

근조직 및 배양 근세포에서의

CTRP1발현과 그 의의

연세대학교 대학원

의과학과

소신화

근조직 및 배양 근세포에서의

CTRP1 발현과 그 의의

지도 최영철 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2010년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

소신화

소선회의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2010년 6월

감사의 글

먼저 본 논문을 완성하기 까지 모든 과정에서 세심한 배려로 지도해주시고 많은 조언과 격려를 해주신 최영철 교수님께 감사를 드립니다. 본 논문을 직접 심사해 주시고 많은 조언을 주신 양 영 교수님과 김현우 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

그 동안 많은 시행 착오를 겪을 때마다 많은 도움을 주신 신경과 백아미 선생님과 임상의학연구센터 연구원 여러분들에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 지금까지 저를 키워주시고 중요한 인생의 길목에서 고민 할 때면 항상 사랑과 격려로 이끌어 주시는 부모님께 사랑과 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례

국문요약.....	1
I. 서론.....	2
II. 재료 및 방법.....	5
1. 일차배양.....	5
2. 세포배양.....	5
가. 면역세포화학염색.....	5
나. 웨스턴 블롯.....	6
3. 면역조직화학염색법.....	6
가. 조직동결.....	6
나. 면역조직화학염색.....	6
4. RNA추출과 역전사 중합효소연쇄반응.....	7
III. 결과.....	8
1. 근세포에서의 CTRP1의 발현.....	8
2. 정상인 근조직과 근병증 환자 근조직에서의 CTRP1 발현비교.....	10
3. 정상인 근조직과 두시엔느형근이영양증에서의 CTRP1 mRNA발현비교.....	11
IV. 고찰.....	13
V. 결론.....	15
참고 문헌.....	16
영문 요약.....	19

그림 차례

그림 1. 면역조직화학 염색 상 근세포의 CTRP1 발현.....	8
그림 2. 웨스턴 블롯에 의한 근세포의 CTRP1 발현 비교.....	9
그림 3. 정상근과 근병증환자의 근조직에서 CTRP1 발현 비교.....	10
그림 4. 정상근과 근병증환자의 근조직에서 CTRP1 발현 비교.....	11
그림 5. 정상근조직과 두시엔느형 근이영양증에서의 CTRP1 mRNA 발현비교.....	12

근조직 및 배양 근세포에서의 CTRP1발현과 그 의의

Adipokines의 family 중 하나인 C1q/tumor necrosis factor- α -related proteins(CTRPs)는 다양한 종류의 조직에 존재하며, 주로 간이나 근육조직에 작용하여 포도당과 지질대사 등의 조절을 한다. 최근 연구에 의하면 CTRP superfamily의 하나인 Complement-C1q TNF-related protein 1(CTRP1)은 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cell)에서 발현되고, 혈소판 응집을 유도하는 collagen에 있는 von Willebrand factor(VWF)를 억제하여 생체 내에 혈소판 혈전증을 예방해준다고 보고 되어있다. 또한 CTRP1은 지방전구세포(preadipocyte)와 면역조절인자인 tumor necrosis factor- α 와 interleukin- 1β 를 처리한 쥐의 지방세포에서 CTRP1이 높게 발현된다고 밝혀졌으며, 지방조직에서 분비되는 호르몬인 adiponectin의 한 종류이고 골격근 발달, 혈소판 응집에도 연관이 있다고 한다. 그러나 CTRP1의 이해는 현재 초기단계이고 근육조직에서 CTRP1의 역할은 밝혀지지 않았다. 근육은 재생이 가능하며, 근육 발생 과정은 근육 손상 후 일어나는 재생 과정과 유사하다. 이에 본 연구에서는 정상인의 근조직에서 얻은 근육모세포(myoblast)와 근관세포(myotube)에서의 CTRP1의 발현 정도를 면역세포화학 염색법과 웨스턴 블롯(western blot)으로 비교하여 발현양상을 확인해보고, 또한 정상인과 두시엔느형 근이영양증 및 염증성 근육병인 다발성근육병과 피부근염근육병의 환자의 근조직을 면역조직화학염색하여 CTRP1의 발현과 증감을 알아보고 그 의의를 알아보려고 하였다. 그 결과 배양한 근육모세포보다 분화된 상태의 근관세포에서 세포막과 세포질에서의 CTRP1의 발현양이 증가하였고, 이를 웨스턴 블롯한 결과 근육모세포보다 근관세포에서 CTRP1의 단백발현이 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 정상인과 두시엔느형 근이영양증, 피부근염, 다발성근염환자의 근조직을 CTRP1으로 면역조직화학염색 한 결과 피부근염, 다발성근염환자, 정상근조직보다 두시엔느형 근이영양증에서 세포의 피사 및 재생 근섬유에 CTRP1의 발현양이 증가 되는 것을 확인 할 수 있었다. 웨스턴 블롯하여 CTRP1의 질환별 증감을 확인해 본 결과 두시엔느형 근이영양증에서 정상근조직보다 CTRP1의 단백 발현양이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 골격근의 발생 과정에서뿐만 아니라 재생에서도 CTRP1이 중요한 역할을 한다는 것을 지지해 준다.

핵심 되는 말 : CTRP1, 두시엔느형 근이영양증, 근모세포, 근관세포, 재생, 퇴화

근조직 및 배양 근세포에서의 CTRP1의 발현과 그 의의

<지도교수 최영철>

연세대학교 대학원 의과학과

소 선 화

I. 서 론

지방조직은 tumor necrosis factor- α (TNF- α)^{1,2}, resistin^{3,4}, adiponectin^{5,6,7,8,9,10}, leptin^{11,12,13,14}, monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), adipsin, plasminogen-activator inhibitor-1(PAI-1), interleukin-1 β , interleukin-6를 포함한 다양한 단백질의 분비 활성 내분비 기관이며^{15,16}, 이렇듯 지방세포에서 분비하는 단백질을 adipokines라고 정의한다.¹⁷ 이러한 adipokines은 여러 가지 면역 세포의 면역조절작용에 크게 영향을 주고 면역계에 존재하는 leptin, adiponectin, resistin이 만들어지는데 중요한 역할을 한다. 또한, 대사과정에서 간, 근육 그리고 지방조직에서 직접적 또는 간접적으로 염증 반응을 조절하는 인슐린 감도에 영향을 일으켜 몸 전체의 포도당 및 지질 대사를 조절하는데 중요한 작용을 한다.¹⁵

