

## BC3H-1 분화세포에서의 (Na,K)ATPase $\alpha_2$ isoform의 표현증대

이 경 림\*

이화여자대학교 약학대학

(Received July 22, 1996)

### Increased Expression of the $\alpha_2$ Isoform of (Na,K)ATPase in the Differentiated Murine Muscle Cell Line BC3H-1

Kyung-Lim Lee\*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

**Abstract**—The development of the  $\alpha_2$  isoform of (Na,K)ATPase which is high affinity ouabain receptors was studied in the differentiating nonfusing muscle cell line BC3H-1. The differentiation process of BC3H-1 cell line was confirmed by 2-deoxy-D- $^3$ H glucose uptake experiment and the quantity of the expression of  $\alpha_2$  isoform was measured using a whole cell  $^3$ H ouabain-binding assay. Undifferentiated growing BC3H-1 cells, myoblasts, exhibited low levels of insulin-stimulated glucose uptake and  $^3$ H ouabain-binding sites. In contrast, differentiated BC3H-1 cells, myocytes, had a 5.6-fold increase in insulin-stimulated glucose uptake and 5-fold increase in  $^3$ H ouabain-binding sites. Scatchard analysis showed that myocytes developed more  $^3$ H ouabain-binding sites than myoblasts with a dissociation constant (kd) of  $6 \times 10^6$  M and capacity of  $6.1 \times 10^5$  sites/cell. Therefore, it seems that myoblasts express low levels of  $\alpha_2$  subunit and probably the majority of  $\alpha_1$  subunit, whereas myocytes express high levels of  $\alpha_2$  isoform. The results indicate that the expression of  $\alpha_2$  isoform is developmentally regulated during differentiation and that BC3H-1 culture system provides an excellent model for the study of differentiation and mechanism of (Na,K)ATPase action in muscle which requires electrical excitability.

**Keywords** □ (Na,K)ATPase, glucose uptake, ouabain binding, differentiation, BC3H-1.

(Na,K)ATPase은 모든 포유동물에 존재하는 세포막 단백질로서  $\text{Na}^+$ 은 세포 밖으로,  $\text{K}^+$ 은 세포 안으로 능동수송하는 단백질이며 2개의 subunit, 즉 112 kDa인  $\alpha$  subunit과 55 kDa인  $\beta$  subunit으로 구성되어 있다.  $\alpha$  subunit은 실제적인 이온 수송 기능을 담당하며 여러 가지 ligand, 즉 ATP, ouabain, cation들과 상호작용을 한다.<sup>1)</sup> Glycosylation이 된  $\beta$  subunit은 소포체에서  $\alpha$  subunit의 수용체 역할, 즉  $\alpha\beta$  subunit이 되도록 유도하며  $\alpha\beta$  subunit된 후에야 세포막으로 targeting 할 수 있다는 보고가 있다.<sup>2)</sup>

(Na,K)ATPase은  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  isoform들이 존재함

으로서 기능의 다양성을 보여주며 이들 유전자 발현은 발생과정중 조절된다. 또한 조직 특이성을 보여 주는데  $\alpha_1$  isoform은 모든 세포에 존재하는 반면  $\alpha_2$  isoform은 주로 뇌, 근육세포, 그리고 비만세포에,  $\alpha_3$  isoform은 뇌에만 존재해 있다. 특히 rodents  $\alpha$  isoform들의 가장 뚜렷한 차이는 cardiac glycoside인 digoxin과 ouabain에 대한 친화도가 다르다는 점이다.<sup>3,4)</sup>  $\alpha_2$  isoform은 cardiac glycoside에 대해 높은 친화력을 가지고 있으므로 ouabain의  $10^8$  M에서도  $\alpha_2$  isoform의 활성도가 저해되는 반면  $\alpha_1$  isoform은 cardiac glycoside에 대해 낮은 친화력을 갖고 있으므로  $\alpha_2$  isoform보다 약 1000배 높은 농도 즉  $10^5$  M에서  $\alpha_1$  isoform의 활성이 저해된다. 다시 말해 ouabain의 낮은 농도에 의해서 그리고 높은 농도에 의해서 활성이 저해되는

