

## C2C12 근육아세포에서 trichostatin A에 의한 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성과 근육발생에 미치는 영향

김경창 · 신혜자<sup>1</sup> · 임운기\*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과  
<sup>1</sup>동서대학교 응용공학부 환경공학전공

## Effect of trichostatin A on NF- $\kappa$ B DNA binding activity and myogenesis in C2C12 skeletal muscle precursor cell

Kyung Chang Kim, Hae-Ja Shin<sup>1</sup> and Woon Ki Lim\*

*Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*  
*<sup>1</sup>Environmental Engineering Major, Division of Applied Engineering, Dongseo University, Pusan, 617-716, Korea*

### Abstract

The differentiation of skeletal muscle precursor cells in culture is marked by the transcriptional activation of muscle-specific genes and the morphological differentiation of myoblast into multinucleate myotube. In this study, we examined the effect of TSA (Trichostatin A) on NF- $\kappa$ B DNA binding activity and muscle cell fusion in the process of myogenesis. Under TSA treatment, C2C12 myoblast could not fuse to myotube and its NF- $\kappa$ B DNA binding activity was also blocked. To investigate whether these phenomenons were affected by TSA in direct or not, differentiation media (DM) used to differentiate cells without TSA was concentrated and added to C2C12 myoblast with TSA simultaneously. C2C12 myoblast was fused to myotube and NF- $\kappa$ B DNA binding activity was recovered. These results suggest that TSA affects on the differentiation of myoblast, perhaps through several factors, by inhibiting myoblast fusion and blocking NF- $\kappa$ B DNA binding activity.

**Key words** – myogenesis, TSA, NF- $\kappa$ B, C2C12 myoblast

### 서 론

근육 형성과정은 세포 내외 분자적 단계에서 다양한 변화와 더불어 극적인 형태변화를 동반하므로 골격근은 배 발생 과정 중에서 세포의 운명과 분화에 관한 기작을 설명하는데 유용한 조직으로 사용되어져 왔다[16]. 골격근 세포의 분

화는 매우 질서 정연한 다단계의 과정을 거쳐서 형성되어진다. 즉, 근육형성 전사인자들의 발현, 세포주기의 억제, 근육-특이 단백질의 발현, 그리고 세포간의 융합을 통한 다핵의 근육소관을 형성함으로 이루어진다[7]. 그 중 세포주기억제의 예로서 TSA (Trichostatin A)는 histone deacetylase (HDAC) 저해제로 잠재적으로 성장을 억제하고 분화를 유도하며 형질 전환된 세포에서는 죽음을 유도하며 핵 내의 히스톤 단백질을 아세틸화 함으로 여러 가지 전사를 조절한다고 알려져 있다[1,12].

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : (051) 510-2289, Fax : (051) 513-9258  
E-mail : wklm@hywon.pusan.ac.kr

Histone deacetylase는 크게 두 가지로 분류되며 첫 번째는 HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8로 다양한 세포에서 발현되며 두 번째는 HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7로 심장, 뇌, 골격근에 주로 중요하게 발현된다[13,18]. 특히, HDAC5는 미분화된 근육아세포의 핵내에 위치해서 MEF2와 결합함으로써 근육형성과정을 억제하고 있다가 분화가 유도되면 calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)에 의해서 HDAC5의 amino-terminal 두 곳이 인산화 되고 이것을 intracellular chaperone protein 14-3-3이 인지하여 HDAC5와 결합한 후 세포질로 이동하게 됨으로써 분화가 유도된다[14].

