1.2)로 세척한 후, 결체조직과 지방조직의 제거하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 단백질 발현의 관찰을 위한 은 염색법

전기영동으로 분리된 단백질의 발현 양상 및 정도를 살펴보기 위하여 다음과 같이 은-염색(silver stain)을 실시하였다(Lee 등, 2006b). 준비된 겔을 고정액(50% methanol, 12% acetic acid, 0.05% formaldehyde)에 넣어 진탕한 후 에탄올(50%)로 세척하였다. 이어서 Na₂S₂O₃로 감작시킨 후, 3차 증류수로 세척하였다. 다음 0.1%의 silver nitrate에서 진탕한 후 3차 증류수로 세척하였다.

곧이어 현상액(0.0002% Na₂S₂O₃, 3% Na₂CO₃, 0.025% formaldehyde)에 넣어 발현정도를 관찰하였다.

2) Western blotting을 이용한 단백질 발현과 인산화의 측정

단백질의 발현과 활성을 측정 및 관찰하기 위하여 본 연구자가 이전 결과에 적용했던 Western blotting 법을 실시하였다(Kim 등, 2005, 2006). 준비된 근 표본을 분리한 후 단백질의 변성 및 분해효소의 작용을 막기 위하여 액체질소(LN₂)에 보관하여 사용하였다.

각 조직은 조직분쇄용 완충액[50mM Tris-HCl(pH 7.4), 5mM EGTA, 5mM DTT, 300μM PMSF, 20mM β-glycero phosphate, 1mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 5μg/ml aprotinin, 5μM leupeptin, 1% Triton X, 10% glycerol, 150mM NaCl]에서 파쇄하였다. 표본을 14,000×G에서 10분간 원심분리(High-speed centrifuge, Micro 17R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korea)하여 상층액(supernatant; sup.)을 취하였다. 그러나 다른 조직과 달리 골격근 조직 하층의 침전물(pellet; pet.)은 점성이 있는 젤리상태로 존재함을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 이 두층을 구별하여 단백질을 분리하여 그 형태를 살펴보았다.

단백질농도는 Bradford 법(1976)을 이용하여 측정하였다. 준비된 샘플은 gel loading sampling buffer[4% SDS, 40mM Tris-HCl(pH 6.8), 8mM EDTA, 4% mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue, 40% glycerol]와 1:1로 혼합하여 최종 농도를 0.5mg/ml로 만들었다. 그 후 단백질 샘플을 95°C에서 5분간 변성시켰다. SDS용 겔을 작성한 후 전기영동용 수조에 장착하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동 된 겔은 Coomassie brilliant blue 염색법으로 20분간 적용한 후 탈색하여 골격근 단백질의 분리 정도 및 양상을 살펴보았다(Malloy 등, 1984).

Western blotting을 위해서 전기영동 된 겔은 때 어낸 후 전사용액[1M Tris-HCl(pH 6.8), 0.192M glycine, 5% methanol, 0.037% SDS]으로 세척하고,

준비된 PVDF paper에 겔 당 40mA로 전사하였다. 1차 항체의 비 특이적인 결합을 막기 위하여 5% 탈지분유(skim milk, Morinaga)로 진탕하였다.

이어서 1차 항체(1:1000)를 넣고 4°C에서 12시간 정도 반응시켰다. Horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG(1:5000)와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 PBST (PBS/0.05% Tween 20)로 세척하였다. ECL Kit를 이용해서 암실에서 X-ray 필름에 노출시키고 노출된 필름을 현상액에 넣어 면역-활성 밴드를 관찰한 후 증류수로 세정하여 정착액에서 정착시켰다. PVDF paper나 X-ray 필름에 나타난 면역-활성 밴드는 이미지 분석기(Biopprofil, Vilber Lourmat, France)로 정량하였다.

3) 사용 시약

본 연구에서 실시한 단백질의 분리 및 인산화 측정을 위해 사용된 시약은 다음과 같다.

2-mercaptoethanol, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), sodium fluoride (NaF), Sodium orthovanadate (Na_3VO_4), aprotinin, leupeptin, glycerol, ethylene glycol-bis[β -Aminoethylether] N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dimethyl sulfoxide (DMSO), β -glycerophosphate, tris[(hydroxymethyl) aminomethane], acrylamide, bis-acrylamide(N,N'-methylene-bisacrylamide), sodium dodecyl sulfate (SDS), ammonium persulfate, N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), bovine serum albumin (BSA), coomassie blue (이상 Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다.

Triton X-100, dithiothreitol (DTT), low molecular weight electrophoresis calibration kit (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하였으며, active p42/44 MAPK antibody (Promega, USA)와 active p38 MAPK antibody (New England Biolabs Inc., USA) 및 cruz marker™ molecular weight standards (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 이용하여 실시하였다.

또한 Glycine (Junsei Pure Chemical Co., Japan)과 enhanced chemiluminescence (ECL) kit, polyvinylidene fluoride (PVDF) paper (Millipore Co., USA), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween

20) 및 bromophenol blue (Quantum Bio-technologies Inc., USA)를 사용하여 본 연구를 수행하였다.