최근 연구에 의하면 244개의 아미노산으로 이루어진 adiponectin에는 C1q/tumor necrosis factor- α -related proteins(CTRPs)이 작용 한다고 한다.¹⁸ adiponectin은 signal peptide가 있는 N-terminal, collagen-like motif, 그리고 C1q와 비슷한 globular C-terminal 세 부분으로 이루어져 있으며 globular domain의 3차원 구조는 TNF- α 와 매우 유사하다.¹⁹ 따라서 C1q domain (~135아미노산)의 모든 단백질은 C1q/TNF 단백질군으로 분류된다.²⁰ 자연면역에서 발생하는 tumor necrosis factor superfamily(TNFs)가 여러 가지 염증반응, 획득면역, 아포토시스(apoptosis), 생체 항상성 등을 조절한다고 한다. TNF와 C1q protein은 서로 비슷한 구조를 갖는다.

하나의 엑손(exon)과 인트론(intron)에서 각각 암호화된 TNFs와 gC1q protein이 각각의 아미노산배열 stalk지역을 제한한다. 이러한 사실로 두 그룹의 구조적 연관성은 생체 항상성, 면역반응 등과 같은 비슷한 작용을 한다.¹⁹ 이러한 작용을 하는 adiponectin에 있는 CTRPs에는 CTRP1~7이 보고되어 있다. 지방세포에 있는 adiponectin과 달리 CTRPs은 다양한 종류의 조직에 존재하는데 주로 간이나 근육조직에 작용하여 포도당이나 지질대사조절을 한다. CTRP2는 adiponectin과 비슷하게 근육세포에서 AMP-activated protein kinase(AMPK)를 활성화하여 글리코겐의 축적을 증가시키고 지방산 산화를 향상시킨다.¹⁹ collagenous repeat-containing sequence of the 26-keaprotein(cors26/cartducin)이라고 알려진 CTRP3는 다른 조직들 중 골수세포에 의해 나타나고 Akt(protein kinase B, 세포의 생존·증식·대사를 조절하는 중요한 효소)의 신호 경로를 활성화시켜 연골세포를 만드는데 작용한다.²¹ CTRP5는 망막색소표피세포에 있고 유전자 돌연변이가 후발성 망막 황반 변성을 일으킨다.²² CTRP6는 아프리카 돼지열 바이러스(African Swine Fever Virus)의 연구에서 사용되는데 아프리카 돼지열 바이러스 활동을 제한하는 숙주의 유전자를 발견하기 위해서는 HeLa와 HT144셀에 있는 아프리카 돼지열 바이러스를 복제하는 과정이 필요한데 이때, CTRP6가 아프리카 돼지열 바이러스 복제를 수월하게 해준다. 그러나 아직까지 CTRP6의 아프리카 돼지열 바이러스의 기전은 알려지지 않았다.²³

CTRPs에서 분비되는 모든 단백질의 타겟셀(target cell)과 기능은 현재도 연구가 진행되고 있다. 모든 CTRPs는 구조적 기본단위로 삼량 체형(trimeric form)을 형성하고 일부는 더 나아가 N-terminal cystein residues을 포함한 oligomeric복합체를 형성한다. 최근 연구에 의하면 CTRP1은 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cell)에서 발현되고, 혈소판 응집을 유도하는 콜라겐(collagen)에 있는 von Willebrand factor(VWF)를 억제하여 생체 내에 혈소판 혈전증을 예방 해준다.²⁵ CTRP1은 단량체(monomers), 이형체(dimers), 삼량체(trimers) 및 복합체(multimeric)와 같은 신호 펩티드 분비 단백질을 나타낸다. 또한 CTRP1은 지방전구세포(pre-adipocyte)에 나타나고 LPS(proinflammatory cytokine)자극을 준 쥐의 지방세포에서 과조절되고 비만 쥐의 모델에서 염증반응을 조절한다. 이러한 LPS효과는 면역조절인자인 TNF- α 와 IL- β 에 의해서 중재되고 이것은 지방세포에서 CTRP1을 유도한다. 따라서 CTRP1은 LPS반응, 지방세포에서 분비되는 Cytokine반응 등을 하여 염증, 다양한 조직, 혈소판응집과 관련이 있다. 더욱이 기능적으로 밝혀진 것 중 하나는 재조합된 CTRP1이 쥐의 근육세포주인 C2C12 근관세포(myotube)에서 Akt(protein kinase B)와 p44/42MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 시그널 경로를 활성화시키는 것으로서 Akt의 활성화는 원형질막에 GLUT-4(포도당 운반기 4)의 상승된 트래픽 때문에 근육에서 포도당흡수가 향상되어지는 것으로 관찰 되었다.²⁴ 이러한 결과는 조직에서 CTRP1이 대사효과작용에 기여할 수 있다는 것을 지지해준다. 또한 재조합된 CTRP1을 쥐에 주입했을 때 대조군에 비해서 혈청 포도당 레

벨이 내려가는 작용을 한다.²⁴ 그러므로 CTRP1은 새로운 adipokines이라고 할 수 있다. 그러나 CTRP1이 간, 근육 또는 다른 기관에서 어떠한 작용을 하여 영향을 미치는지는 좀 더 연구 할 필요성이 있다.