NF- $\kappa$ B는 면역과 염증반응에 관련된 유전자들을 조절하는 Rel 전사인자 family에 속한다[3]. 대부분의 세포에서 NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B와 복합체를 이루어 불활성상태로 세포질에 존재한다[2,15]. 이것에 자극이 주어지면 I $\kappa$ B가 인산화 되고 이것은 26S proteasome 복합체에 의해서 분해되어지고 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 전사를 조절하게 된다[4,5]. 미분화된 C2C12 myoblast에서 NF- $\kappa$ B는 활성을 갖게되어 근육형성 과정 전사인자인 MyoD의 활성을 강력하게 억제시킴으로써 분화과정을 억제한다[6]. 그러나 분화가 진행되는 동안 이 활성화는 감소하게 된다. HDAC에 의한 NF- $\kappa$ B의 조절은 개구리의 중배엽 유도에 있어 NF- $\kappa$ B를 활성화시킴으로써 중요한 신호전달로 작용하는 FGF (fibroblast growth factor) signaling을 매개한다는 보고가 있으며[17], SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors)와 mSin3과 결합체를 이루어 NF- $\kappa$ B의 transactivation을 억제한다는 보고가 있지만[10], 근육세포주에서 TSA에 의한 NF- $\kappa$ B의 조절은 거의 보고된 바가 없다. 이에 본 연구는 TSA에 의한 근육형성과정과 NF- $\kappa$ B의 조절에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

C2C12 myoblast를 사용하였으며 성장을 위해서는 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하고 있는 DMEM으로 배양했으며 80~90% 정도의 밀도가 되었을 때 분화를 유도하기 위해서 2% horse serum을 함유하고 있는 DMEM으로 교환하여 주었다. 그런 후 이틀에 한 번씩 배지를 교환하였다.

### TSA처리

TSA (Trichostatin A)는 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹였으며 -20°C에 보관하였다. 처리는 분화 배지로 교환할 때 5 ng/ml이 되도록 넣어주었으며 배지를 교환할 때마다 같이 처리하였다.

### 배지농축

분화배지로 세포를 키운 후 이틀간격으로 배지를 모아 이것을 ultrafree-15 centrifugal filter device (Millipore)에 넣고 지침서에 따라 배지를 농축하였다.

### Cell fusion의 측정

배양된 세포를 차가운 PBS로 두 번 씻은 후 methanol로 5분간 고정화 시켜주고 hematoxylin으로 5분간 염색하였다. 그런 후 물로 씻어주었다. 핵은 광학현미경으로 계수하였다. 근육소관내에 핵의 수가 최소 3개 이상일 때 융합이 되었다고 생각하였으며 각각의 값은 최소 10 번 이상의 무작위적인 선택영역에서 전체수가 300이상인 것만 계수하여 평균을 내었다.

### Nuclear extracts의 준비

세포를 모아 차가운 PBS로 씻고 50  $\mu$ l의 lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol[DTT], 0.5 mM PMSF)로 섞은 후 10분 동안 얼음에 꽂아두었다. 10분 뒤에 0.05% Nonidet P40을 넣은 lysis buffer를 30  $\mu$ l 넣어서 섞어주고 vortex기계로 10초간 3번 강력하게 섞어주었다. 핵을 모으기 위해서 10분간 2500  $\times$ g로 원심분리하였다. 상등액은 버리고 nuclear pellet을 40  $\mu$ l의 차가운 nuclear-extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol (v/v), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)을 넣고 30분간 얼음에 꽂아두었으며 중간에 한번씩 섞어주었다. 이것을 다시 24000  $\times$ g, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 상등액만 모아서 buffer D (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol, pH 7.5)로 1:2가 되도록 희석하였다. 단백질 정량을 하고 이것을 바로 사용하거나 나중에 사용하기 위해서는 -80°C에 보관하였다.

### Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Nuclear extract 5  $\mu$ g을 <sup>32</sup>P-end labeled 22-mer double-

stranded NF- $\kappa$ B oligonucleotide (5-AGTTGAGGGGATT-TTCCCAGGC-3) 17.5 fmol과 함께 실온에서 제작사(Promega)의 지침서에 준하여 20분간 반응시켰다. 전기영동을 한 후 젤을 말려서 X-ray film에 하루나 이틀정도 -80°C에서 노출시켰다.

