

培養鷄胚 筋細胞의 分化過程에 미치는 重金屬 이온의 影響

魏 仁 善·李 鍾 彬
(全南大學校 生物學科)

The Effect of Heavy Metal Ions on the Differentiation
of Cultured Muscle Cells of Chick Embryo

In-Sun Wui and Jong-Bin Lee
(Dept. of Biology, Chonnam National University)
(1987. 7. 8 접수)

ABSTRACT

The effect of heavy metal ions on the synthesis of proteins in cultured chick embryonic muscle cells were examined by labeling the cellular proteins with ^{35}S -methionine and the surface proteins with Na^{125}I and lactoperoxidase.

The protein pattern in the cells cultured for 48 hrs showed little or no difference whether or not the cells were treated with any of the metal ions including Cu^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} , which are known to block the fusion of myoblasts. However, a 43Kd protein disappeared from the control cells cultured for 72 hrs but remained unchanged in the cells treated with the metal ions.

When analyzed for the synthetic pattern of membrane proteins, addition of the ions (particularly of Cd^{2+} and Cr^{3+}) caused a marked increase in the level of 66Kd protein, as compared to that in the untreated cells. By contrast, the level of 29Kd protein was much higher in the control cells than in the cells treated with the metal ions.

These results suggest that the heavy metal ions appear to block the degradation of 43Kd soluble protein and 66Kd membrane protein, perhaps by inhibiting a metalloprotease, which may be essential for the myogenic process of embryonic muscle cells.

서 론

근래 환경오염이 인간의 건강을 위협하는 요인으로 등장하자 동물의 생식 및 발생계를

본 연구는 1984년도 문교부 학술연구 조성생의 지원에 의한것임.

이용하여 각종 중금속 오염물질의 유해성을 생물학적으로 검증하고 오염환경의 지표로 삼고 있다(Kobayashi, 1973; Wui, 1984).

계배 근세포의 단핵 미분화 근원세포는 세포의 증식과 신장 나아가서 융합을 거쳐 다핵의 근관세포를 형성하는 분화과정을 갖는다(Ha *et al.*, 1983). 또한, 계배 근원세포는 *in vitro* 에서 짧은시간에 배양이 용이하며, 각 종 근특이 단백질의 합성과 축적이 일어나 형태적 및 생화학적 변화가 뚜렷하므로 중금속 오염물질의 영향을 조사하는데 좋은 재료가 된다.

이러한 배경아래서, Park과 Ha(1980)는 토끼 골격근 세포체의 Ca^{2+} -ATPase의 활성이 저농도(10~500 μ M)의 중금속의 처리에 의하여 $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+}$ 의 순서로 억제된다고 보고하였으며, Peter 등(1966)은 Cu^{2+} 가 membrane-bound ATPase의 활성도를 억제시킨다고 보고하였다. 그리고, Wui 등(1983, 1984)은 배양 근원세포에 중금속 이온들을 처리하여 형태적 분화, 세포융합지수 및 총 단백질의 합성량을 조사하여 본 결과, 사용한 중금속들이 같은 농도에서 $Cd^{2+} > Cr^{3+} > Hg^{2+} > Cu^{2+}$ 의 순서로 근원세포의 분화, 즉 융합을 억제시킨다고 발표하였다.

따라서, 본 연구에서는 중금속 이온들(Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+})이 근세포 분화과정에서 일어나는 세포질 단백질과 막 단백질의 합성에 나타내는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 근세포의 배양

11일째의 마니커종 수정란을 구입하여 37.5°C 항온기 속에서 하루를 경과한 후, 이 계란들로 부터 얻은 근세포를 O'Neill의 Stockdale(1972)의 방법에 따라 배양하였다. 즉, 적출한 근세포를 혈구계산기로 계수하여 초기배양액(Eagle's minimum essential medium 8: horse serum 1: embryo extract 1)으로 7×10^5 cell/ml되게 희석한 후, 콜라겐도말 처리한 직경 10 mm 배양접시에 각각 8 ml씩 넣어 배양하였다. 초기배양액에서 24시간 경과한 뒤에 후기배양액(Eagle's minimum essential medium 9: horse serum 1: chick embryo extract 0:2)으로 교환해 주었으며 그 후 매 48시간마다 새로운 후기배양액으로 교환해 주었다.