III. 결 과

1. 골격근 단백질의 분리 특성과 조직 특이성 단백질 분리양상의 관찰

골격근 조직의 수축 및 가소성에 관여하는 신호전달 매개 단백질 발현과 활성도를 살펴보기 위해 전기영동을 통한 단백질 분리로 특정 단백질의 발현을 살펴보는 과정에서 원심분리에 의한 독특한 현상을 관찰할 수 있었다. 즉, 다른 혈관 조직을 비롯한 평활근조직 및 연골, 간 및 신장 조직에서와 달리 원심분리를 통해 분리된 하층의 침전물이 투명한 겔의 형태와 점성을 띠는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 상층과 하층 및 상, 하층을 합한 표본을 전기영동으로 단백질을 분리하여 Coomassie blue와 silver nitrate로 염색하여 분리정도를 관찰하였다(Figure. 2A). 또한 쥐의 주령별 비복근 단백질조직의 분리양상을 상층과 하층으로 분류하여 확인하였다(Figure. 2B).

결과 Coomassie blue와 silver nitrate 염색 모두에서 상층의 단백질양이 하층의 그것보다 많음과 동시에 분자량 별로 나타난 단백질의 양도 상층에서 많이 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러나 상층과 하층을 합한 단백질의 양과 분리의 형태는 상층과 유사함을 확인할 수 있었다(Figure. 2A). 이러한 결과는 주령별 비복근 조직을 이용한 실험에서도 정도에 약간의 차이는 있었으나 이전 실험의 결과와 유사함을 확인할 수 있었다(Figure. 2B). 따라서 총 단백질의 양을 이용한 실험의 경우, 상층과 하층을 합한 모든 단백질을 사용해야 함을 이해 및 추정할 수 있었다. 이러한 내용을 보충할 수 있는 또 다른 근거는 조직 분쇄용 완충액의 성분 중 첨가한 Triton-X로 이해할 수 있었다(Hilder 등, 2003; Vermaelen 등, 2005).

한편, 골격근 조직의 단백질 분리 형태와 다른 조직에서 나타나는 경향을 비교 관찰하기 위해 비복근과 함께 대퇴사두근, 혈관 평활근, 혈청, 소변, 척수, 좌골신경, 간, 신장, 부신, 비장, 폐, 흉선, 연골조직, A7r5 평활근세포 및 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell) 세포의 전기영동을 통한 단백질 분리의 형태 및 정도를 살펴보았다(Figure. 3). 결과 비복근과 대퇴사두근조직의 단백질 분리의 형태와 정도는 유사함을 확인할 수 있었다(Figure. 3A). 이러한 골격

근조직의 단백질분리는 혈청과 간 및 신장조직의 분리 형태와 유사하게 단백질의 양이 다른 조직에 비해 상대적으로 많은 부분을 차지함을 이해할 수 있었다. 그러나 혈관 평활근 조직과 소변, A7r5 세포 및 HUVEC 세포의 단백질 분리의 형태와 양은 다른 조직에 비해 상대적으로 적은 부분을 차지하는 것이 확인되었다(Figure. 3). 또한 골격근 조직을 제외한 각 조직의 분리된 단백질의 형태 및 정도 역시 조직 특이성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure. 3).

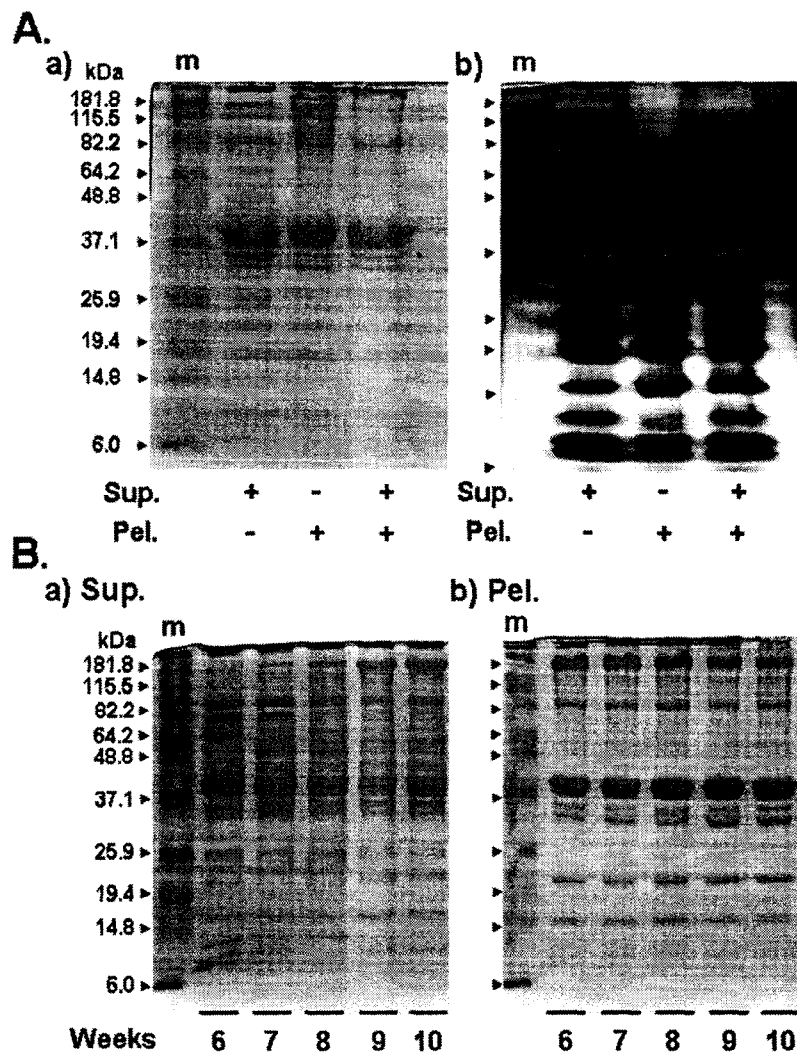


Figure 2. Coomassie- (A-a and B) and silver-stained (A-b) SDS-PAGE gel of supernatant and pellet protein extracts from the gastrocnemius muscles. Sup.; supernatant, Pel.; pellet, m; maker.