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-360-3024 (팩스) 02-360-3024

2가지 형태의 (Na,K)ATPase가 존재한다는 것이다.<sup>5)</sup> (Na,K)ATPase은 근육세포의 세포막전압 형성에 가장 중요한 역할을 하므로 근육세포에서의 isoform 발현을 아는 것은 근육 생리를 이해하는데 큰 도움이 되리라 사료되므로 murine smooth muscle cell인 BC3H-1 세포를 이용하여 (Na,K)ATPase의 isoform 단백질 발현변화를 보았다. 본 논문에서는 BC3H-1 세포가 분화되었는지의 여부를 인슐린에 의한 glucose의 흡수 증가로 확인하였으며 이에 따른 high affinity ouabain binding site이 증가되었는지의 여부는 [<sup>3</sup>H] ouabain-binding assay를 통해 관찰하였다.

### 실험방법

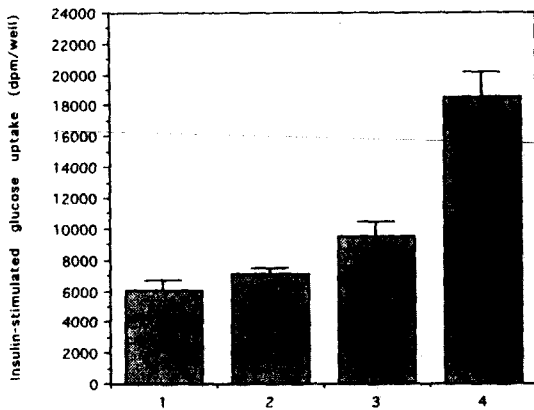
**시약** - Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin-Streptomycin, L-Glutamine, Trypsin-EDTA은 Gibco사로부터 구입하였고, [<sup>3</sup>H] ouabain과 2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose은 New England Nuclear에서 구입하였으며 ouabain은 Sigma사로부터 구입했다. 다른 기타 시약들은 최상품에 준하는 것으로 사용하였다.

**세포배양** - BC3H-1 세포는 murine smooth muscle cell에 속하나 아세틸콜린이 붙는 니코틴 수용체도 갖고 있으므로 골격근의 성질도 함께 갖고 있다.<sup>6,7)</sup> 이 세포는 ATCC (USA)에서 구입하였으며 20% FBS, 5 Units Penicillin G, 50  $\mu$ g Streptomycin sulfate/ml을 함유한 DMEM 성장배지에서 12% CO<sub>2</sub>와 습도가 일정하게 유지되는 37°C incubator에서 배양되었다. Myoblast은 이와같은 성장배지에서 자란 미분화된 세포를 말하며 배양하는데 약 3일 걸린다. Confluence에 도달한 세포는 0.05% trypsin과 0.02% EDTA에 의해 배양 petri dish로부터 분리한 후 hemacytometer로 세포수를 세었으며 세포의 viability은 trypan blue exclusion 방법을 사용하였다. 성장 배지에서 confluence가 된 myoblast는 성장 배지를 제거한 후 10  $\mu$ g/ml insulin과 5  $\mu$ g/ml transferrin을 함유한 DMEM 분화배지로 갈아준 후 5일 정도 더 배양함으로써 분화된 BC3H-1 세포인 myocyte을 얻었다.