배양 근원세포에 대한 중금속 이온의 저해효과를 규명하기 위하여 $HgCl_2$, $Cd(NO_3) \cdot 2.4 H_2O$, $CrCl_3 \cdot 6H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 일단 멸균수에 녹여 1,000ppm stock solution을 만든 다음, 일정양(1ppm, 3ppm)을 직접 배양액에 첨가했으며 중금속을 포함하지 않은 배양액을 동시에 사용하여 대조군으로 하였다.

2. 단백질 분석

i) 전기영동

단백질 분석은 Laemmli(1970)의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 방법에 따라 실시하였다. gel은 1 mm 두께의 slab gradient gel(6~12%)을 사용 하였으며 전압은 처음 1시간을 80volt로, 나머지 시간은 150volt로 고정하여 약 6시간 실시하였다. 전기영동을 완료한 gel은 Coomassie blue용액 (0.2% Coomassie blue + 50% methanol + 10% acetic acid + 1% glycerol)으로 염색한 후 탈색용액(35% methanol + 10% acetic acid + 1% glycerol)으로 탈색한 후 건조시켰다. 그리고 전기영동 gel상에 나타난 단백질의 분자량을 측정하기 위하여 표지단백질로 myosin, β -galactosidase, phosphorylase b, bovine serum albumin, egg albumin,

carbonic anhydrase)을 사용하였고, 단백질의 관별에는 Ha 등(1979)의 방법에 따랐다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 Lowry등(1951)의 방법에 따라 정량하였다.

ii) 세포질 단백질의 표지

근세포 배양 실시 후 36시간 및 60시간째에 ^{35}S -methionine($5\mu\text{Ci/ml}$)을 첨가한 후기배양액에서 근세포를 12시간 배양시켰으며 그후 배양접시에서 배양액을 제거하고 EBSS(Earl's balanced salt solution)로 세번 씻어 낸 다음, 세포를 $4,000\times\text{g}$ 에서 원심분리(Hitachi 20 PR-5)하여 수확한 후 전기영동을 실시하였다. 그리고 건조시킨 gel은 암실에서 X-ray film (Fuji AIF RX)으로 자기방사를 일정기간 실시하였다.

iii) 막 단백질의 표지

세포막 표면의 단백질의 변화를 알아보기 위하여 배양 실시 후 48시간 72시간에 배양접시에서 배양액을 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)로 세번 씻어낸 다음 세포를 $4,000\times\text{g}$ 로 원심분리하여 수확하였다. 이와같이 얻은 세포에 $140\mu\text{l}$ lactoperoxidase(3IU/ml)와 $300\mu\text{l}$ Na^{125}I (1mCi/ml)를 넣은 다음, 10분 간격으로 $20\mu\text{l}$ H_2O_2 (90mM)를 두번 첨가하여 막 단백질을 표지하였다. 그리고, 2mM PMSF(phenyl methyl sulfonyl fluoride)와 0.5mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 를 포함한 PBS(10ml)를 넣어 반응을 중단시키고, $5,000\times\text{g}$ 로 원심분리하여 얻은 근세포에 적당량의 0.1M Tris-HCl(pH 6.8)의 완충용액을 넣고 homogenizer(Belco)로 균질화한 후 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동 후 건조시킨 gel은 합성중인 단백질의 경우와 같은 방법으로 자기방사를 실시하였다.

결 과

1. 세포질 단백질의 합성양상

본 실험에 사용한 4종의 중금속 이온이 배양 근원세포의 단백질 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ^{35}S -methionine으로 12시간 표지하여 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. Fig. 1은 배양 개시 후 36시간부터 12시간 표지한 것이며, Fig. 2는 배양 개시 후 60시간부터 12시간 표지한 것이다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양 36시간부터 48시간 사이에 합성되는 단백질의 종류와 각 단백질 양은 대조군과 중금속 처리군 간에 별다른 차이를 보이지 않았다. 한편 배양 60시간부터 12시간 표지한 단백질의 합성양상은(Fig. 2) 대조군과 비교 했을때 처리군에서의 단백질 합성이 36~48시간의 것(Fig. 1)보다 활발하였고, 특히 43Kd의 단백질 양이 많이 합성되었다.