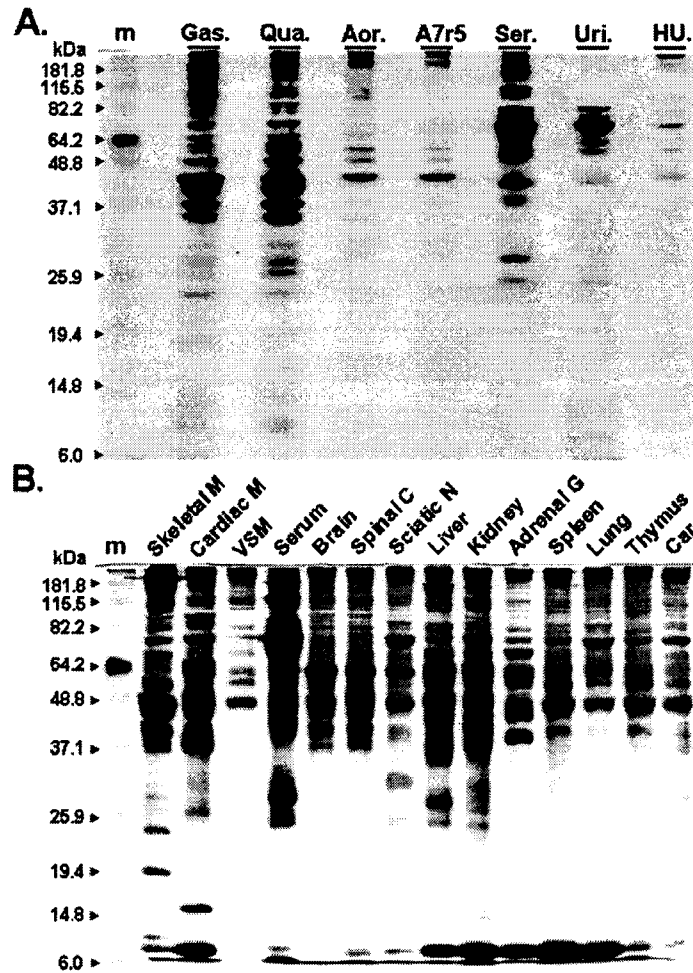


Figure 3. Silver-stained SDS-PAGE gel of total protein extracts from rats. Gas; gastrocnemius muscle, Qua; quadriceps muscle, Aor; aorta, A7r5; smooth muscle cell line, Ser; serum, Uri; urine, HU; HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) cell line, Skeletal M; skeletal muscle, Cardiac M; cardiac muscle, VSM; vascular smooth muscle, Spinal C; spinal cord, Sciatic N; sciatic nerve, Adrenal G; adrenal gland, Car; cartilage, m; marker.

2. 골격근 수축 및 가소성에 관여하는 신호 전달-매개 단백질의 발현과 활성의 측정

골격근 조직의 수축 및 가소성에 관여하는 혹은 관여할 가능성이 존재하는 단백질 및 그 활성도를 살펴본 결과 다음과 같다.

단백질 부활효소 B (protein kinase B; PKB)라고 알려져 있는 Akt와 유사분열-활성 단백질부활효

소 (MAPK)의 발현 및 인산화가 흰쥐의 비복근 조직에 존재함을 확인할 수 있었다 (Figure. 4A, 4B, 4C, 4D).

단백질 부활효소 C (protein kinase C; PKC)의 동위효소 중에서 Ca^{2+} 의존성 PKC인 PKC α / β II와 12개 이상 동위효소 전체의 인산화를 관찰할 수 있는 pan-PKC의 인산화 유무를 관찰한 결과 인산화가 존재함을 확인할 수 있었다 (Figure. 4E, 4F).

또한 LIM kinase와 RhoA, cdc42, HSP27, cofilin, 산화-환원인자-1(redox factor-1; 이하 Ref-1), cleaved caspase-3, cytochrome c, Bad, 비장-유래 타이로신 부활효소(spleen tyrosine kinase, 이하 Syk), cyclin D1, AKPK, 글리코젠 합성 부활효소

(glycogen synthesis kinase; 이하 GSK) 및 TRPC6(transient receptor potential channel 6)의 발현과 인산화가 흰쥐의 비복근 조직에 존재함을 확인할 수 있었다(Figure. 4G, 4H, 4I, 4J; Figure. 5A, 5C, 5D, 5E, 5F, 5G, 5H, 5I, 5J, 5K).

