

## 1,25-dihydroxycholecalciferol 이 Sol 8 세포내 calpain계 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향

최 혁<sup>1</sup> · 명규호<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>국립축산과학원 영양생리팀, <sup>2</sup>전남대학교 동물자원학부

### The effect of 1,25-dihydroxy cholecalciferol on mRNA and protein expression of calpain family in Sol 8 cell line

Hyuck Choi<sup>1</sup> and Kyuho Myung<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Animal Nutrition & Physiology Team, National Institute of Animal Science,  
Rural Development Administration, Wanju-gun 55365, Korea*

<sup>2</sup>*Department of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea*

\*Corresponding author: khmyung@jnu.ac.kr

#### ABSTRACT

Tenderness has been identified as the single most important palatability factor affecting consumer satisfaction of beef meat. A couple of recent methods to activate calpain-induced tenderization has been the oral supplementation of vitamin D<sub>3</sub> or its metabolites. To improve understanding of the regulation of calpain protease system in muscle, the effects of 1,25-Dihydroxy colecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) on calpain protease enzymes were studied using Sol 8 cell line. In criteria of cell number and proliferation, a concentration of 100 nM 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> most inhibited the myogenic differentiation of Sol 8 cells. 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> increased mRNA gene expressions of u-calpain while that of m-calpain and calpastatin showed ( $p < 0.05$ ) the opposite expression pattern. The amount of u-calpain and m-calpain protein were the highest ( $p < 0.01$ ) at 4h and 2h incubation with 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, respectively, whereas calpastatin level was significantly decreased. There was no changes in calcium uptake into inner cells by 100 nM 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> in spite of significant ( $p < 0.05$ ) up-regulation in vitamin D receptor gene expression. The results indicated that the calpain protease system of Sol 8 cell was greatly influenced by 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> without alteration of calcium concentration of inner cell. Therefore, the role of vitamin D receptor remains to be further elucidated later.

**Additional key words:** 1,25-dihydroxy cholecalciferol, Sol 8 cell, calpain, vitamin D receptor

쇠고기의 맛은 연도, 향미 그리고 다즙성으로 결정되며 그밖에 육색과 지방색은 식욕과 구매력을 유발한다. 이중 연도는 소비자들이 고기를 선택하는데 있어 가장 중요한 요소로 작용 한다(Morgan 등, 1991; Cho 등, 2008). 이러한 쇠고기의 연도는 월령에 의해 크게 변하지 않으나 근내지방 증가에 따라 연도 또한 증가하고 비육이 불충분할 경우에는 조직감의 감소로 연도는 저하된다. 국내 한우 암소의 비육은 저 산차인 2~3산차 때 실시하여 시장에 출하되는데 주된 요인으로는 송아지 가격 하락뿐만 아니라, 고 산차 노페우 비육 출하 시 축산물등급판정 기준에 의한 성숙도 증가 및 조직감 감소로 인한 등급저하에 따른 경제적 손실 때문이다. 이러한 이유로 쇠고기 연도 개선을 위해 사양학, 영양학, 육종 및 번식학 차원에서 많은 연구와 노력을 하고 있다. 단백질 분해효소의 일종인 calpain의 활성화 유무는 고기 연도에 크게 관여한다고 알려져 있다(Koohmaraie, 1992). 이러한 calpain계 효소의 활성화를 위해 도축 직전 cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>)의 추가 급여는 도축 후 도체 내 유리 칼슘 함량 증가와 calpain계 효소 활성 증가를 통해 근육 단백질의 효율적인 분해로 고기의 연도를 향상시켰다는 여러 보고가 있다 (Montgomery 등, 2002; Swanek 등, 1999). 이와 같은 cholecalciferol의 추가 급여 사양은 고 산차 노페우 고기의 연도를 향상시켜, 저산차 가임 암소를 고 산차 번식으로 사양 하도록 유도함으로써 1) 안정적 가임 한우두수 유지, 2) 한우자원의 효율적 생산, 3) 한우 사양환경 개선 및 복지 증진에 크게 기여 할 수 있으리라 생각되며, 이는 또한 한우 거세우, 낙농비육우 및 노페우에도 공히 적용할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 cholecalciferol이 근육내 calpain계 효소의 활성화도에 미치는 영향에 관한 기초연구로서 생쥐 다리 근아세포인 Sol 8 세포를 이용해 1,25-dihydroxy cholecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>)을 농도별 및 시간별로 처리 하여 세포 수, 활성도의 변화, u, m-calpain, 그리고 calpastatin의 mRNA 및 단백질의 변화를 조사하여 골격근 내 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>가 calpain계 효소에