2. 막 단백질의 합성양상

배양 근세포의 막 단백질 생성에 4종의 중금속 이온의 영향을 보기 위하여 배양 후 48시간과 72시간에 근세포의 막 단백질을 Na^{131}I 로 표지하여 전기영동 후 자기방사한 결과는 Fig. 3, 4와 같다. 이들 중 48시간(Fig. 3)에 표시된 막단백질의 대부분은 분자량이 45Kd 이상의 것이었다. 그리고 막단백질의 조성은 대조군과 처리군이 거의 비슷 하였으나 Cu^{2+} 와 Hg^{2+} 의 처리군에서는 전반적으로 막 단백질양은 적게 나타났고, 특히 45Kd 단백질의 양은 상당한 감소를 보였다. Cr^{3+} 과 Cd^{2+} 처리군에는 대조군과 비슷하여 근세포의 막 단백질 합성에 미치는 영향이 경미하거나 거의 없는것으로 나타났다. 배양 72시간(Fig. 4)에

표지된 막단백질의 조성은 48시간에 표지한 경우와는 달리 대조군과 처리군에서 막 단백질의 조성 및 합성량에 차이가 있었다. 대조군에서는 29Kd 단백질의 양이 증가되는 것으로 나타났고, 중금속 처리군에서는 29Kd 단백질의 양이 대체로 감소되는 경향을 보였다. 그러나, 66Kd 단백질은 중금속 처리군에서는 (특히 Cd^{2+} 와 Cr^{3+} 의 처리군) 현저한 양적인 증가를 보이는 반면에 대조군에서는 거의 찾아 볼 수가 없었다.

고 찰

근세포의 분화과정은 세포융합과 근육이 단백질의 합성이 수반되는 과정으로, 이러한 과정은 중금속 이온과 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있다. David 등(1981)과 Hagigawa 등(1987)은 Ca^{2+} 과 Fe^{3+} 이온이 근세포 분화과정에 필수적인 요소로 작용한다고 보고하였다. 한편, Cd^{2+} , Cr^{2+} , Hg^{2+} 및 Cu^{2+} 와 같은 중금속 이온들은 근세포의 증식에는 영향을 보이지 않지만, 근세포의 융합을 저해시킨다는 보고가 있었다(Shainberg *et al.*, 1969; Wui *et al.*, 1983, 1984). 따라서 본 실험에서는 이와같은 중금속 이온들이 근세포 단백질의 합성에 미치는 영향을 연구해 보았다. 그 결과, 이들 모두가 Ca^{2+} 와 Fe^{3+} 에 대해 antagonist로 작용하는 효과를 보이는 것으로 나타났다. 즉, 세포배양 후 36시간에 합성되는 단백질의 양상은 이들 중금속을 처리하였을 경우나 대조군에서 큰 차이를 나타내지 않았으나(Fig. 1), 대조군이 세포융합을 마친 60시간에는 단백질 합성양상이 크게 변화한 것을 볼 수 있었다(Fig. 1 & 2의 대조군). 특히 45Kd 단백질의 합성양상은 대조군에서 세포융합이 진행됨에 따라 크게 감소하였는데, 중금속에 의해 세포융합이 억제된 경우에는 계속 다량 합성되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이와같이 근세포의 분화에 따라 45Kd 단백질의 합성양상이 크게 변하는 것은 이 단백질이 근세포 분화와 깊은 관계가 있음을 시사한다. 다시 말하자면, 이 단백질이 계속 합성되거나 분해되지 않고 다량 존재하는 경우에는 근세포 분화가 과정 억제되는 것으로 추측된다. 따라서 이들 중금속 이온들은 Fe^{3+} 의 antagonist로서 DNA 전사에 영향을 미치거나(Shoji and Ozawa, 1986), 또는 Ca^{2+} 이나 Fe^{3+} 에 의하여 활성화되는 단백질 분해효소인 metalloprotease를 저해함으로써 45Kd 단백질이 높은 농도로 남아있게 되어, 결과적으로 근세포 분화를 억제하는 것으로 해석할 수 있다.