근이영양증(muscular dystrophy)이란 근육질환 중 근세포의 괴사 및 재생을 특징으로 하는 퇴행성 근육병증으로 임상적으로 진행성 근력저하를 보인다. 현재까지 많은 원인 유전자가 발견 되었고, 근막에 존재하는 단백질 소실에 의해서만 오는 것 뿐 아니라 핵에 존재하는 단백질, 세포내의 효소, 성장인자의 발현과 상호작용 등의 이상에 의해서도 발생할 수 있으며, 근육 세포로 분화되는 과정에서도 발생학적으로 여러 단계에 걸쳐 다양한 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있으나 모든 과정이 명확하게 밝혀지지 않는 것이다. 근발생 및 근섬유재생에서 근육생성조절인자(myogenic regulator factors ; MRFs)가 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었으며 이 중 일차 근육생성조절인자로 분류되는 MyoD와 Myf-5는 증식된 체세포를 근육모세포로 유도하는 역할을 하며 이차 근육생성조절인자인 Myogenin과 Myf-6는 근육모세포를 근관세포로 분화 시키는 역할을 한다. 또한, 각각의 단계에 여러 성장인자(growth factor)들이 상호작용을 하는 것으로 밝혀지고 있다.^{27,28,29,30,31,32}

근육은 재생이 가능하며, 근육 발생 과정은 근육 손상 후 일어나는 재생 과정과 유사하다.^{33,34} 따라서 본 연구자는 배양 근모세포의 발생에 따른 CTRP1 발현 변화를 확인해보고, 정상근조직과 근병증 환자의 근조직에서 발현을 비교 분석하여 근조직의 퇴화와 재생에 따른 분포, 증감 등의 관계를 확인하여 그 의의를 알아보려 한다. 이러한 정보는 임상에서 의미 있는 자료로 활용될 뿐만 아니라 치료에도 응용 될 수 있다.

II. 재료 및 방법

1. 일차배양(Primary culture)

정상인의 근조직 1-2g을 phosphate buffer pH7.2(Gibco BRL, Rockville, MD, USA)로 씻어낸 후 가위와 칼을 이용해 잘게 다진다. 이 조직을 20ml 분해용액[조성 : 2ml 0.05% trypsin-0.53mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA; Gibco BRL), 4ml 0.2% collagenase type IV(Gibco BRL.), 14ml 1X phosphate buffer(no Cl, Mg, pH7.2)]에 담고 37°C, 5% CO² 에서 1시간 처리하여 세포를 분리하였다. 이차 분해 작용을 위해 10ml 0.05%trypsin-0.53mM EDTA을 첨가하고 37°C, 5% CO² 에서 30분간 처리한 후 high Dulbecco's modified eagle medium(DMEM; Gibco BRL)에 20% fetal bovine serum(Gibco BRL)과 penicillin-streptomycin solution(Gibco BRL)을 처리한 배양액 10ml를 첨가하여 trypsin을 중화시킨다. 40µm 세포 여과기 (Falcon Co, BD Biosciences, San Diego, CA, USA)로 걸러내 세포를 얻어내고 20% FBS high DMEM(Gibco BRL)10ml을 첨가하여 1100rpm에서 10분간 원심분리 하여 세포를 침전시킨다. 침전된 세포에 20% FBS-DMEM 세포배양액에 풀어서 75cm² culture flask(NUNC, Roskilde, Denmark)에 1X10⁵세포수로 배양하였다. 배양은 37°C, 5% CO² 배양기에서 유지하고 분화되지 않는 상태를 유지하기 위해서는 세포가 차지하는 비율(confluence)이 75%이상 이 되기 전에 0.05% trypsin-0.53mM EDTA로 세포를 배양접시에서 분리시키고 원심분리 하여 계대배양을 시행하였다. 이후 배양액은 3일마다 교체하였다.

2. 세포배양(Cell culture)

정상인의 근조직에서 일차배양하여 얻은 근육모세포의 상태를 37°C, 5% CO² 배양기에서 high glucose Dulbecco's modified eagle medium(high DMEM)에 20% fetal bovine serum(Gibco BRL)과 penicillin-streptomycin solution(Gibco BRL)을 처리한 배지에서 유지할 수 있다. 근육모세포에서 근관세포로 분화를 이끌어내기 위해서는 high DMEM(Gibco BRL)에 2% FBS(Gibco BRL)으로 배양액을 교체해준다.

(가) 면역세포화학염색(Immuocytochemistry)

근육모세포와 근관세포를 chamber slide(NUNC)에 24시간 키운다. 세포 배양한 슬라이드를 차가운 methanol(Junsei Chemical Co, Tokyo, Japan)과 acetone(Junsei Chemical Co, Tokyo, Japan)을 1:1로 희석한 용액에 고정시킨 후, 2% bovine serum albumin(BSA ; Sigma-Aldrich, Strinheim, Germany)용액으로 30분 동안 blocking시킨다. 1:100으로 희석한 rabbit anti-CTRP1 polyclonal antibody(Kim, K.Y. et al. 2006)²⁶을 4°C에서 24시간 동안 반응 시킨다. 반응 후 TBS용액(1M Tris, 5M NaCl,

pH7.5)으로 5분마다 5번 세척(washing)하고 1:100으로 희석한 biotin conjugated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 실온에서 30분간 반응 시킨다. 다시 TBS용액으로 5분마다 5번 세척하고 1:100으로 희석한 avidin conjugated fluoresein isothiocyanate(Vector Lab)을 30분간 실온에서 붙인 후 다시 TBS용액으로 5분마다 5번 세척한다. fluoresein isothiocyanate(FITC)의 경우 세척을 충분히 해줘야 한다. 세척한 후 FITC mounting medium(Vector Lab)으로 슬라이드에 봉합하여 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰한다.