미치는 효과를 구명하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

Sol 8 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC; CRL-2174) 에서 구입하여 사용하였다. Sol 8 세포배양은 25cm<sup>3</sup> flask 에서 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지에 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), 4.5g/L glucose 와 20% 의 fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)을 혼합하여 사용하였으며, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. Sol 8 세포가 100% confluence 상태가 되면 DMEM 배지에 2% horse serum (Invitrogen) 이 혼합된 분화배지로 교체한 후 myotube가될 때까지 6일 간 분화 시킨 후 실험에 사용하였다.

### 세포 수 및 세포 활성화 측정

세포 수 와 활성화 측정을 위해 96 well plate에 Sol 8 세포를 각 well 당 1×10<sup>3</sup>개 들어가도록 한 다음, 100% confluence 될 때 까지 배양 후, 배지를 버리고 분화 배지로 교체 후 6일간 분화 시킨 다음 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>를 0, 10, 50, 100, 200 그리고 250 nM 등 6 수준으로 5반복씩 8시간 처리한 후 측정에 사용하였다. 세포 수는 WST-1 cell proliferation (Roche, Mannheim, Germany, Cat. No.1644 807) 시약을 well (100 ul 분화배지) 당 10 ul씩 첨가한 후, 배양기에서 2시간 배양 후, 1 분간 교반기에서 혼합한 다음 reference를 600 nm 파장으로 하고 측정 파장을 420~480 nm로 하여 ELISA reader (Anthos labtec instruments. Austria) 로 측정하였다. 세포 활성화도는 BrdU (Roche, Cat. No.1647 229) 시약을 well (100 ul 분화배지) 당 10 ul씩 첨가한 후, 배양기에서 2시간 반응한 다음 배지를 버리고 고정액 FixDenat (Roche)를 well 당 200 ul씩 가한 후 15~25 °C에서 90분간 고정 한 후 고정액을 버리고 세척액으로 3회 세척 후, well 당 100 ul 기질액을 가한 후 10 분간 상온에서 반응 후 25 ul의 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 반응을

정지시켰다. 이후 reference 파장을 690 nm로 하고 측정 파장을 450 nm로 하여 ELISA reader로 세포 활성도를 측정하였다.

#### Total RNA 추출

Total RNA추출은 TRIzol용액(Invitrogen)을 이용한 phenol-chloroform 기법을 사용하였다. Total RNA 추출을 위해 6 well plate에 Sol 8 세포를 각 well 당  $1 \times 10^5$ 개 들어가도록 한 다음, 성장 분화 시킨 Sol 8 세포에 상기의 세포 수 및 활성도의 변화 시험 시 가장 이상적인  $1,25\text{-(OH)}_2 \text{D}_3$  농도에서 0, 0.5, 1, 2, 4 그리고 8 시간 3반복 처리 후 배지를 버리고 TRIzol 용액을 well당 각 1 ml 씩 분주하여 세포를 얻은 후 균질화 한 다음, 200  $\mu\text{l}$ 의 chloroform을 첨가하여 섞어준 뒤 4  $^\circ\text{C}$ , 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리를 하여 상층액을 분리한 다음 isopropanol을 1:1 비율로 섞어 준 뒤, 4  $^\circ\text{C}$ , 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 마지막으로 생성된 pellet을 1 ml 75% EtOH을 이용 세척 후, 4  $^\circ\text{C}$ , 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 다음 상온에서 건조 시킨 뒤

RNAse free water 30  $\mu\text{l}$ 에 녹였다. Total-RNA를 추출한 후 UV 흡광도 260 nm에서 RNA 농도 와 1% agarose gel 상에서 RNA integrity를 확인 후  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관 추후 분석에 사용하였다.

#### Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR)

Calpain계 효소와 vitamin D receptor의 mRNA 발현을 측정하기 위하여 double-stranded DNA dye인 2 $\times$ QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 real time RT-PCR machine (Corbat Research, Australia) 으로 quantitative PCR을 실시하였다. 각각의 primer는 Gene Runner Version 3.04 software(Hasting Software, Inc.)를 이용하여 Tm 값 58-65  $^\circ\text{C}$ , 두(forward, reverse) primer의 Tm 차이 2  $^\circ\text{C}$ 이하, GC 비율 50~60%, 길이 120-150bp가 되도록 Table 1과 같이 디자인 하여 Bioneer사(Daeduk, Daejeon, Korea)에 의뢰 제작 하여 사용 하였다. 이후 94  $^\circ\text{C}$  15 초 그리고 55  $^\circ\text{C}$ 에서 30 초 40 cycle을 측정하여 CT 값을 얻었고, mRNA 발현양은 cyclophilin A 의 CT 값으로

**Table 1.** Forward and reverse primers for RT-qPCR for mouse  $\mu$ -calpain, m-calpain, calpastatin, vitamin D receptor and cyclophilin mRNA.

Genes	Primer
$\mu$ -calpain	
Forward	5'-AGCGCCACCGAACTCATGAATATC-3'
Reverse	5'-TGGTGTGCTATCCATGACAGCC-3'
m-calpain	
Forward	5'-GTATGTCCTCGTTCCCTCCACCTTC-3'
Reverse	5'-TCAATGTTGGCTCGATCTCGTC-3'
calpastatin	
Forward	5'-CCTCCATGTGCAGTATACGGTCAGC-3'
Reverse	5'-GTTCTGGATCTGCTTCCCTTGTC-3'
Vitamin D receptor	
Forward	5'-ACAGATGAGGAGGTGCAGCGTAAG-3'
Reverse	5'-CAGGATGGCGATAATGTGCTGTTG-3'
Cyclophilin	
Forward	5'-CAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTG-3'
Reverse	5'-AGATGCCAGGACCCGTATGCTTTAG-3'

상대 정량하여 보정하였다.

#### Western blotting

Calpain계 효소의 단백질 발현 양을 확인하기 위해 12 well plate에 Sol 8 세포를 각 well 당  $1 \times 10^4$  개 들어가도록 한 다음, 성장 분화 시킨 Sol 8 세포에 상기의 세포 수 및 활성도의 변화 시험 시 가장 이상적인  $1,25-(OH)_2 D_3$  농도에서 0, 0.5, 1, 2, 4 그리고 8 시간 3반복 처리 후 배지를 버리고 cell lysis buffer (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 처리하여 세포를 얻어낸 후 BCA assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 정량된 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 150 v, 1 시간 동안 전기영동 한 뒤, 0.45  $\mu$ m pore nitrocellulose membrane (Whatman Protran, Dassel, Germany)으로 단백질을 옮겼다(12 v, 1 시간). 그 후, Ponceau S로 모든 lane의 동량의 단백질을 확인한 후 각각의 membrane을 5% skim milk TBST (0.1% Tween-20 Tris-buffered saline)로 1 시간 blocking 한 뒤 rabbit anti-u-calpain (Abcam ab39171), rabbit anti-m-calpain (Abcam 28259) 그리고 mouse anti-calpastain (Takara, Japan, M045) 등 각각의 1차 항체를 5% skim milk TBST에 희석하여 4  $^{\circ}$ C 냉장실 안의 교반기에서 12 시간 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 membrane을 TBST 완충액으로 세척 하였다. 세척한 membrane을 2차 항체(anti-rabbit or mouse IgG horse-radish peroxidase-linked secondary antibody) 1:5,000 (Cell signaling, Beverly, MA, USA)을 희석한 용액에 넣고 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBST buffer로 세척한 후 West-zol (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea) A와 B를 1:1 비율로 튜브에 넣어 시약제조 하여 membrane에 도포 후 약 1~2분후 membrane에서 reagent를 제거하고 암실상자(Intelling Dark box II, Fuji film, Tokyo, Japan)에서 영상분석 프로그램(Phospho image analyzer programe, Fuji film, Tokyo, Japan)으로 단백질 양을 측정하였다.