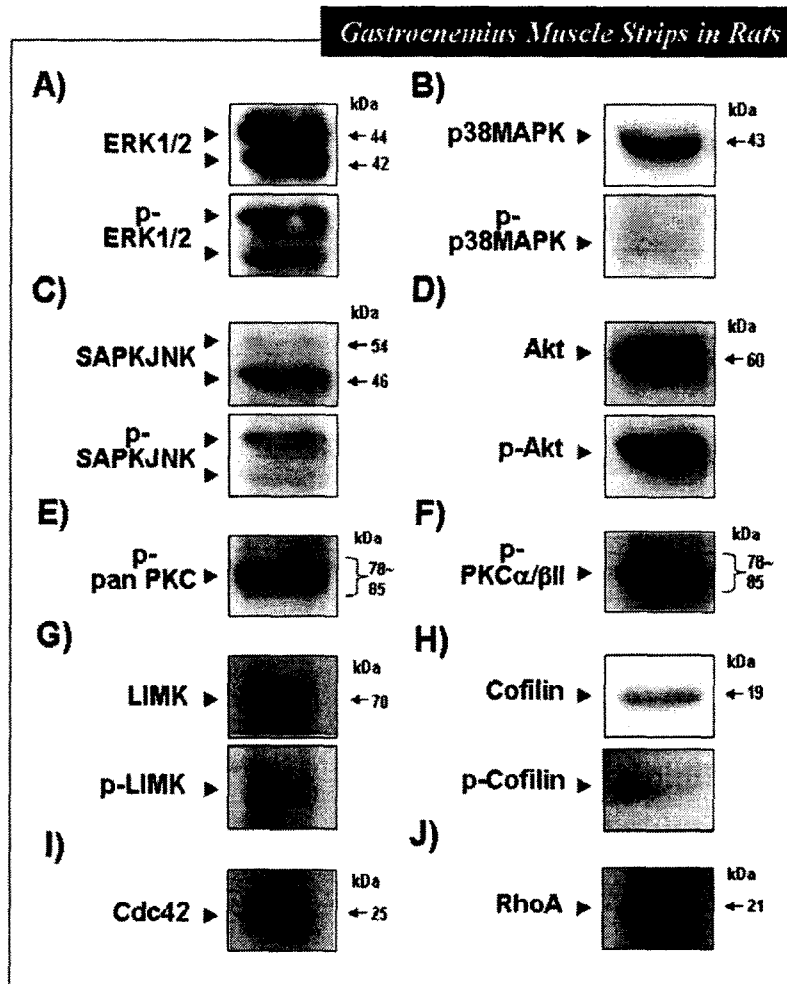


Figure 4. The expression and phosphorylation of enzymes in gastrocnemius muscle from rats. ERK1/2; extracellular-regulated protein kinase 1/2, SAPK/JNK; stress activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal protein kinase, p38MAPK; p38 mitogen-activated protein kinase, Akt; protein kinase B, PKC; protein kinase C, p-; phosphorylation of protein.

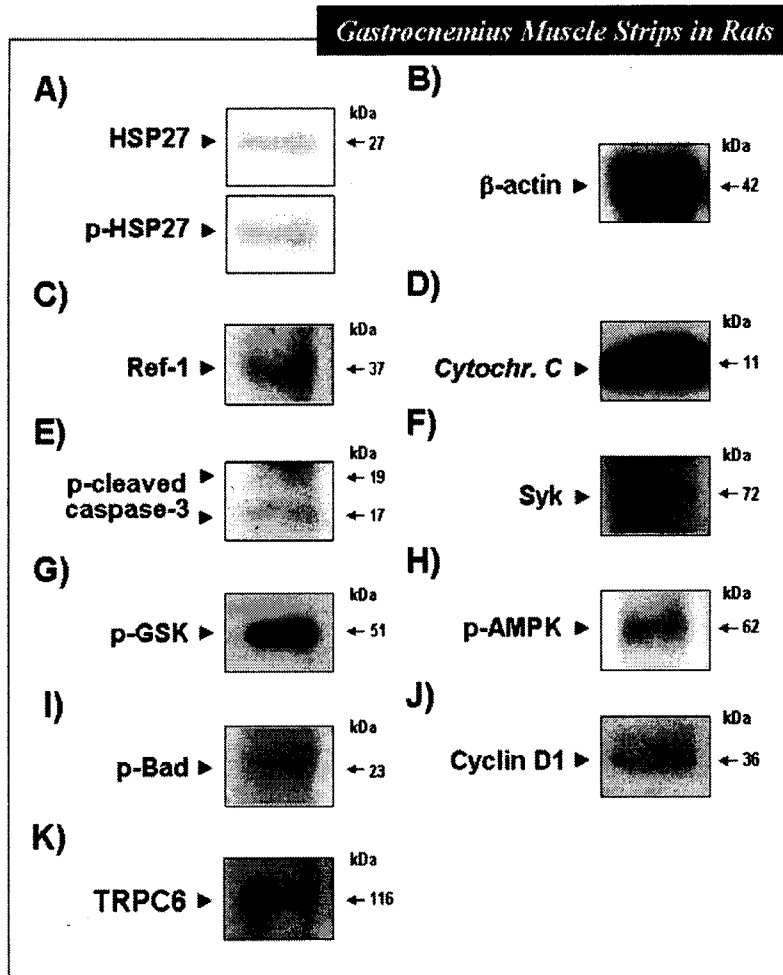


Figure 5. The expression and phosphorylation of enzymes in gastrocnemius muscle from rats. HSP; heat shock protein, Ref-1; redox factor-1, Cytochr. C; cytochrome C, Syk; spleen tyrosine kinase, GSK; glycogen synthesis kinase, AMPK; adenosine monophosphate kinase, TRPC6; transient receptor potential channel 6, p-; phosphorylation of protein.