(나) 웨스턴 블롯(Western blot)

배양한 근세포를 protein inhibitor cocktail(roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)를 첨가한 lysis buffer reagent(Cell Signaling, Danvers, MA, USA)200 μ l에 용해한 후 30분 동안 5분마다 vortexing한 후 4°C 13,000rpm으로 30분간 원심분리한다. 상층액을 분리하여 -70°C에 보관한다. Micro Protein Assay Kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 이용하여 BCA 방법으로 단백질의 농도를 정량 한다. 동량의 단백질을 Bio-rad Mini-PROTEAN II Cell(Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A)을 이용하여 acryl-amide gel(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 전기영동하고 polyvinylidene fluoride(PVDF ; Millipore, Bedford, MA, U.S.A)membrane으로 이동시킨다. 이동된 membrane을 TBS(50mM Tris-HCL, 150mM NaCl, pH7.5)용액에다가 5% skim milk(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 만들어 1시간 blocking시킨다. rabbit anti-CTRP1 polyclonal antibody(Abcam, Cambridge, UK) 또는 actin antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 4°C overnight시킨다. 반응 후 TBST(50mM Tris-HCL, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, pH7.5)용액으로 10분마다 5번 세척하고 horse-radish peroxidase가 붙은 anti-rabbit IgG secondary antibody(Cell Signaling)을 실온에서 3시간을 반응시킨다. 반응 후 TBST용액으로 10분마다 5번 세척하고 발색반응은 enhanced chemi- luminescence 시약(ECL ; Amersham, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 X-ray필름에 감광시켜 배양근모세포 분화에 따른 단백질을 측정하고 비교하여 보았다.

3. 면역조직화학염색법(Immunohistochemical Staining)

(가) 조직 동결(Muscle frozen)

정상인과 근육병(두시엔느형 근이영양증, 피부근염, 다발성근염)을 가진 환자의 근조직을 조직동결시킨다. 질소 용액이 담긴 용기에 isopentane(Junsei Chemical Co, Tokyo, Japan)을 반쯤 채운 비커(beaker)에 중탕 시키고, isopentane이 점성이 생기는 정도로 온도가 낮아지면, 준비된 근조직 생검을 약 7초간 담 균 후 -20°C

냉동고에서 30분간 보관 한 후 -70°C 냉동고로 옮겨 보관한다.

(나) 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

정상인과 근육병(두시엔느형 근이영양증, 피부근염, 다발성근염)을 동결건조 시킨 검체를 7 μ m두께로 동결 박절하고 차가운 acetone(Junsei Chemical Co)에 고정시킨다. 2% bovine serum albumin(BSA ; Sigma aldrich Co)용액으로 30분동안 blocking 시킨다. CTRP1 antibody(hCTRP1)²⁶를 4°C에서 24시간 동안 반응 시킨다. 반응 후 TBS(1M Tris, 5M NaCl, pH7.5)용액으로 7분마다 3번 세척하고 biotin conjugated anti-rabbit IgG(Vector Lab)를 실온에서 30분간 반응 시킨다. 다시 TBS용액으로 7분마다 3번 세척 한 후 avidin conjugated FITC(Vector Lab)를 30분간 실온에서 반응시킨다. 반응 후 TBS용액으로 7분마다 3번 세척 한 후 FITC mounting medium(Vector Lab)으로 슬라이드에 봉합하여 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰한다.

4. RNA추출과 역전사 중합효소연쇄반응(RNA extraction and Reverse transcriptase- polymerase chain reation)

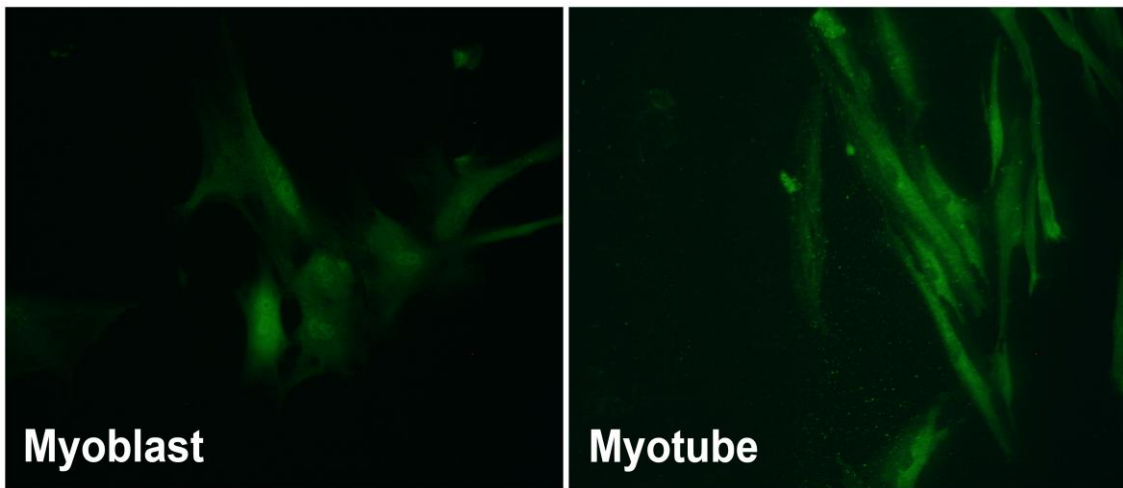
정상인과 근병증 환자 근조직에서 CTRP1의 mRNA의 발현 양을 측정하기 위해서 RT PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)시행해보았다. 먼저 조직을 20 μ m씩 10장을 cutting한 검체를 Trizol(Invitrogen)을 사용하여 동질분해(homogenization)시킨다. RNA를 260nm spectrophotometry(Nanodrop 2000, Thermo scientific, Rockford, IL, USA)에서 정량 값을 확인한다.

cDNA는 oligo(dT)primer, AMV-RT, reaction buffer(reverse transcription system, Promega, Madison, WI, USA)사용한 후 CTRP1의 primer을 사용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 시행한다. 94°C에서 5분간 진행한 뒤 94°C에서 1분간, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 반응시킨 것을 1cycle로 기준으로 하여 총 35cycle을 증폭(amplification)시킨 후 72°C 에서 10분간 반응 하였다. CTRP1의 Forward primer는 5'-CTTCTCTGGCAACCCACTTC-3'이고 Reverse primer는 5'-ACTGTGTTGCCATTGTGCAT-3'으로 479bp이다. 증폭된 cDNA를 ethidium bromide를 첨가하여 1.5% agarose gel(Invitrogen)에서 전기영동하여 band를 Image anysis system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 비교분석하였다.

III. 결 과

1. 근세포에서의 CTRP1의 발현

정상인의 근조직에서 일차배양하여 얻은 근육모세포와 근관세포의 CTRP1의 발현 정도를 면역세포화학염색법을 시행하여 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 확인 한 결과 근육모세포에서 근관세포로의 분화 시 세포막과 세포질에서의 CTRP1의 단백 발현이 증가한 것을 관찰 할 수 있었다(그림1).