### 결과 및 고찰

#### TSA가 C2C12 myoblast fusion에 미치는 영향

TSA가 C2C12 myoblast 융합에 미치는 영향을 알아보기 위해서 TSA를 DM (분화배지) 상태에 있는 세포에 5 ng/ml을 처리하였다. DM상태에 TSA를 처리한 후 이틀째부터 대조군은 융합을 보이기 시작하였고 TSA가 처리된 세포에서는 융합이 관찰되지 않았다. TSA로 처리한 후 4일이 되었을 때 대조군은 다핵의 근육소관을 형성하였고 TSA가 처리된 세포에서는 여전히 융합이 형성되지 못하였다. TSA에 대한 가역성을 알아보기 위해서 TSA로 4일을 처리한 후 TSA를 제거하고 DM으로만 4일을 다시 배양하였다. 이때 C2C12 myoblast는 다시 융합을 형성하였다(Fig. 1). 구체적으로 융합의 상태를 파악하기 위해서 융합 index를 구해 보았다(Fig. 2). 융합 index를 통하여 TSA가 제거되었을 때 가역성은 대조군과 유사하게 시간이 지남에 따라 증가하였다. 이 결과는 TSA가 C2C12 myoblast의 융합에 억제효과를 나타내고 있으며 가역적인 성질로 작용하고 있음을 보여주고 있다.

#### 분화진행과정에 있어 NF- $\kappa$ B의 조절

먼저, 분화가 진행될 때의 NF- $\kappa$ B가 조절되는지를 알아보았다. 분화가 유도되기 전 즉, GM (성장배지)에서 자란 세포인 경우 NF- $\kappa$ B DNA 결합활성이 높게 나타났으나 DM (분화배지)에서 분화가 되면 NF- $\kappa$ B 활성이 현저하게 떨어졌으며 4일째에는 약하게 나타났다[6]. 하지만 성장배지에 비하여 여전히 활성은 감소되어 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 결과는 Guttridge (1999)[13]의 결과와 비슷한 양상을 보여주고 있다. 이것은 성장중인 근육아세포에서는 NF- $\kappa$ B 활성이 근육분화를 억제하기 위해서 필요하고 분화 과정에서도 완전히 없어지지 않고 최소의 활성이 유지됨을 보여준다[16]. 이 억제효과는 NF- $\kappa$ B에 의한 MyoD의 활성억제에 따른 것으로 보고되어 있다[17,18].

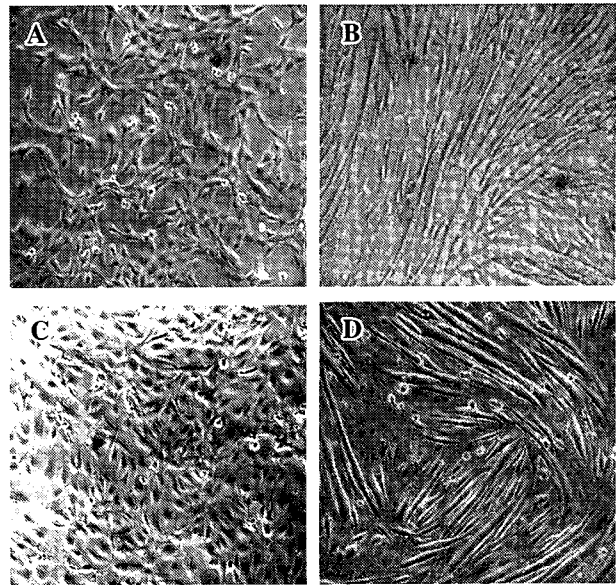


Fig. 1. Effect of TSA on myoblast fusion. Phase-contrast micrographs were taken for C2C12 myoblasts grown for 2 days in GM (A) and 4 days in DM without TSA (B) or with TSA (C).

To examine the reversible effect of TSA on myoblast fusion, cells were grown for 4 days in DM with TSA, and then for 4 days in DM without TSA (D). cells were stained with hematoxylin to score fused cells.