막 단백질의 양상은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 처리해준 중금속의 종류에 따라 다르게 나타났다. Fig. 3에서는 45Kd 단백질의 양이 Cu^{2+} 과 Hg^{2+} 의 처리에 의하여 감소되는 것을 볼 수 있다. 그러나 Cd^{2+} 과 Cr^{3+} 을 처리하였을 경우에는 근세포의 융합은 억제되었으나, 45Kd 단백질의 양은 대조군의 것과 거의 비슷하였다. 따라서 이 단백질은 세포융합과는 무관한 것으로 사료된다. 한편, 중금속 이온들을 처리하여 72시간동안 배양된 세포의 막단백질 양상을 대조군의 것과 비교하여 보면(Fig. 4), 근세포 융합을 가장 효과적으로 억제시키는 Cd^{2+} 와 Cr^{3+} 을 처리하였을 때에 66Kd 단백질의 양이 가장 많이 증가되었음을 알 수 있다. 이와같이 66Kd 단백질의 양이 특이하게 증가되는 현상은 근세포 분화의 억제제로 알려진 부틸산을 처리하였을 경우에도 나타나는 것으로 보고된 바 있다(Minty *et al.*, 1981). 반면에, 대조군에서는 상당량 존재하는 29Kd의 막단백질이 중금속의 처리군에서는 현저하게 감소되어 있음을 볼 수 있다. 따라서, 66Kd의 단백질이 29Kd로 processing되는 과정이 근세포 분화과정에서 일어나는 것으로 보이며, 앞서 언급한 바와 같이, 이 과정을

촉매하는 단백질 분해효소 즉, metalloprotease가 중금속의 처리에 의하여 억제되고 그 결과 근분화가 억제되었다고 해석 할 수 있다(Couch and Strittmatter, 1983).

요 약

근세포의 분화를 저해하는 것으로 알려져 있는 중금속 이온을 배양 중인 계배 근세포에 처리하여 세포의 단백질 합성에 미치는 영향을 연구하였다. 이를 위하여 계배 근세포의 세포 내 단백질은 S^{35} -methionine으로 표지하고 막 단백질은 lactoperoxidase를 사용하여 I^{125} 를 표지한 후 세포추출물을 전기영동하고, 또 자기방사 시켜서 단백질의 양상을 비교, 분석하였다.

근세포가 분화를 시작할 시기인 배양 48시간까지는 중금속이 세포 내 용해성 단백질에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 그러나 정상적인 상태에서 분화가 완료될 시기인 배양 72시간이 되면 세포의 단백질 양상에 현저한 차이가 나타났다. 즉, 정상 상태에서는 소멸되어 버리는 43Kd 단백질은 중금속 처리에 의하여 계속 잔존하고 있었으며, 66Kd의 막단백질 양은 특히 Cd^{2+} 이나 Cr^{3+} 을 처리하였을 때 현저하게 증가함을 볼 수 있다.

이러한 결과는 중금속 이온이 근세포분화에 작용하는 단백질 분해효소인 metalloprotease를 저해함으로써, 분해되어야 할 43Kd의 세포질 단백질과 66Kd 막단백질이 분해되지 못한 데서 기인한 것이라 사료된다.