근육모세포

근관세포

그림1. 면역조직화학 염색 상 근세포의 CTRP1 발현(X200)

정상근조직에서 얻은 근육모세포와 High DMEM(Gibco BRL)에 2% FBS(Gibco BRL)으로 배양액을 교체하여 일주일이상 분화 반응을 유도한 근관세포를 각각의 슬라이드 챔버(Nunc)에 배양한 후 면역세포형광염색하였다.

세포 배양 시의 세포 수 증가 등으로 인한 오차를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 이용해 정량적으로 단백 발현을 확인해 보았다. 일정한 양을 보이는 actin의 사진(그림2)와 비교하여 보면, 근육모세포에서는 CTRP1의 단백발현이 적어 거의 밴드를 확인할 수 없었고 근관세포에서는 CTRP1의 단백발현 된 양의 증가로 진한 밴드를 볼 수 있었다(그림2).

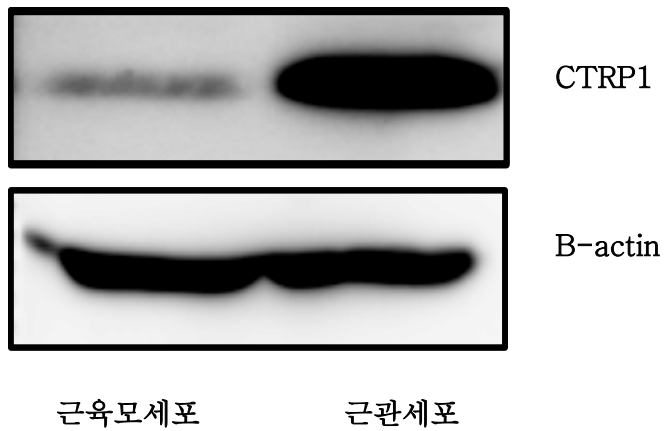


그림2. 웨스턴 블롯에 의한 근세포의 CTRP1발현 비교

정상근조직에서 얻은 근육모세포와 근관세포의 단백질을 정량 추출하여 웨스턴 블롯하여 보았다. 근육모세포와 비교하여보면 근관세포에서의 CTRP1의 단백발현양이 증가 된 것을 관찰 할 수 있다.

근육모세포에서도 세포질(cytoplasm)에서의 CTRP1의 발현이 있었지만, 다핵화된근관세포에서의 새롭게 생성된 세포질에서의 CTRP1이 발현이 증가된 것을 관찰 할 수 있었다.

2. 정상인 근조직과 환자군 근조직의 CTRP1발현비교

CTRP1이 근세포의 분화되는 과정에 따른 CTRP1 발현정도를 확인해보고, 이를 토대로 정상인과 환자군의 근조직에서 CTRP1의 발현과 증감을 면역조직화학염색염색법과 웨스턴 블롯을 시행하였다. 정상인과 두시엔느형 근디스트로피(Duchenne muscular dystrophy ; DMD) 및 염증성 근육병인 다발성근육병(Polymyositis ; PM)과 피부근염근육병(Dermatomyositis ; DM)의 환자의 근조직을 염색한 결과를 보면 정상근과 염증성 근육병인 다발성근육병과 피부근염근육병에서는 세포막과 근섬유(muscle fiber)주변에 있는 핵에 CTRP1이 발현되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이런 정상근과 염증성 근육병의 CTRP1의 발현에 비해 두시엔느형 근이영양증에서는 세포의 괴사 및 재생이 진행되는 근섬유조직에 CTRP1의 발현이 증가 된 것을 관찰 할 수 있었다(그림3).

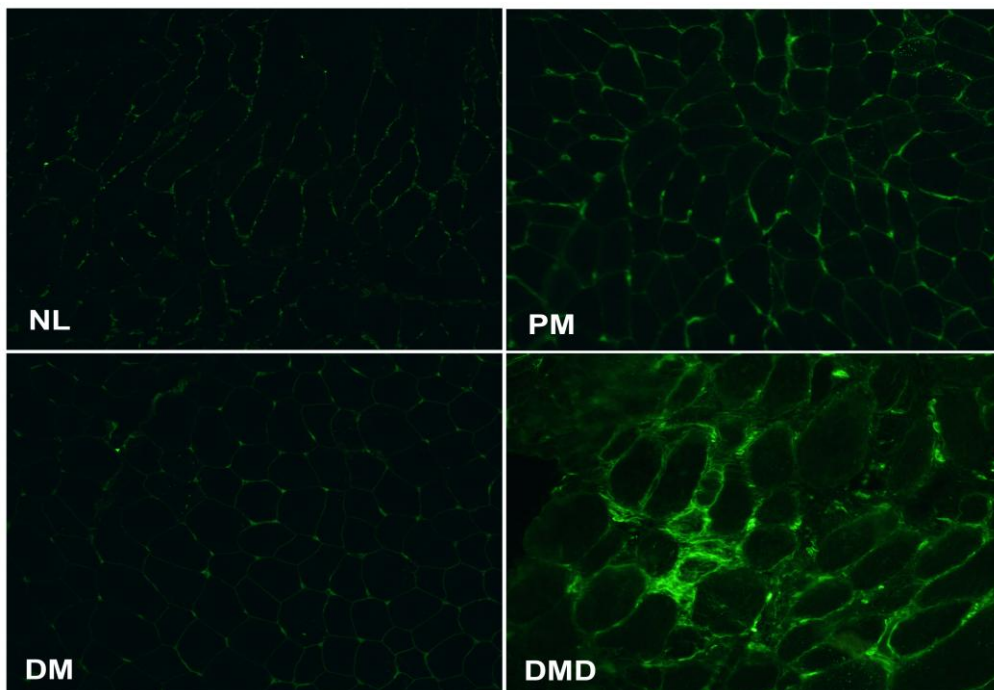


그림3. 정상근과 근병증 환자 근조직에서의 CTRP1발현비교(X200)

정상근조직(Normal ; NL)과 염증성 근육병인 다발성근육병(Polymyositis ; PM)과 피부근염근육병(Dermatomyositis ; DM)보다 근디스트로피 근육병인 두시엔느형 근이영양증(DMD)에서 CTRP1의 발현이 증가 된 모습을 관찰 할 수 있었다.