IV. 고찰

골격근의 가소성(muscle plasticity)은 외부 자극의 유무 즉, 가중된 부하와 소실 혹은 자극 빈도의 증가와 감소 등과 같은 신호에 대처하는 근세포의 능력으로써 근비대(hypertrophy) 혹은 근지구력 증가, 근위축(atrophy) 등의 형태로 표현된다. 이러한 골격근의 특성은 근-관련 질환에 이환된 환자를 대상으로 검진, 치료의 계획을 세우는 과정 및 치료적용에 있어서 매우 중요한 요소가 된다. 따라서 골격근의 가소성 변화에 관여 혹은

가능성이 있는 단백질 발현과 효소활성의 확인 및 관찰은 기초물리치료학에서 필요한 과정으로써 내용은 다음과 같다.

이전 연구보고에 의해 골격근의 비대 혹은 위축 기전에 매우 중요한 역할을 하는 매개체로써 Akt 부활효소의 상관성이 잘 보고 되어 있다(Hilder 등, 2003; Sandri 등, 2004). 또한 MAPK의 발현과 활성이 관여한다는 내용도 보고되어 있다(Hilder 등, 2003; Machida와 Booth, 2005).

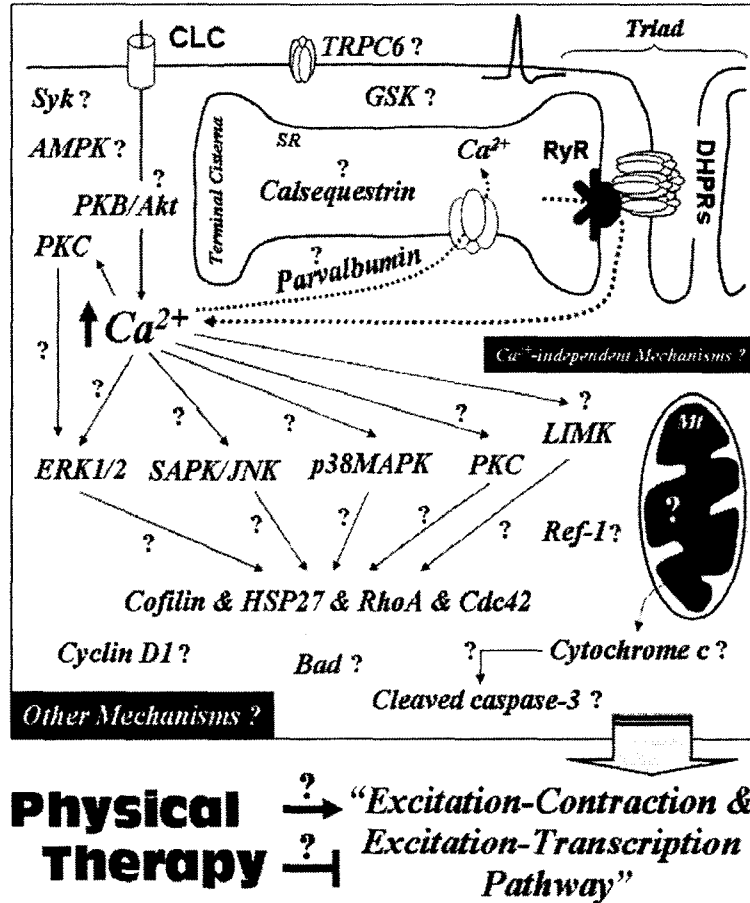


Figure 6. The schematic representation of signal transduction on excitation-contraction and excitation-transcription (plasticity) pathway in skeletal muscles. DHPRs; dihydropyridine-sensitive L-type Ca²⁺ channels, RyR; ryanodine-sensitive Ca²⁺ channel, CLC; Ca²⁺ leak channels, ERK1/2; extracellular-regulated protein kinase 1/2, SAPK/JNK; stress activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal protein kinase, p38MAPK; p38 mitogen-activated protein kinase, Akt; protein kinase B, PKC; protein kinase C, Syk; spleen tyrosine kinase, GSK; glycogen synthesis kinase, AMPK; adenosine monophosphate kinase, HSP27; heat shock protein 27, Ref-1; redox factor-1, TRPC6; transient receptor potential channel 6, SR; sarcoplasmic reticulum, Mt; mitochondria.

그러나 이전의 연구 보고는 마우스의 근원세포 (myoblast)인 C2C12 세포와 대퇴사두근 및 가자미근 등을 이용한 연구결과로써 비복근을 대상으로 실시한 본 연구의 결과와 유사한 면도 일부 존재하나 단백질 발현의 유무 및 인산화 증감에 차이가 나타남을 알 수 있었다(Sandri 등, 2004; Machida와 Booth, 2005). 또한 PKC 역시 근육의 수축 및 세포의 증식과 분화, 유주(migration) 등과 같은 반응에 중요한 역할을 담당하는 부활효

소로써(Nishizuka, 1984; Lee 등, 2006a), 골격근의 수축기전 및 가소성에 중요한 역할을 담당하는 내용이 보고되었다(Ihle mann 등, 1999; Wyke와 Tisdale, 2006). 이러한 내용은 흰쥐의 비복근 조직을 이용한 본 연구에서 PKC 인산화(pan-PKC와 PKC α/β II)가 존재함을 확인함으로써 그 중요성을 인지할 수 있었다.

또한 골격근의 가소성 증감에 있어서 세포골격의 정렬과 재-정렬 같은 조절기전이 중요한 역할

을 하는 것으로 잘 알려져 있다(Chopard 등, 2005; Quach와 Rando, 2006). 따라서 세린/트레오닌 부활효소(*serine/threonine kinases*)에 속하면서 저분자량 GTP-결합단백질인 Rho-family의 GTPase 활성 증감을 조절하는 ROCK(Rho-associated protein kinase)와 PAK(p21-activated kinase)의 활성에 조절 받는 LIM kinase (LIMK1과 LIMK2가 존재함)의 발현과 인산화 유무를 관찰하였다(Arber 등, 1998).