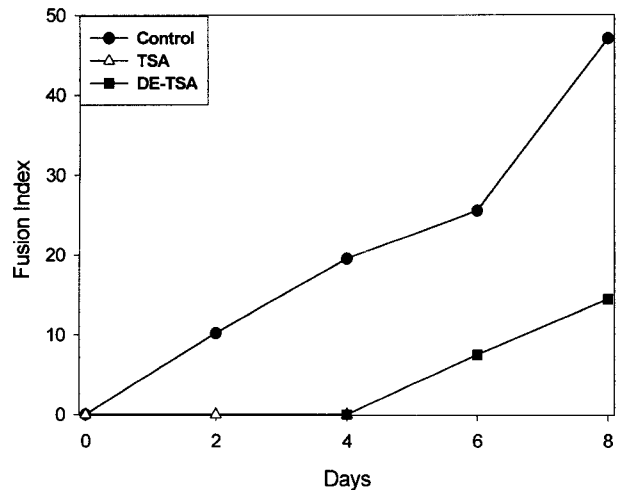


Fig. 2. Fusion index. Cells were stained with hematoxylin to score fused cells.

TSA inhibits myoblast fusion reversibly.

#### TSA가 NF- $\kappa$ B에 미치는 영향

TSA에 의한 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성을 알아보기 위해서

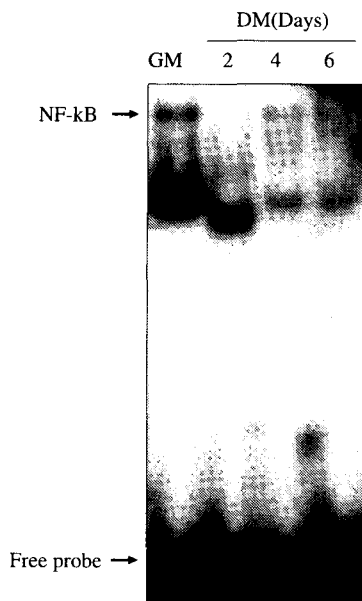


Fig. 3. NF- $\kappa$ B binding activity during myogenic differentiation.

Proliferating C2C12 myoblasts (GM) were induced to differentiate (DM), and nuclear extracts were prepared and EMSA was performed with a radiolabeled oligonucleotide containing an NF- $\kappa$ B binding site at the indicated times.

EMSA를 실시하였다. 대조군로 NO TSA는 TSA를 처리하지 않고 4일간 배양하였고, TSA는 TSA를 5 ng/ml로 처리하여 4일간 배양하였다. 그리고 DE-TSA는 TSA를 5 ng/ml로 처리하여 4일간 배양한 후 다시 TSA를 제거하고 분화배지만 처리하여 배양하였다. TSA를 처리하지 않은 대조군은 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성을 나타내었고 TSA를 처리한 것은 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성이 거의 사라졌으며 DE-TSA는 분화가 유도되면서 대조군과 동일하게 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이 결과는 TSA가 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성을 억제함을 보여주고 있다. NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성 조절에 HDAC가 중요한 요인으로 작용하므로[14], HDAC inhibitor인 TSA에 의한 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성의 억제는 HDAC inhibition에 의한 간접적인 효과일 것으로 시사하며, myogenesis를 진행하기 위해서는 최소한의 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성이 필요할 것으로 사료된다.

농축분화배지(CM)에 의한 융합과 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성의 회복

TSA에 의한 융합 억제현상이 직접적인 것인지 알아보기

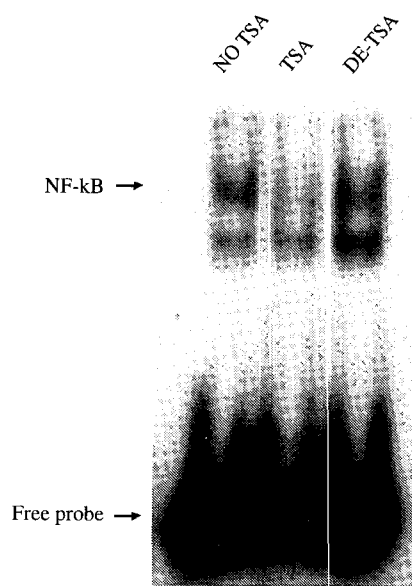


Fig. 4. Effect of TSA on NF- $\kappa$ B binding activity. C2C12 myoblasts were allowed to differentiate for 4 days in the absence or presence of TSA (5ng/ml).