근육조직에서 CTRP1이 어느 정도 발현되는지 확인하기 위해 웨스턴블롯을 이용하여 정량적으로 단백질 발현을 확인해보았다. 일정한 양을 보이는 actin사진(그림4)과 비교하여보면 CTRP1의 단백질 발현은 근육병마다 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 정상근조직과 염증성 근육병인 다발성 근육병(PM)과 피부근염병(DM)보다 두시엔느형 근이영양증(DMD)에서의 CTRP1의 단백질 발현양이 증가한 것을 확인할 수 있었다(그림4).

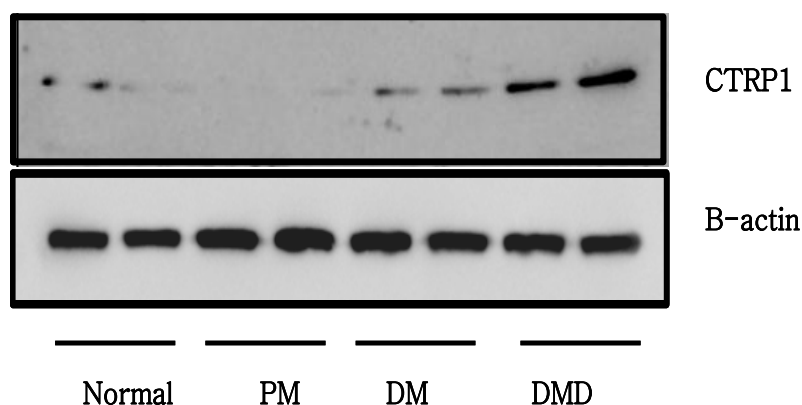


그림4. 정상근과 근병증 환자 근조직에서의 CTRP1발현비교

정상근조직(Normal ; NL)과 염증성 근육병인 다발성근육병(Polymyositis ; PM)과 피부근염 근육병(Dermatomyositis ; DM)보다 근디스트로피 근육병인 두시엔느형 근이영양증(DMD)에서 CTRP1의 단백질 발현이 증가한 것을 알 수 있다.

3. 정상근조직과 두시엔느형 근이영양증에서의 CTRP1 mRNA 발현비교

두시엔느형 근이영양증에서의 CTRP1 mRNA 발현양상을 비교하기 위하여, 정상인 근조직을 대조군으로 사용하여 CTRP1 mRNA 단백질의 발현 분포와 증감을 확인해보았다. 실험방법은 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하여 정량적인 확인을 하였다. 정상인 근조직에서 mRNA 발현양보다 두시엔느형 근이영양증에서의 mRNA의 발현 양이 증가한 것을 확인해 볼 수 있었다(그림5).

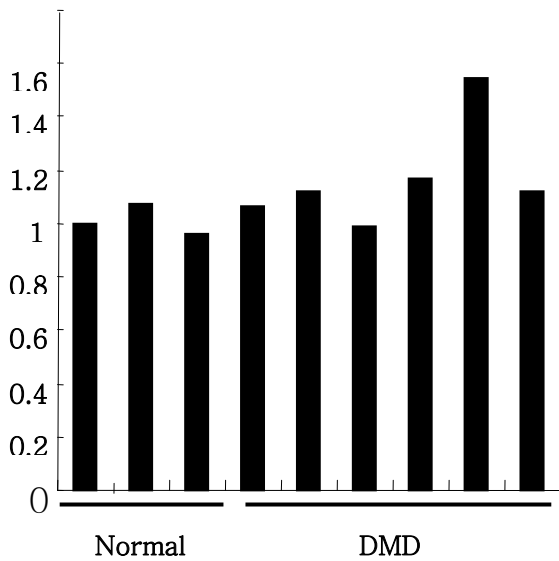
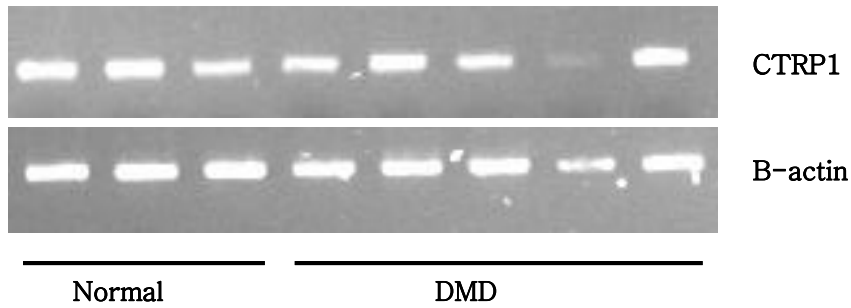


그림5. 정상근조직과 두시엔느형 근이영양증(DMD)에서의 CTRP1 mRNA발현비교

농도는 CTRP1을 actin으로 보정하고 정상 대조군으로 사용한 정상인의 근조직을 1.00으로 기준하여 증감을 비교 하였다. 정상근조직에 비해 두시엔느형 근이영양증(DMD)에서 CTRP1의 mRNA의 발현의 차이가 보이지만 정상근조직에 비해 두시엔느형 근이영양증(DMD)에서 CTRP1의 mRNA의 일정한 증가는 보이지 않지만 이는 각 조직에서 표현된 mRNA의 양이 근조직의 파괴 정도에 따라 보이는 차이라 여겨진다.

정상근과 두시엔느형 근이영양증의 mRNA발현을 비교해 본 결과, 두시엔느형 근이영양증 환자들의 개인차는 있지만 정상근에 비해 두시엔느형 근이영양증환자근에서의 CTRP1의 mRNA발현양이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다.