**2-Deoxy-D-[<sup>3</sup>H] Glucose Uptake 측정** - 하나의 well에 2.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cell을 12 well dish에 분배하였다. 3일후 세포배양배지를 제거하고 3 ml의 0.5% FBS가

함유된 DMEM 배지를 넣었다. 하루후 이 배지에 25 mM glucose을 가하고 다시 하루가 지난 후 glucose uptake 실험을 하였다. Glucose가 함유된 배지를 제거한 후 Modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (138 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg Bovine Serum Albumin/ml, pH 7.4)으로 3번 세척하였다. 그후 400  $\mu$ l buffer 용액을 넣은후 37°C에서 10분간 배양하였다. 20  $\mu$ l의 buffer용액 또는 인슐린 용액을 여러 농도로 투여한 후 세포를 37°C에서 15분간 배양하였다. Buffer 용액 1 ml당 1  $\mu$ Ci 2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose (50~150  $\mu$ Ci/mol)을 세포에 가해주고 37°C에서 5분간 배양하였다. 이 반응은 0.5 ml ice-cold PBS를 넣어줌으로써 종결되었으며 이를 제거한 후 ice-cold PBS로 3번 세척하였다. 500  $\mu$ l Solvable (New England Nuclear, USA)를 가하고 37°C에서 1~2시간 방치함으로써 세포를 용해한 후 [<sup>3</sup>H] 동위원소를 측정하였다.

**[<sup>3</sup>H] Ouabain-Binding Assay** - Myoblast와 myocyte의 [<sup>3</sup>H] ouabain에 대한 친화력 정도를 알기 위해 [<sup>3</sup>H] ouabain-binding assay을 행하였으며 Takeyasu *et al.*<sup>8)</sup>과 Norgaard *et al.*<sup>9)</sup>방법을 따랐다. Myoblast는 성장배지에서 2.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well이 되게 16 well dish에 분배한 후 confluence가 되면 사용하였고 myocyte은 성장배지에 2.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well이 되게 16 well dish에 분배하고 하루 후에 분화배지로 갈아준 후 5일간 분화되게 배양한다. 세포배양배지를 제거하고 K<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> free Hepes-NaOH-buffered saline solution (K<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>-free HBSS: 20 mM Hepes-NaOH, 130 mM NaCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mg/ml phenol red, pH 7.4)로 두번 세척하였다. 1.5 mM sodium vanadate와 [<sup>3</sup>H] ouabain (50 nM~1200 nM농도)을 함유한 K<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup>-free-HBSS을 한 well에 1 ml씩 가해 주었으며 또한 nonspecific binding을 알기 위해 [<sup>3</sup>H]이 표적되지 않은 ouabain을 100배 높은 농도로 가해준 후 37°C에서 2시간 방치하였다. 2시간후 반응용액을 제거하고 5 ml K<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> free-HBSS로 4°C에서 10분씩 방치하면서 3번 세척한 후 세포들은 0.5 ml Solvable (New England Nuclear, USA)로 세포를 녹여 거두고 그 중 50  $\mu$ l을 취해 Lowry Assay를 하고 나머지는 5 ml Formula 989 (New Eng-



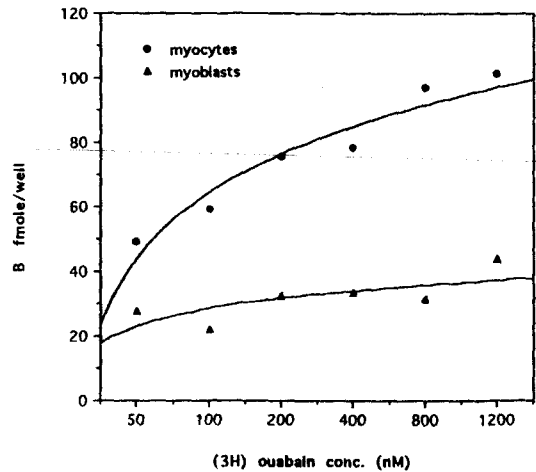
**Fig. 1**—Insulin-stimulated glucose uptake in BC3H-1 myoblasts and differentiated myocytes. All data is expressed as the mean SD of three experiments. [ $^3\text{H}$ ] glucose uptake was measured in BC3H-1 myoblasts without (column 1) and with (column 2) insulin stimulation as well as in differentiated myocytes without (column 3) and with (column 4) insulin stimulation.