REFERENCES

- Cates, G.A., H. Kaur and B.D. Sanwal, 1984. Inhibition of fusion of skeletal myoblasts by tunicamycin and its reversal by N-acetylglucosamine. *Can. J. Biochem.* 62:28-35.
- Couch, C.B. and W.J. Strittmatter, 1983. Rat myoblast fusion requires metalloprotease activity. *Cell* 32:257-265.
- David, J.D., W.M. See and C-A, Higginbothan, 1981. Fusion of chick embryo skeletal myoblasts. *Develop. Biol.* 82:267-307.
- Gilfix, B.M. and B.D. Sanwal, 1980. Inhibition of myoblast fusion by tunicamycin and pantomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1184-1191.
- Ha, D.B., R. Boland and A. Martonosi, 1979. Synthesis of the calcium transport ATPase of sarcoplasmic reticulum and other muscle proteins during development of muscle cells *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta.* 585:165-187.
- Ha D.B., B.J. Yoo, J.K. Sohn, H.S. Kang and Y.S. Lee, 1983. Synthesis of muscle-specific protein during the differentiation of cultured chick embryonic muscle. *Korean J. Zool.* 26:1-18.
- Hagigawa, Y., K. Saito, S. Atsumi, and E. Ozawa, 1987. Iron supports myogenic cell differentiation to the same degree as does iron-bound transferrin. *Develop. Biol.* 120:236-244.
- Hynes, R.O., G.S. Martin, M. Shearer, D.R. Critcheley and C.J. Epstein, 1976. Viral transformation of rat myoblasts: Effects of fusion and surface proteins. *Develop. Biol.*, 48:35-46.
- Kang, M.S., W.K. Song, H.W. Nam and C.Y. Chung., 1985. Alternations in cellular and plasma membrane glycoproteins in chicken myogenesis *in vitro*. *Korean J. Zool.* 28:125-136.
- Kobayashi, N., 1973. Studies on the effects of some agents on fertilized sea urchin eggs, as a part

- of the bases for marine pollution bioassay I. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, XXI(2), 109:114.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Minty, C., D. Montarras, M.Y. Fiazman, and F. Gros, 1981. Butylate-treated chick embryo myoblasts synthesize new proteins. *Exp. Cell Res.* 133, 63-72.
- O'Neill, M.C. and F.E. Stockdale, 1972. A kinetic analysis of myogenesis *in vitro*. *J. Cell Biol.* 52:52-65.
- Park, Y.S. and Ha, D.B. 1980. Kinetic studies on the effects of divalent cations on the ATPase activity of the fragmented sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Korean J. Zool.* 23: 137-148.
- Pauw, P.G. and J.D. David, 1979. Alterations in surface proteins during myogenesis of a rat myoblast cell line. *Develop. Biol.* 70:27-38.
- Peters, R.A., M. Shorthouse and J.M. Walse, 1966. Studies on the toxicity of copper. *Proc. Royal Soc.* 166:285-294.
- Shainberg, A., G. Yagil and D. Yaffe, 1969. Control of myogenesis *in vitro* by the Ca^{2+} concentration in the nutritional medium. *Expt. Cell Res.* 58:163-167.
- Shoji, A. and E. Ozawa, 1986. Necessity of transferrin for RNA synthesis in chick myotubes. *J. Cell Physiol.* 127:349-356.
- Skilleter, D.N., 1975. The decrease of mitochondrial substrate uptake by trialkylation and trialkyl-lead compounds in chloride media and its relevance to inhibition of oxidative phosphorylation. *Biochem. J.* 146:465-471.
- Vallee, B.L., and D.D. Ulmer, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41:91-128.
- Walsh, F.S. and E. Phillips, 1981. Specific changes in cellular glycoproteins and surface proteins during myogenesis in clonal muscle cells. *Develop.* 81:229-237.
- Wu, F.S., Y.C. Park., D. Roufa and A. Martonosi, 1981. Selective stimulation of the synthesis of an 80,000 dalton protein by calcium ionophores. *Bio. Che.* 256:5309-5312.
- Wui, I.S., C.H. Ra, C.G. Choi, J.B. Lee, S.K. Baik and D.B. Ha, 1983. The effect of heavy metal ions on the differentiation of cultured muscle cells of chick embryo, *J. Envi. C.N.U.* 2:31-38.
- Wui, I.S., C.H. Ra, S.K. Baik, J.B. Lee and D.B. Ha, 1984. The effect of heavy metal ions on the differentiation of cultured muscle cells of chick embryo (II). *J. Basic Science C.N.U.* 15:67-78.