#### Sol 8 세포의 칼슘 농도 분석

세포내 칼슘 uptake양을 확인하기 위해 6 well plate위에 cover glass를 놓고 Sol 8 세포를 각 well 당  $1 \times 10^5$  개 들어가도록 한 다음, Sol 8세포가 50-70% confluence 되게 배양 후 분화배지를 교환하여 70% 분화 시킨 후 세척액으로 세척 하였다. 이후 칼슘 완충액에 100  $\mu$ l DMSO를 첨가하고 10  $\mu$ g 염색액(2 mM 칼슘, Fura2-AM; Invitrogen) 1 ml 를 첨가 후 1시간 상온에서 반응 하였으며, 칼슘 완충액으로 2회 세척한 후 상온에서 30분간 반응 후 FRET(Cooled CCD Camera system, Raytest. france)로 측정 하였다.

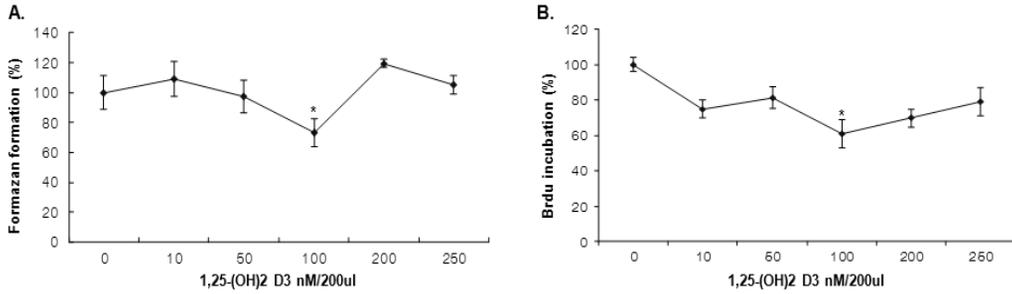
#### 통계처리

모든 자료의 통계분석은 SPSS 17.0프로그램 (2008)을 이용하여 대조구와 처리구간 통계 분석하여  $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$  수준에서 유의성 있는 그룹의 평균 값 간의 차이를 Dunnett's test로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

$1,25-(OH)_2 D_3$  처리에 따른 Sol 8 세포수와 활성도의 변화

$1,25-(OH)_2 D_3$  농도별 6 수준(0, 10, 50, 100, 200, 250 nM) 처리에 따른 Sol 8 세포 수와 활성도는 Fig. 1 A와 B에서 보는 바와 같이  $1,25-(OH)_2 D_3$ 를 100 nM 처리 하였을 때 가장 낮았고( $p < 0.05$ ), 200 nM 과 250 nM 처리 시 는 100 nM 처리 시 보다 오히려 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는  $1,25-(OH)_2 D_3$ 가 암세포 사멸을 유도 했다는 Sergeev (2012)의 보고 와 유사할 뿐만 아니라, 염증성 사이토카인(IL-6) 감소와 MDSC (myeloid-derived suppressor cell) 유입 증가를 통해 식도암을 억제했다는 연구결과와도 유사하다 (Chen 등, 2015). 그러나 한편으로는  $1,25-(OH)_2 D_3$ 는 IGF-1(insulin-like growth factor-1)의 발현 증가를 통해 근육분화를 유도 한다고 알려져 있다 (Naohiko 등, 2014). 따라서, 이상의 결과를 토대로