land Nuclear, USA)를 넣은 후 [ $^3\text{H}$ ] 동위원소를 측정하였다. Specific binding은 [ $^3\text{H}$ ] ouabain보다 100배 높은 농도의 ouabain이 없는 well에서 얻은 total binding에서 100배 ouabain을 가해서 얻어진 nonspecific binding을 뺀으로써 계산되었다. [ $^3\text{H}$ ] ouabain 결합결과는 포화결합 plot으로 보여지며 dissociation constant인  $K_d$ 와 binding capacity인  $B_{\max}$ 은 LIGAND Computer Program을 사용해서 계산되었다.

### 실험결과 및 고찰

#### 2-Deoxy-D- $^3\text{H}$ Glucose Uptake 측정

Standaert *et al.*<sup>10)</sup>은 BC3H-1 세포가 분화되면서 인슐린 수용체가 증가하고 그로 인해 분화된 세포에 인슐린을 투여하면 glucose 흡수가 증가됨을 관찰하였다. 그러므로 [ $^3\text{H}$ ] ouabain binding assay를 하기전에 BC3H-1 세포의 분화가 잘 되었는지를 확인하기 위해 인슐린에 의한 2-deoxy-D- $^3\text{H}$  glucose uptake를 측정하였다. Fig. 1에서 보는 것처럼 성장세포에서는 인슐린에 의한 glucose 흡수가 17%만 증가한 데 반해 분화 세포에서는 96% 증가됨을 알 수 있다. Standaert *et al.*<sup>10)</sup>은 myoblast에 비해 myocyte에서는 2.75배의 2-deoxy-D- $^3\text{H}$  glucose의 흡수가 있었으나 본 실험



**Fig. 2**—Saturation binding of [ $^3\text{H}$ ] ouabain to undifferentiated (solid triangle) and differentiated (solid circle) BC3H-1. Cells were incubated with 50, 100, 200, 400, 800, and 1200 nM concentrations of [ $^3\text{H}$ ] ouabain for 2 hours at 37°C in the absence or presence of 100 fold concentration of ouabain.

에서는 5.6배의 증가를 관찰하였다. 이 차이점은 Standaert *et al.*<sup>10)</sup>은 분화된 BC3H-1 세포에서 인슐린을 투여하지 않은 상태에서의 2-deoxy-D- $^3\text{H}$  glucose의 basal uptake를 측정해서 표준화를 시키지 않은데서 온 듯 싶다. 하지만 기본적으로 분화된 BC3H-1 세포가 인슐린에 의해서 2-deoxy-D- $^3\text{H}$  glucose 흡수를 증가시킨다는 점은 Standaert *et al.*<sup>10)</sup>과 본 논문의 실험결과가 일치한다고 할 수 있다.

#### [ $^3\text{H}$ ] Ouabain-Binding Assay

BC3H-1 세포가 성장할 때와 분화할 때 [ $^3\text{H}$ ] ouabain에 대한 친화력의 변화가 있는지 여부를 알기 위해 50 nM~1200 nM의 [ $^3\text{H}$ ] ouabain을 사용하여서 결합 정도를 알아보았다. 성장배지에서 confluence가 되면 세포수는 정적으로 있다가 fetal bovine serum이 없는 분화배지로 바뀌주면 분화하는 세포로 진행한다. Fig. 2에서 보는 것처럼 분화되지 않은 성장세포들은 [ $^3\text{H}$ ] ouabain에 대해 매우 적은 결합을 보여 주었으나 분화된 세포들은 약 5배 정도 [ $^3\text{H}$ ] ouabain 결합수가 증가됨을 알 수 있다. 이는 BC3H-1 세포가 분화됨에 따라 근육세포에서처럼 ouabain에 대해 좀더 예민한 즉, 높은 친화력을 갖고 있는  $\alpha_2$  isoform이 유도되었음을 시사한다. 분화된 세포에서는 800 nM의 ouabain 농도에서 결