To examine the reversible effect of TSA, cells were allowed to differentiate for 4 days in DM with TSA, and then followed by differentiation for 4 days in DM without TSA. Nuclear extracts were prepared and analyzed by electrophoretic mobility shift assay.

위해서 TSA를 처리하지 않은 DM상태의 배지를 농축하여 세포에 첨가하였다. 각각의 세포들은 DM으로 교환될 때에 TSA와 농축분화배지를 처리하였다. 분화배지 상태에 있는 세포에 농축분화배지만 처리한 것은 대조군과 비슷한 경향으로 융합이 일어났으며 TSA만 처리한 것은 여전히 융합을 형성하지 못하였고 TSA와 CM을 동시에 처리한 것은 2일 정도가 지나면서 약하게 융합이 형성되기 시작하였다(Fig. 5). 이 상태에서 세포들의 nuclear extracts를 추출하여 EMSA를 실시하였다. TSA만 처리한 것은 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성이 억제되었고 TSA와 CM을 동시에 처리한 것에서는 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성이 회복되었다(Fig. 6). 이러한 결과는 TSA가 융합현상과 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성을 억제함을 보여주며 또한 DM 배지에 존재하는 정상적인 융합 관련 인자들에 의해 회복됨을 시사하고 있다. 그러나 TSA가 융합현상에 관련된 많은 인자 중 어떤 것을 직접적으로 방해하는지에 대한 연구는 지속적인 과제로 남아 있다.

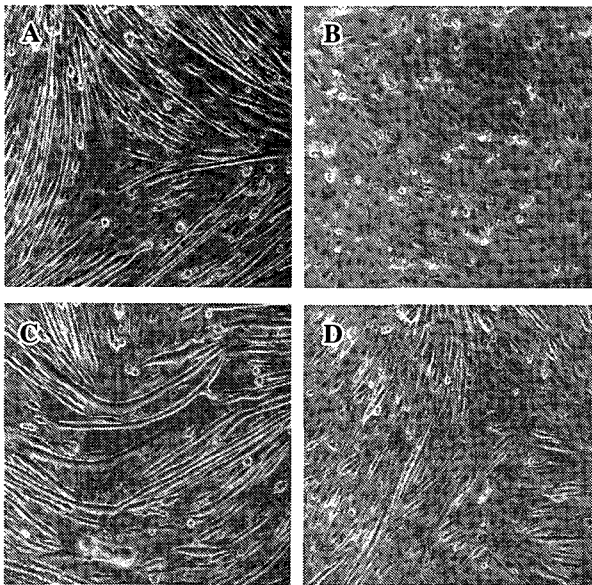


Fig. 5. Recovery of fusion by CM (concentrated media). C2C12 myoblasts were allowed to differentiate in DM for 4 days in the absence (A) or presence (B) of TSA. Differentiation media (DM) used to differentiate cell without TSA was concentrated and added to C2C12 myoblast in DM for 4 days without (C) or with (D) TSA simultaneously.

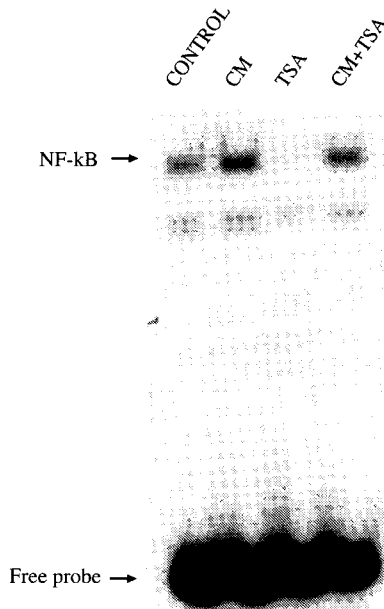


Fig. 6. Recovery of NF- $\kappa$ B binding activity by CM (concentrated media). Total nuclear extracts from myoblasts differentiated for 4 days in the absence or presence of TSA without or with CM were incubated with  $^{32}$ P-labeled NF- $\kappa$ B oligonucleotide and analyzed by electrophoretic mobility shift assay.