동시에 저분자량 단백질인 RhoA와 Cdc42 및 저분자량 열충격단백질인 열충격단백질27(heat shock protein 27, HSP27)의 발현 유무를 관찰함으로써 골격근 세포 내에서 세포골격 변동 및 변화의 신호전달에 관여하는 기전을 살펴보았다. 특히 HSP27은 액틴단백질의 중합과 재구성을 조절하며(Lavoie 등, 1993; Rousseau 등, 1997), 근수축 기전에서 중요한 매개체 역할이 보고되어 주목을 받고 있다(Gerthoffer, 2005; Lee 등, 2007b).

이러한 애용의 중요성은 본 연구의 결과 흰쥐의 비복근 조직에 LIMK와 RhoA, cdc42 및 HSP27의 발현과 인산화가 모두 존재함을 확인함으로써 이해할 수 있었다. 또한 LIMK의 하위 단계에서 LIMK의 활성에 조절되는 액틴-결합 단백질인 cofilin의 발현과 인산화를 살펴보았다(Yang 등, 1998; Carrier 등, 1999).

이 단백질은 자극에 대해 액틴 단백질의 중합 조절에 관여하며 활성화될 경우, 액틴-필라멘트의 재생을 촉진하는 것으로 보고되어 있으며(Carrier 등, 1999; Lee 등, 2006b), 본 연구의 결과 cofilin의 발현과 인산화를 관찰함으로써 골격근 특히 비복근 조직의 가소성에 중요한 요소임을 인지할 수 있었다.

한편, 골격근의 수축반응의 기전 및 가소성에 활성산소류(reactive oxygen species, ROS; ONOO-, O²⁻, OH· 등)가 관여한다는 내용이 보고되었다(Zergeroglu 등, 2003; Smith와 Reid, 2006). 특히 이러한 ROS를 억제 및 조절의 역할과 DNA의 회복에 관여하는 37kDa의 분자량을 지닌 Ref-1이 보고되어 그 중요성이 부각되고 있다(Kelley와 Parsons, 2001; Jeon 등, 2004). 따라서 Ref-1의 발

현을 관찰한 결과 비복근 조직에 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 프로그램 되어있는 세포의 죽음(programmed cell death) 즉, 자연사(apoptosis)와 연관된 신호전달 체계는 골격근을 비롯한 평활근세포 및 신경세포 등의 항상성에 매우 중요한 역할을 담당한다(Lindstedt 등, 2004; Rege와 Hagood, 2006).

특히, 자연사-유발 자극(apoptotic stimulation)에 의해 미토콘드리아로부터 유리된 cytochrome c와 procaspase9/Apaf 1(apoptotic protease activating factor 1)은 자가 활성화 되어 procaspase9/Apaf 1이 cleaved caspase9로 되어 하위단계의 효소로 활성화되는 경로를 거쳐 자연사가 일어나게 된다(Li 등, 1997; Slee 등, 1999).

여기서 caspases는 cysteine protease의 한 무리의 군으로써 caspase-2, -8, -9, -10, -11, -12와 같은 초기에 작용하는 caspases가 분할-활성화되어 하위단계의 효과기(caspase-3, -6, -7)로 작동하여 자연사를 일으키는 경로를 거치게 된다(Shi, 2002; Degterev 등, 2003). 또한 자연사 유발의 경로 중 Bcl-2 군의 자연사-전구물질(proapoptotic member)에 해당되는 Bad 역시 자연사-신호전달에 중요한 역할을 담당한다(Yang 등, 1995; Scheid 등, 1999). 이 단백질은 Bcl-2와 Bcl-xL과 결합하여 Bax를 위치이동을 시켜줌으로써 결국 세포의 죽음을 초래하게 된다(Yang 등, 1995; Zha 등, 1996). 그러나 생존인자(survival factors)의 자극이 주어질 경우, Bad의 112번과 136번 세린 잔기가 인산화 되고 결과 14-3-3 단백질과 Bad가 결합하게 되어 Bcl-2와 Bcl-xL의 결합이 억제됨으로써 자연사가 억제 즉, 세포의 생존이 유발되는 결과를 가져온다(Zha 등, 1996; Scheid 등, 1999).

이러한 내용을 근거로 본 연구에서는 caspases의 효과기로 작용하는 cleaved caspase-3과 cytochrome c 및 Bad의 발현과 활성 유무를 측정 한 결과, 흰쥐의 비복근 조직에 cleaved caspase-3과 cytochrome c 및 Bad가 존재-활성화됨을 확인하여 중요성을 확인할 수 있었다.

비장-유래 타이로신 부활효소(Syk)는 70kDa의 분자량을 지닌 비-수용체 단백질 타이로신 부활

효소(non-receptor protein tyrosine kinases)의 하나로써 평활근 수축을 비롯한 세포유주 등에 중요한 역할을 담당하는 연구결과가 보고되어 있다 (Lee 등, 2007a, 2007b). 그러나 골격근의 수축기전 및 가소성에 대한 상관성 및 존재유무의 보고는 거의 이루어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 특히 평활근에서 나타나는 Syk의 역할을 근거로 Syk의 존재유무를 살펴본 결과 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다.