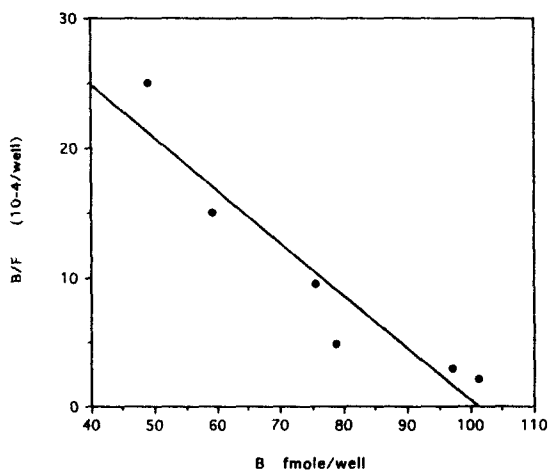


Fig. 3—Scatchard plot of the [ $^3\text{H}$ ] ouabain-binding data of differentiated BC3H-1 which was obtained from Fig. 2. Bound [ $^3\text{H}$ ] ouabain fmole/well was plotted as a function of bound [ $^3\text{H}$ ] ouabain (B)/free [ $^3\text{H}$ ] ouabain (F).

합 자리가 포화되었다. 이를 Scatchard analysis을 해 보면  $K_d$ 가  $6 \times 10^{-8} \text{M}$ 로서 높은 친화력을 갖고 있음을 알 수 있으며 capacity는 하나의 세포당  $6.1 \times 10^5$ 개의 결합 자리를 지니고 있음을 알 수 있다 (Fig. 3). 이처럼 BC3H-1 근육 세포가 분화됨에 따라 high affinity ouabain receptor인  $\alpha_2$  isoform이 증가하는 현상은 태어난 지 35일 지난 rat의 soleus muscle에서  $\alpha_2$  isoform이 급격히 증가한다는 보고와 유사하다.<sup>11)</sup> Orlowski와 Lingrel<sup>12)</sup>은 murine  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  myogenic cell을 이용해서 분화과정중  $\alpha_2$  isoform의 mRNA 변화가 있는지를 관찰하였다. 미분화된 성장기 세포에 있어서는 주로  $\alpha_1$  mRNA만 발견된 반면  $\alpha_2$  mRNA는 매우 낮게 있었다. 반면에 분화과정을 거치면서  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  세포는  $\alpha_1$  mRNA는 일정한 수준으로 변하지 않았으나  $\alpha_2$  mRNA는 약 12배 정도로 급격히 증가하였다. 뿐만 아니라  $\beta$  subunit mRNA도 약 2~3배 증가됨을 알 수 있었다. 이는 근육 세포가 성장함에 따라 다양한 기능을 가진 (Na,K)ATPase의 isozyme을 발현한다는 사실을 알 수 있으며 이 논문에서의 실험 결과 역시 단백질 측면에서 이 사실을 뒷받침해 준다고 할 수 있다. 한가지 주목할 만한 사실은  $\alpha_1$  isoform이 세포내  $\text{Na}^+$ 의 농도에 의해 활성화되는 반면  $\alpha_2$  isoform은 세포내  $\text{Na}^+$ 의 농도에 대해서는 영향을 받지 않으며 오직 인슐린 같은 호르몬에 의해서만 활성화된다는 사실이다.<sup>13)</sup> 그러므로  $\alpha_2$  isoform은 인슐린이 없을 때는 억제인자에 의해 작용을 하지 못하다가 인슐린

에 의해 억제인자가  $\alpha_2$  isoform에서 풀림으로써 활성화된다고 할 수 있다.<sup>13)</sup> 이런 억제인자를 규명하기 위해서는 인슐린 receptor을 가지고 있어야 하며  $\alpha_2$  isoform이 존재하는 cell line이어야 한다. 분화된  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  세포는  $\alpha_2$  isoform은 발현하나 인슐린 receptor 존재여부는 밝혀지지 않았다. 하지만 분화된 BC3H1 세포는 Standardert *et al.*<sup>10)</sup>에 의해 인슐린 receptor을 갖고 있음이 밝혀졌으며 본 논문서 밝힌 것처럼  $\alpha_2$  isoform을 표현한다는 점에서 억제인자를 연구하기에 적합한 cell line이라고 할 수 있다.