IV. 고찰

CTRP1은 adipokines의 family 중 하나인 C1q/tumor necrosis factor- α -related proteins(CTRPs)에 속하는 것으로 새롭게 밝혀진 단백질이다. 현재 보고 되어진 바에 의하면 CTRP1의 발현은 다양한 조직에서 발현되는 것으로 발견되었고 특히 혈관 평활근세포에서 발현되고, 혈소판 응집을 유도하는 콜라겐에 있는 VWF을 억제하여 생체 내에 혈소판 혈전증을 예방 해준다.²⁵ 재조합된 CTRP1이 혈소판 수용체 (platelet receptor)인 VWF을 전체적 또는 부분적으로 억제해주는 기능을 갖고 있다. 그러나 CTRP1이 VWF와 혈소판의 상호작용에 관여하지는 않아서 혈소판에서 어떻게 직접적인 작용을 하는지는 알 수 없었다.²⁵ CTRP1은 지방전구세포에서 나타나고 TNF- α 와 IL- β 를 처리한 비만 모델 쥐의 지방조직에서 대조군에 비하여 CTRP1의 발현이 증가되어 있었고, 재조합된 CTRP1을 쥐에 주입하면 대조군에 비하여 포도당 혈청 레벨을 낮춰지는 것으로 보고 되어져 있다.²⁶ 최근 연구에서도 재조합된 CTRP1을 처리한 C2C12 근관세포에 Akt와 P44/42 MAPK의 항체를 이용하여 단백질 정량을 웨스턴 블롯 한 결과 CTRP1을 처리하지 않은 대조군에 비해서 시그널 경로를 활성화 하는 단백질인 Akt와 P44/42 MAPK이 증가되어 활성화 되면서 원형질 막의 GLUT-4(glucose transporter 4)의 트래픽으로 인한 조직에서 포도당흡수가 향상되어 대사효과에 기여한다고 보고되어 있다.²⁴ 이러한 결과로 보았을 때 CTRP1은 간, 근육과 지방 조직에서 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미침으로써 지질 대사와 포도당대사 조절에 관여 한다고 추정 하고 있다.²² 따라서 CTRP1은 근육을 포함한 여러 조직에서 관여 할 것이라고 생각된다.

현재 CTRP1의 이해는 현재 초기 단계이고 근육조직에서 CTRP1의 역할은 밝혀지지 않았다. 이에 본 실험에서는 근세포의 분화 및 재생과 관련 되어 정상인의 근육모세포와 근관세포에서의 CTRP1의 발현 정도를 면역세포화학 염색법과 웨스턴 블롯으로 비교 분석 해 보았다. 그 결과 근육모세포에서의 CTRP1의 발현이 있었지만, 다핵화 된 근관세포에서의 세포질에서의 CTRP1의 발현이 증가된 것을 관찰 할 수 있었다. 지금까지 근세포의 CTRP1의 발현에 관한 보고는 전무한 상태이다. 세포 성장 단계에서 새로운 근육 섬유는 근육발생이 일어나는 동안 형성 되어 지고, 치유를 위한 손상된 섬유나 다른 새로운 근섬유 형성을 위한 근육 생성 세포의 분화와 융합이 발생된다. 근육 형성 세포의 융합이 이루어지면 새롭게 형성된 근육 섬유가 증가되고 근핵(myonuclei)이 근육 섬유의 주위까지 이동한다.^{35,36} 이러한 과정 즉, 근세포의 분화 과정에서 CTRP1이 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

CTRP1이 근육 발생과정에 어떠한 역할을 하는지 알아보하고자 근육병 환자의 근조직을 이용하여 실험을 하였다. 정상인과 두시엔느형 근이영양증과 염증성 근육병인 다발성근육병과 피부근염근육병을 포함한 환자의 근조직을 면역조직화학염색하여

CTRP1의 발현과 증감을 알아보고 그 의의를 알아보고자 한 결과 정상근과 염증성 근육병인 다발성근육병과 피부근염근육병에서는 세포막과 근섬유(muscle fiber) 주변에 있는 핵에 CTRP1이 발현되는 것을 관찰 할 수 있었고 두시엔느형 근이영양증에서는 세포의 괴사 및 재생이 진행되는 근섬유조직에 CTRP1의 발현이 증가 된 것을 관찰 할 수 있었다(그림3). 이를 웨스턴 블롯을 이용해 정량적으로 단백발현을 확인해본 결과에서도 정상근조직과 염증성근육병인 다발성근염과 피부근염병보다 두시엔느형 근이영양증에서도 CTRP1의 단백 발현양이 증가하는 같은 결과를 얻을 수 있었다(그림4). 이상의 결과들을 정리해 보면, CTRP1이 근세포의 분화에 있어서 CTRP1의 발현이 증가 되었고, 근이영양증을 통한 근변증에서의 CTRP1의 발현이 정상근에 비해서 발현이 증가되었음을 관찰 되었다. 특히 두시엔느형 근이영양증에서 세포막과 세포질뿐만 아니라 세포의 괴사 및 재생하고 있는 근섬유조직에서 CTRP1의 단백발현을 관찰 할 수 있었다. 이러한 소견은 즉, 지금까지 CTRP1이 근조직에 관한 보고된 바 없었고 본 실험에서 CTRP1이 근육조직의 발생에 관여하며 재생에서 중요한 역할을 할 것으로 유추 할 수 있었다. 그러나 근세포의 분화과정에 있어서 직접적인 영향을 끼치는지 세포의 괴사나 대사에 따른 영향에 의한 발현이 증가되었는지는 알 수는 없다. 이를 위해서는 근세포에 CTRP1의 cDNA를 Transfection하여 근발생 및 근섬유재생에서 중요한 역할을 하는 근육생성조절인자(MRFs)로 확인하는 실험을 진행하면 CTRP1의 재생에 대해 좀 더 확실히 밝힐 수 있을 것이다. 이러한 연구 결과는 CTRP1의 임상적 적용이나 기초자료에 도움이 될 수 있을 것이라고 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 CTRP1이 근세포의 분화와 근병증에 미치는 영향을 알아보기 위해 정상인의 근조직에서 얻은 근육모세포와 정상 근육조직, 근이영양증 및 염증성 근육병을 가진 환자의 근조직을 이용하여 면역화학염색과 웨스턴 블롯을 이용하여 CTRP1의 발현을 확인 하였다.