**Fig. 1.** The effect of 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> on cell viability and cell activity in Sol 8 cells. (A) Number of Sol 8 cells incubated with different concentrations of 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> by the formation of formazan after 4 h incubation with the tetrazolium salt WST-1, (B) 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation by Sol8 cells incubated with different concentrations of 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Asterisks(\*, \*\*) in each spot show statistical differences when compared with the value of the control group at  $p < 0.05$  level, respectively. Representative data are shown the means of 5 replicates ( $n = 5$ ).

이후 실험에서는 Sol 8 세포의 증식과 활성도에 가장 안정적인 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>의 처리 수준을 100 nM로 간주 하고 이 수준을 배지에 첨가하여 실험을 수행하였다.

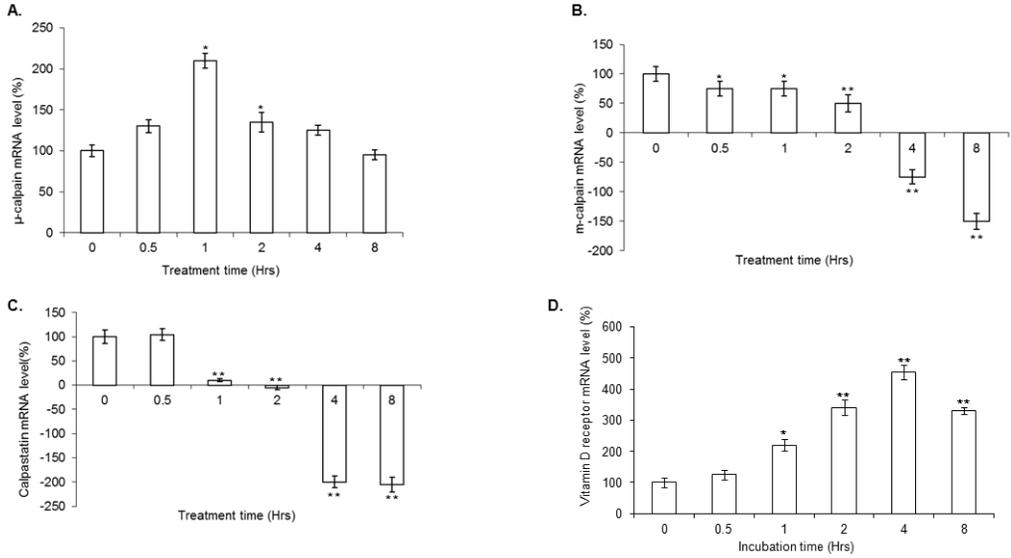
1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>가 Sol 8 세포내 calpain계 그리고 vitamin D receptor의 mRNA 발현에 미치는 영향

Sol 8 세포에 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>를 100 nM 처리 후 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 시간대별로 total RNA를 추출한 다음 real-time RT-PCR을 수행한 결과는 Fig. 2에서 보는바와 같다. 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 100 nM 처리 후 1시간에서 u-calpain의 mRNA의 발현은 가장 높았으나( $p < 0.05$ ), 시간이 지남에 따라 감소하였으며, m-calpain의 mRNA의 발현은 시간이 경과함에 따라 공히 유의적으로 감소하였다(Fig. 2 A와 B). 그러나 calpastatin mRNA의 발현은 Fig. 3 C에서 보는 바와 같이 처리 후 시간이 지남에 따라 유의적으로 감소하였다( $p < 0.01$ ). 이러한 본 실험의 결과는, 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>는 세포내 칼슘농도 증가를 통해 u 및 m-calpain 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 (Mathiasen 등, 2002), 이런 u-calpain의 발현 증가는 claspastatin 발현을 감소시킨다는 Murachi (1989)의 보고와 일치한다. 하지만 본 실험 결과에서는 m-calpain 발현이 오히려 감소하였는데, 이는 성우도축 21일전 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>를 각각 0.0, 0.5, 1.0,