## 요 약

골격근 세포의 분화는 근육특이 유전자들의 전사적 활성화와 근육아세포에서 근육소관으로의 형태적 분화로 특징지어진다. 본 연구에서는 TSA가 근육형성의 일련의 과정에서 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성화와 융합에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군과 비교해서 TSA가 처리된 C2C12 myoblast는 융합하여 근육소관을 형성할 수 없었으며 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성화는 억제되었다. 이런 현상들이 TSA에 의한 직접적인 것인지 알아보기 위해서 TSA가 처리되지 않고 분화를 유도하기 위해서 사용된 배지를 농축하여 C2C12 myoblast에 TSA와 함께 동시에 처리하였다. 그 결과 세포는 융합하여 근육소관을 형성하였으며 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성화가 회복되었다. 이러한 결과는 TSA가 아마도 여러 관련 인자들을 통해 myoblast의 융합과 NF- $\kappa$ B DNA 결합 활성을 억제함으로써 근육형성과정에 영향을 미침을 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. Allfrey, V. G. 1977. Post synthetic modifications of histone: a mechanism for the control of chromosome structure by the modulation of histones-DNA interactions, pp.167-191. In Li, H. J. and Eckhardt, R. A. (eds.), *Chromatin and chromosome structure*. Academic Press, New York, N.Y.
2. Baeuerle, P. A. and D. Baltimore. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20.
3. Baldwin, A. S, Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-683.
4. DiDonato, J. A., M. Hayakawa, D. M. Rothwarf, E. Zandi, and M. Karin. 1997. A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* **388**, 548-554.
5. Finco, T. S. and A. S. Baldwin. 1995. Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* **3**, 263-272.
6. Guttridge, D. C., C. Albanese, J. Y. Reuther, R. G. Pestell and A.S, Jr. Baldwin. 1999. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5785-5799.
7. Kaliman, P., J. Canicio, X. Testar, M. Palacin and A.

- Zorzano. 1999. Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor-kappaB and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 17437-17444.
8. Konieczny, S. F., B. L. Drobos, S. L. Menke and E. J. Taparowsky. 1989. Inhibition of myogenic differentiation by the H-ras oncogene is associated with the down regulation of the MyoD1 gene. *Oncogene* **4**, 473-481.
  9. Lassar, A. B., M. J. Thayer, R. W. Overell and H. Weintraub. 1989. Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1. *Cell* **58**, 659-667.
  10. Lee S. K., J. H. Kim, Y. C. Lee, J. Cheong and J. W. Lee. 2000. Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 12470-12474.
  11. Lehtinen, S. K, P. Rakhila, M. Helenius, P. Korhonen, and A. Salminen. 1996. Down-regulation of transcription factors AP-1, Sp-1, and NF-kappa B precedes myocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 36-43.
  12. Marks, P. A., V. M. Richon and R. A. Rifkind. 2000. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* **92**, 1210-1216. Review.
  13. McKinsey, T. A., C. L. Zhang, J. Lu, and E. N. Olson. 2000. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106-111.
  14. McKinsey, T. A., C. L. Zhang, and E. N. Olson. 2000. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 14400-14405.
  15. Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwartz, D. Van Antwerp, and S. Miyamoto. 1995. Rel/NF-B/IB family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* **9**, 2723-2735.
  16. Wakelam, M. J. 1985. The fusion of myoblasts. *Biochem. J.* **228**, 1-12.
  17. Xu, R. H., Y. Peng, J. Fan, D. H. Yan, S. Yamagoe, G. Princler, D. Sredni, K. Ozato, and H. F. Kung. 2000. Histone acetylation is a checkpoint in FGF-stimulated mesoderm induction. *Dev. dynamics.* **218**, 628-635.
  18. Zhang, C. L., T. A. McKinsey, and E. N. Olson. 2001. The transcriptional corepressor MITR is a signal-responsive inhibitor of myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 7354-7359.

(Received December 17, 2001; Accepted January 24, 2002)