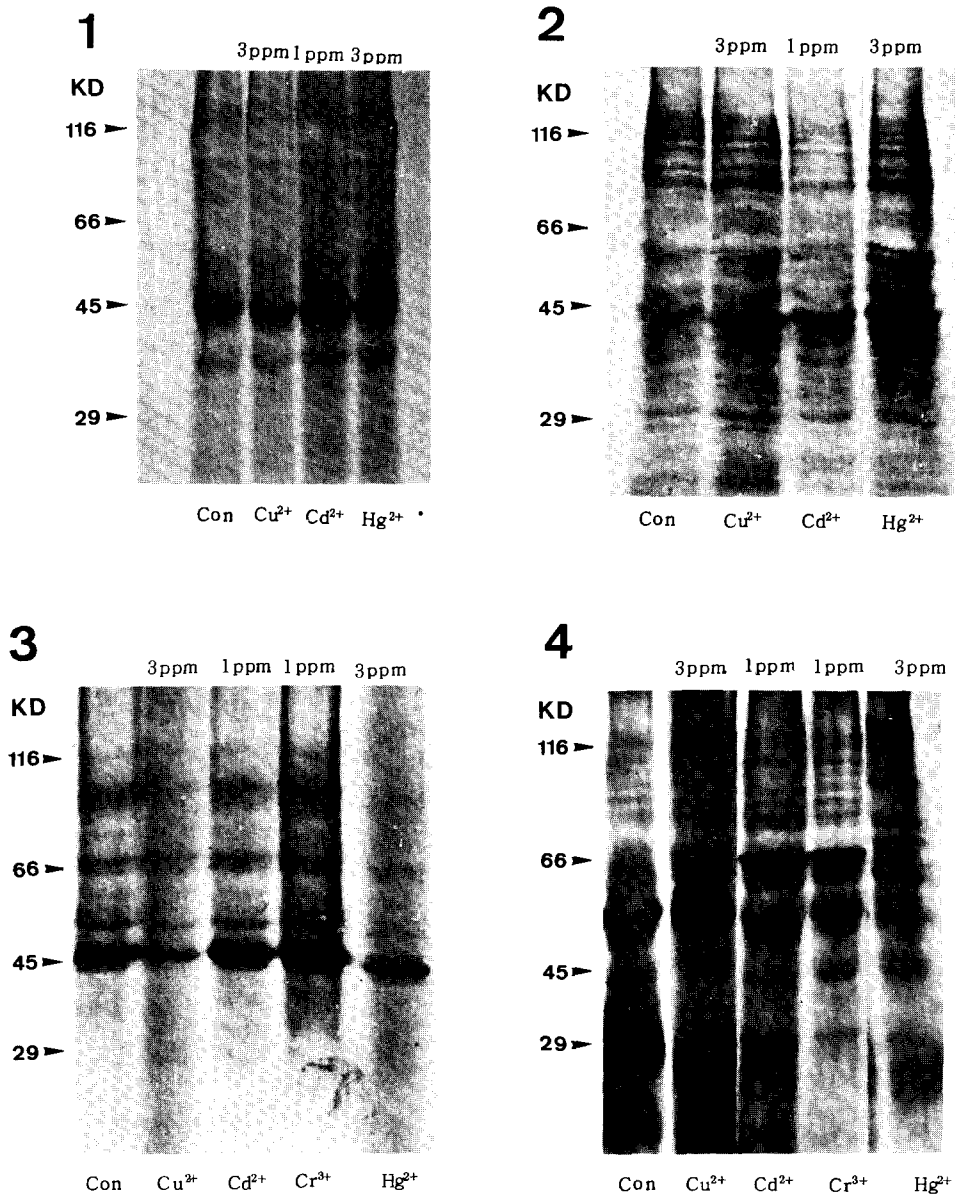


Fig. 1. The effect of heavy metal ions on the muscle cells labelled with ³⁵S-methionine for 12 hours at 36 hour.

Fig. 2. The effect of heavy metal ions on the muscle cells labelled with ³⁵S-methionine for 12 ours at 60 hour.

Fig. 3. The effect of heavy metal ions on the muscle cells labelled with Na¹³¹I at 48 hour.

Fig. 4. The effect of heavy metal ions on the muscle cells labelled with Na¹³¹I at 72 hour.