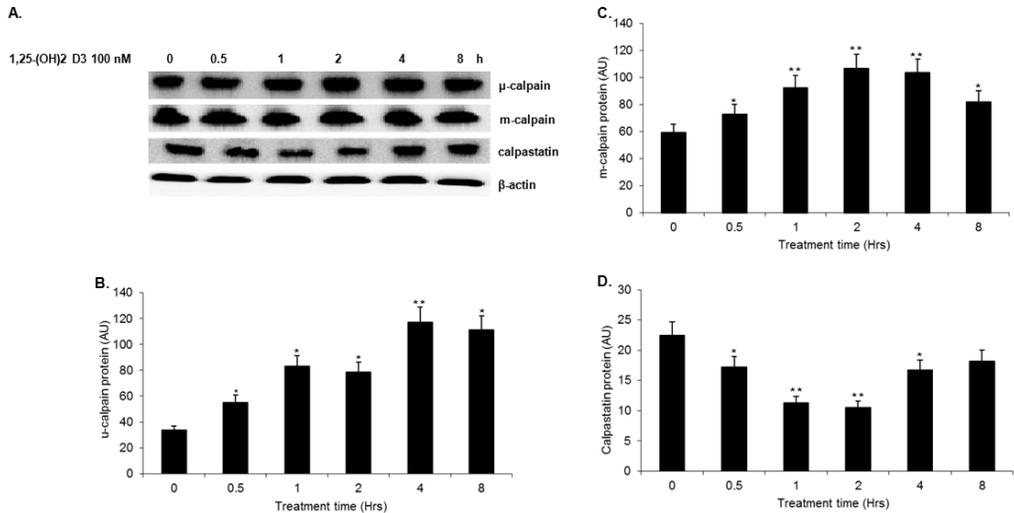
$5.0 \times 10^6$  IU(마리/일) 급여한 결과 m-calpain 활성도의 변화는 유의차가 없었다는 보고(Montgomery 등, 2004)와 유사한 경향 이라 간주 된다. Vitamin D receptor의 mRNA의 발현은 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 처리 후 시간이 지남에 따라 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가하였으며, 4시간째 가장 높게 ( $p < 0.01$ ) 나타났다(Fig. 2 D). 이러한 결과는 사람 골격근 세포에 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>와 vitamin D를 처리 하였을 때 Vitamin D receptor의 발현이 증가했다는 결과와 일치한다(Rachele 등, 2015). 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>는 핵내 Vitamin D receptor와 결합 후 RXR(retinoid x receptor)과 heterodimer를 이뤄 전사인자로서 작용을 수행 칼슘과 인산의 항상성을 조절하기(Ewans와 Mangelsorf, 2014) 때문인 것으로 생각된다. 즉 증가된 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>는 세포내 칼슘 유입을 높여 칼슘과 결합하여 활성을 띠는 u-calpain의 발현을 증가시켰을 것으로 사료된다.

1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>가 Sol 8 세포내 calpain계 단백질 생성량에 미치는 영향

Sol 8세포에 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>를 100 nM 처리 후 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 시간대별로 단백질을 추출한 다음 western blotting한 결과는 Fig. 3에서 보는바와 같다. u-calpain 단백질 발현량은 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 100 nM 처리 후 시간이 지남에 따라 공히 유의하게



**Fig. 2.** The effect of 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> on mRNA level of μ, m-calpain, calpastatin and vitamin D receptor in Sol 8 cells (A to D) by real time RT-PCR analysis. The data are expressed as a percentage of the value observed in the zero incubation time. Each bar was normalized by the quantity of cyclophilin from the same cells. Asterisks<sup>(\*, \*\*)</sup> in each spot show statistical differences when compared with the value of the control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  levels, respectively. Representative data are shown the means of 5 replicates (n = 5).