1. 근육모세포가 근관세포로 분화하면서 CTRP1의 발현이 증가 된 것을 관찰 할 수 있었고 특히 근세포 세포질에서 발현이 증가 된 것을 확인 할 수 있다.
2. 정상인의 근조직에 비해 근육병, 특히 두시엔느형 근이영양증 환자의 근조직에서 CTRP1의 발현이 증가되었고 특히 재생 섬유에서 발현이 증가 된 것을 확인 할 수 있다.

이상과 같이 CTRP1이 근육조직의 발생에 관여하며, 근세포의 분화와 근병증에서의 역할을 지지해준다. 이러한 연구 결과는 향 후 근육병환자의 세포치료에 대한 연구에 도움이 될 수 있을 것이라 여겨지며, 근육세포의 적절한 분화 유도 조건을 알아보기 위해서는 근발생 및 근섬유재생에서 중요한 역할을 하는 근육생성조절인자와 관련된 실험이 더 필요하다고 생각되는 바이다.

참고문헌

1. Morin CL, Eckel RH, Marcel T, Pagliassotti MJ. High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor- α activity. *Endocrinology* 1997;138:4665-71.
2. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *JCI* 1995;95:2111-9.
3. Pang SS, Le YY. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;3:29-34.
4. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-12.
5. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to Clq, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-9.
6. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:286-9.
7. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697-703.
8. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2005-10.
9. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7:947-53.
10. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-6.
11. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product(leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9034-7.
12. Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N, Okazaki T, Mori K, Shigemoto M, et al.

Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J. Clin Invest* 1995;96:1647-52.

13. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gómez-Reino JJ, et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 2005;579:295-301.

14. Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol* 2007;4:1-13.

15. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocrin Rev* 2006;27:762-78.

16. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.

17. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:772-83.

18. Wong GW, Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10302-7.

19. Shapiro L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 1998;8:335-8.

20. Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KB, et al. Clq and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol* 2004;25: 551-61.

21. Akiyama H, Furukawa S, Wakisaka S, Maeda T. Cartducin stimulates mesenchymal chondroprogenitor cell proliferation through both extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. *FEBS J* 2006;273: 2257-63.

22. Hayward C, Shu X, Cideciyan AV, Lennon A, Barran P, Zarepari S, et al. Mutation in a short-chain collagen gene, CTRP5, results in extracellular deposit formation in late-onset retinal degeneration : a genetic model for age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2003;12:2657-67.

23. Chang AC, Zsak L, Feng Y, Mosseri R, Lu Q, Kowalski P, et al. Phenotype-based identification of host genes required for replication of African swine fever virus. *J Virol* 2006;80:8705-17.

24. Wong GW, Krawczyk SA, Kitidis-Mitrokostas C, Revett T, Gimeno R, Lodish HF. Molecular, biochemical and functional characterizations of Clq/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-

gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. 2008;416:161-77.

25. Lasser G, Guchhait P, Ellsworth JL, Sheppard P, Lewis K, Bishop P, et al. C1qTNF-related protein-1(CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen. *Blood* 2006;107:423-30.

26. Kim KY, Kim HY, Kim JH, Lee CH, Kim DH, Lee YH, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increases CTRP1 expression in adipose tissue. *FEBS Lett* 2006;580:3953-60.

27. Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 1997;191:270-83.

28. Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol* 2000;224:122-37.

29. Füchtbauer EM, Westphal H. MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Dev Dyn* 1992;193:34-9.

30. Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res* 1992;267:99-104.

31. Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthuis RJ. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989;256:789-93.

32. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 1994;164:588-603.

33. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-38.

34. Yan Z, Choi S, Liu X, Zhang M, Schageman JJ, Lee SY, et al. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem* 2003;278:8826-36.

35. Snow MH. Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec* 1977;188:201-17.

36. Snow MH. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res* 1978;186:535-40.

Abstract

The Expression of CTRP1 in the Patients with Myopathies and Cultured Human Myoblast/Myotube

Seon Hwa So

*Department of Medical science
The graduate school, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Chul Choi)

The C1q/tumor necrosis factor- α -related proteins(CTRPs) are one of the important families in adipokine that act mainly on liver and muscle tissue to control glucose and lipid metabolism. According to the recent studied, CTRP1(Complement-C1q TNF-related protein 1) is one of the CTRP superfamily that is expressed in the vascular smooth muscle cells and, significantly prevents platelet thrombosis in vivo by inhibiting Von Willebrand factor(VWF) binding to collagen, thereby blocking the collagen induced platelet aggregation. In addition, CTRP1 is expressed in preadipocytes and up regulated in mouse adipose tissue inducing tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . It was known that CTRP1 may play an important biological role in adipocyte and immune system function. However there has been investigated its roles in the much time.

The present study was conducted to investigated the functional role of CRTPI in muscle repair and differentiation in human skeletal muscle of the patients with myopathies and cultured human myoblast. Cultured human myoblast obtained from normal muscle tissue and muscle tissue, obtained from patients with [Duchenne muscular dystrophy, Polymyositis and Dermatomyositis] and normal controls were analyzed for the expression of CTRP1 by immunocytochemistry and western blot. In conclusion, the expression of CTRP1 in myotube was increased compared with in myoblast. Based on these results, the muscle tissue from normal individuals and the patients with Duchenne muscular dystrophy, dermatomyositis and polymyositis were analyzed for the expression of the CTRP1 by immunohistochemistry and western blot. It was found that, the immunoreactivity of CTRP1 was strongly expressed in the regeneration muscle fiber of Duchenne muscular dystrophy. These results showed that the expression of CTRP1 is increased in regenerative and degenerative muscle fibers and also

increased in myoblast differentiation. Our study suggests that, CTRP1 may play an important role not only in skeletal muscle development but also in regeneration.

Key word: CTRP1, differentiation, myoblast, myotube, myopathy, degeneration, regeneration,
Duchenne muscular dystrophy