골격근을 비롯한 여러 조직의 가소성 증감에 근본이 되는 것이 세포주기의 변동이라 할 수 있다. 세포주기는 세포가 안정 상태에 존재하는 G₀기에서 DNA합성기에 해당하는 S기와 세포분열기인 M기의 순으로 이루어지며 G₀와 S기 사이의 G₁ 그리고 S기와 M기 사이의 G₂기인 공백기("gaps")가 존재하여 세포주기가 완성된다 (Donjerkovic와 Scott, 2000). 특히 G₀와 S기 사이의 DNA합성을 준비하는 시기에 해당하는 G₁기의 조절을 담당하는 cyclin D1의 존재 유무에 대해 관찰-측정하였다. Cyclin D1은 여러 성장인자에 의해 활성화되는데 그 활성화기전은 cdk(cyclin-dependent kinases) 중에서 cdk4, 6과 결합함으로써 활성화되어 pRb(retinoblastoma protein)와 E2F의 복합체를 인산화시킴으로써 전사를 활성화시키는 역할을 담당한다(Arroyo와 Raychaudhuri, 1992; Mudrak 등, 1994). 따라서 본 연구에서는 cyclin D1의 존재 유무에 대한 측정을 실시하였으며, 결과 흰쥐의 비복근 조직에서 발현됨을 관찰할 수 있었다. 또한 골격근을 비롯한 세포의 항상성을 유지하기 위해 반드시 필요한 것이 아데노신삼인산(adenosine 5'-triphosphate; ATP)이다. 이러한 세포활성 에너지를 생산 및 분해과정에 부분적으로 관여하는 것이 AMPK와 GSK이다. 특히 AMPK와 GSK가 골격근조직의 가소성에 연관이 있다는 연구결과가 보고되어 주목을 받고 있다(Atherton 등, 2005). 따라서 흰쥐 비복근 조직의 단백질에 AMPK와 GSK가 존재하는지 측정하였으며, 결과 안정상태의 비복근조직에서 발현됨을 확인할 수 있었다.

한편, TRPC6는 TRPCs subgroup(TRPC1, -2, -3,

-4, -5, -6, -7)의 하나로써 전압-비의존성 Ca²⁺ 통로(non-voltage-gated Ca²⁺ channel)에 속하는 고전적 개념에서 벗어나는 Ca²⁺ 통로이다. 즉, 이 통로는 수용체-작동성 Ca²⁺ 통로(receptor-operated Ca²⁺ channel; ROCC) 혹은 저장고-작동성 Ca²⁺ 통로(store-operated Ca²⁺ channel; SOCC)를 통해 유발되는 Ca²⁺ 유입에 중요한 역할을 담당하며 평활근 수축기전을 이해하는데 필수적이다(Bae 등, 2007a, 2007b). 그러나 골격근 조직에 대한 연구는 상당수 이루어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 TRPC6의 존재 유무에 대한 측정을 실시한 결과 비복근 조직에 발현됨을 확인할 수 있었다.

이러한 본 연구결과를 통해 여러 신호기전의 매개체로 작용하는 부활효소를 비롯한 단백질이 비복근에 존재함을 이해 및 확인할 수 있었다. 그러나 본 연구의 결과는 흰쥐의 비복근이라는 한정된 제한요소의 한계를 가지고 있는 이유보다 체계적이고 심도 있는 연구가 필요하다고 사료된다. 더 나아가 이와 연관된 질환모델(당뇨 유발 및 근위축 모델동물 등)의 작성과 전문물리치료의 영역의 여러 자극을 적용함으로써 나타나는 생리-병리적 반응을 연구하여 근골격계 전문물리치료영역의 개발 및 임상적용의 성공적 연결과정이 무엇보다 중요하다고 사료된다(Figure. 6).

V. 결론

이상의 내용으로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 골격근의 단백질 분리 결과 상층액과 침전물에서 형태와 정도에 차이가 있었다. 그러나 주령별 비교에서는 별다른 차이가 나타나지 않음을 관찰하였다.
2. 골격근과 다른 조직의 단백질 분리결과 조직 특이성으로 형태와 정도에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.
3. 골격근의 수축기전 및 가소성에 관여할 수 있는 신호전달-관련 물질로서 유사분열-활성단

백질 부활효소(MAPK)와 Akt, PKC, LIMK, GSK, Syk, AMPK와 같은 부활효소와 저분자량 GTP-결합 단백질, 세포골격 관련 액틴-결합 단백질, 자연사-신호전달관련 효소, 활성산소류(ROS)-연관 물질, 이 비복근 조직에 존재함을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- 김중환, 민경옥, 최영덕 등. 골격근과 심근에서 수축 반응에 관여하는 세포 내 Ca^{2+} 이동 및 그 연관 단백질에 대한 연구 - 근골격전문물리치료 연구를 위한 기초물리치료학적 접근. 대한물리치료사학회지, 2005;12(2):57-70.
- 이윤호, 이창권, 김보경. 골격근, 심근, 평활근의 기능연구를 위한 비교. 건국의과학학술지, 2006;16(1):29-37.
- 山本啓一과 丸山工作. 筋肉, 化學同人, 1986.
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H et al. Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, and Caroni P. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. Nature. 1998;393(6687):805-9.
- Arroyo M, Raychaudhuri P. Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. Nucleic Acids Res. 1992; 20(22):5947-54.
- Atherton PJ, Babraj J, Smith K et al. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. FASEB J. 2005;19(7):786-8.
- Bae YM, Kim A, Lee YJ et al. Enhancement of receptor-operated cation current and TRPC6 expression in arterial smooth muscle cells of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. J Hypertens. 2007a;25(4):809-17.
- Bae YM, Sung DJ, Noh HJ, et al. Serotonin-induced ion channel modulations in mesenteric artery myocytes from normotensive and DOCA-salt hypertensive rats. J Smooth Muscle Res. 2007b; 43(3):85-97.
- Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. Physiol Rev. 2000;80(3):1215-65.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-54.
- Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. J Biol Chem. 1999;274(48):33827-30.
- Chin ER. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. J Appl Physiol. 2005;99(2):414-23.
- Chopard A, Arrighi N, Carnino A, et al. Changes in dysferlin, proteins from dystrophin glycoprotein complex, costameres, and cytoskeleton in human soleus and vastus lateralis muscles after a long-term bedrest with or without exercise. FASEB J. 2005;19(12):1722-4.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. Oncogene. 2003;22(53):8543-67.
- Donjerkovic D, Scott DW. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. Cell Res. 2000;10(1):1-16.
- Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2003;146:159-216.
- Gerthoffer WT. Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscles. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;288(5):G849-53.
- Gordon AM, Regnier M, Homsher E. Skeletal and cardiac muscle contractile activation:

- tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci.* 2001;16:49-55.
- Hilder TL, Tou JC, Grindeland RE et al. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.* 2003; 553(1-2):63-7.
- Ihleman J, Galbo H, Ploug T. Calphostin C is an inhibitor of contraction, but not insulin-stimulated glucose transport, in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1999;167(1):69-75.
- Jeon BH, Gupta G, Park YC et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone. *Circ. Res.* 2004;95(9):902-10.
- Jørgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol.* 2006;574(Pt 1):17-31.
- Karaki H, Ozaki H, Hori M et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 1997;49(2): 157-230.
- Kelley MR, Parsons SH. Redox regulation of the DNA repair function of the human AP endonuclease Ape1/ref-1. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3(4): 671-83.
- Kim BK, Mitsui M, Karaki H. The long-term inhibitory effect of a Ca²⁺ channel blocker, nisoldipine, on cytosolic Ca²⁺ and contraction in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1992;223(2-3):157-62.
- Kim J, Lee CK, Park HJ et al. Epidermal growth factor induces vasoconstriction through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 2006;101(2):135-43.
- Kim J, Lee YR, Lee CH et al. Mitogen-activated protein kinase contributes to elevated basal tone in aortic smooth muscle from hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2005;514(2-3):209-15.
- Koulmann N, Bigard AX. Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflugers Arch.* 2006;452(2):125-39.
- Lavoie JN, Hickey E, Weber LA et al. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24210-4.
- Lee CK, Kim J, Won KJ et al. Phorbol ester-induced contraction through p38 mitogen-activated protein kinase is diminished in aortas from DOCA-salt hypertensive rats. *Arch Pharm Res.* 2006a;29(11):1024-31.
- Lee CK, Park HJ, So HH et al. Proteomic profiling and identification of cofilin responding to oxidative stress in vascular smooth muscle. *Proteomics.* 2006b;6(24):6455-75.
- Lee CK, Lee HM, Kim HJ et al. Syk contributes to PDGF-BB-mediated migration of rat aortic smooth muscle cells via MAPK pathways. *Cardiovasc Res.* 2007a;74(1):159-68.
- Lee HM, Won KJ, Kim J et al. Endothelin-1 induces contraction via a Syk-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Sci.* 2007b;103(4): 427-33.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-89.
- Lindstedt KA, Leskinen MJ, Kovanen PT. Proteolysis of the pericellular matrix: a novel element determining cell survival and death in the pathogenesis of plaque erosion and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8): 1350-8.
- Machida S, Booth FW. Changes in signalling molecule levels in 10-day hindlimb immobilized rat muscles. *Acta Physiol. Scand.* 2005;183(2): 171-9.
- Malloy JM, Rieker JP, Rizzo CF. Quantitation of proteins on Coomassie blue-stained polyacrylamide gels based on spectrophotometric

- determination of electroeluted dye. *Anal. Biochem.* 1984;141(2):503-9.
- Mudrak I, Ogris E, Rotheneder H et al. Coordinated trans activation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 1994;14(3):1886-92.
- Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 1984;308(5961):693-8.
- Quach NL, Rando TA. Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. *Dev Biol.* 2006;293(1):38-52.
- Rege TA, Hagood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J.* 2006;20(8):1045-54.
- Rousseau S, Houle F, Landry J et al. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene.* 1997;15(18):2169-77.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117(3):399-412.
- Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem.* 1999;274(43):31108-13.
- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9(3):459-70.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999;144(2):281-92.
- Smith MA, Reid MB. Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006;151(2-3):229-41.
- Vermaelen M, Marini JF, Chopard A et al. Ubiquitin targeting of rat muscle proteins during short periods of unloading. *Acta Physiol Scand.* 2005;185(1):33-40.
- Wyke SM, Tisdale MJ. Induction of protein degradation in skeletal muscle by a phorbol ester involves upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Life Sci.* 2006;78(25):2898-910.
- Yang E, Zha J, Jockel J et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 1995;80(2):285-91.
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K et al. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* 1998;393(6687):809-12.
- Zergeroglu MA, McKenzie MJ, Shanely RA et al. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. *J Appl Physiol.* 2003;95(3):1116-24.
- Zha J, Harada H, Yang E et al. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell.* 1996;87(4):619-28.