## 결론

Murine smooth muscle cell인 BC3H-1이 분화되면서 (Na,K)ATPase isoform의 발현변화를 보았다. BC3H-1 세포가 분화되면서 인슐린에 의한 glucose 흡수가 증가하였으며 또한 [ $^3\text{H}$ ] ouabain-binding site이 5배로 증가하였음을 관찰하였다. 이는 근육세포로 되면서 ouabain에 대해 높은 친화력을 갖고 있는 (Na,K)ATPase  $\alpha_2$  isoform이 표현 증대된다는 사실을 암시하며 호르몬에 대해 예민한  $\alpha_2$  isoform이 있음으로써 근육 세포막전압 유지에 특수기능을 맡으리라고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(BSRI-96-3442)와 이화여자대학교 약학연구소 지원에 의하여 연구되었기에 감사드리는 바입니다.

## 문헌

- 1) Lingrel, J. B., Orlowski, J., Shull, M. M., and Price, E. M. : Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **38**, 89 (1990).
- 2) Renaud, K. J., Inman, E. M., and Fambrough, D. M. : Cytoplasmic and transmembrane domain deletions of Na,K-ATPase  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **266**, 20491 (1991).
- 3) Sweadner, K. J. : Isozymes of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Bioch. Biophys. Acta* **988**, 185 (1989).
- 4) Noguchi, S., Mishina, M., Kawamura, M., and

- Numa, S. : Expression of functional (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase from cloned cDNAs. *FEBS Lett.* **225**, 27 (1987).
- 5) Lytton, J., Lin, J. C., and Guidotti, G. : Identification of two molecular forms of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 1177 (1985).
- 6) Patrick, J., McMillian, J., Wolfson, H., and O'Brien, J. C. : Acetylcholine receptor metabolism in a nonfusing muscle cell line. *J. Biol. Chem.* **252**, 2143 (1977).
- 7) Sine, S., and Taylor, P. : Functional consequences of agonist-mediated state transitions in the cholinergic receptor. *J. Biol. Chem.* **254**, 3315 (1979).
- 8) Takeyasu, K., Tamkun, M. M., Siegel, N. R., and Fambrough, D. M. : Expression of hybrid (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase molecules after transfection of mouse Ltk-cells with DNA encoding the  $\beta$  subunit of an avian brain sodium pump. *J. Biol. Chem.* **262**, 107733 (1987).
- 9) Norgaard, A., Kjeldsen, K., Hansen, O., and Clausen, T. : A simple and rapid method for the determination of the number of [<sup>3</sup>H] ouabain binding sites in biopsies of skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 319 (1983).
- 10) Standaert, M. L., Schimmel, S. D., and Pollet, R. J. : The development of insulin receptors and responses in the differentiating nonfusing muscle cell line BC3H-1. *J. Biol. Chem.* **259**, 2337 (1984).
- 11) Kjeldsen, K., Norgaard, A., and Clausen, T. : Age-dependent changes in the number of [<sup>3</sup>H] ouabain-binding sites in rat soleus muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **686**, 253 (1982).
- 12) Orłowski, J. and Lingrel, J. B. : Differential expression of the Na,K-ATPase  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunit genes in a murine myogenic cell line. *J. Biol. Chem.* **263**, 17817 (1988).
- 13) Guidotti, G. : Regulation of the (Na,K)-pump. *Chemstracts-Biochem. and Mol. Biol.* **1**, 447 (1990).