**Fig. 3.** The effect of 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> on protein contents of μ, m-calpain and calpastatin in Sol 8 cells(A). The Sol 8 cells were cultured with 100nM 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> for 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 h. Quantitative analysis of protein contents of μ, m-calpain and calpastatin (B to D). Each protein contents was normalized by the total amount of β-actin. Asterisks<sup>(\*, \*\*)</sup> in each spot show statistical differences when compared with the value of the control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  levels, respectively. Representative data are shown the means of 5 replicates (n = 5).

( $p < 0.01$ ) 증가하였으며, 4시간째 가장 높게 나타났다(Fig 3. A, B). m-calpain의 단백질 발현양 또한 처리 후 시간이 지남에 따라 유의하게( $p < 0.01$ ) 증가 했으며, 2시간에서 최대치를 보였다(Fig. 3A, C). 그러나 calpastatin의 단백질 발현양은 시간이 지남에 따라 감소( $p < 0.01$ ) 하는 경향을 보였고, 특히 1 시간 그리고 2시간째에 가장 낮게 나타났다(Fig. 3 A, D). u, m-calpain 단백질 발현양은 모두 시간이 경과함에 따라 공히 유의적으로 증가하였는데 이는 신장 세포(SK-RC-29)에 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>를 48시간 처리 시 u-calpain 발현이 1.5~3배 증가하였다는 보고와 일치하며(Ravid 등, 1994), u, m-calpain의 단백질 생성 양상은 clapastatin에 의해 억제되며(Murachi, 1989), calpastatin의 발현은 유전자 영양소에 의하여 조절된다는 연구결과와 일치한다(Geesink와 Koohmaraie, 1999; Helman 등, 2003). 이러한 실험결과는 앞서 u-calpain mRNA 발현양의 증가와 calpastatin mRNA 발현양의 감소와 일치하고 있어 골격근 세포내에서 u-calpain과 m-calpain은 서로 상보작용을 하고 clapastatin 과는 길항작용을 하고 있음을 다시 한 번 확인 시켜주는 결과 로 볼 수 있다. 결론적으로, 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>는 calpain계 여러 효소의 활성화에 주요한 영향을 미친 것으로 사료된다.

1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>가 Sol 8 세포내 칼슘 uptake에 미치는 영향

Sol 8 세포에 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>를 100 nM 처리

후 세포내 칼슘 농도에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Fig. 4에서 보는바와 같이 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>의 처리는 세포내 칼슘 농도에 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 골격근 세포의 근소포체 내 기초 칼슘 함량이 높아 이미 칼슘 포화상태가 되어있기 때문에 사료된다. 하지만 비육우에 cholecalciferol 대사물질 급여 시 혈청내의 칼슘농도가 증가하였고(Hollis 등, 1977; Carnagey 등, 2008), 5백만 IU 의 cholecalciferol을 도축 7일전 거세우 에 급여한 결과 골격 근육 내 칼슘 농도가 대조구보다 6.0ug/g 더 증가 하였다는(Swanek 등, 1999) 연구 결과들을 봤을 때 vitamin D<sub>3</sub> 또는 그 대사물질의 투여는 혈중 그리고 근육내 칼슘농도를 증가 시킬 수 있음을 시사한다. 하지만 예상과 다른 상기와 같은 상반된 실험 결과는 추후 실험을 통해 더욱 보완되어져 하리라고 생각된다.

## 요 약

본 연구는 근육내 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>가 calpain계 효소의 작용기전에 미치는 영향을 구명코자 골격근 세포의 일종인 Sol 8 세포주를 이용하여 실험을 실시하였다. 실험 결과 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 100 nM 처리 시 세포수와 활성도를 가장 낮았으며, 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 처리는 u, m-calpain의 mRNA와 단백질 발현을 증가 시키는 반면 calpastatin의 mRNA 및 단백질 발현은 감소시켰다. 이러한 결과는 세포내 vitamin D receptor의 발현 증가에 의한 것으로 사료되며,

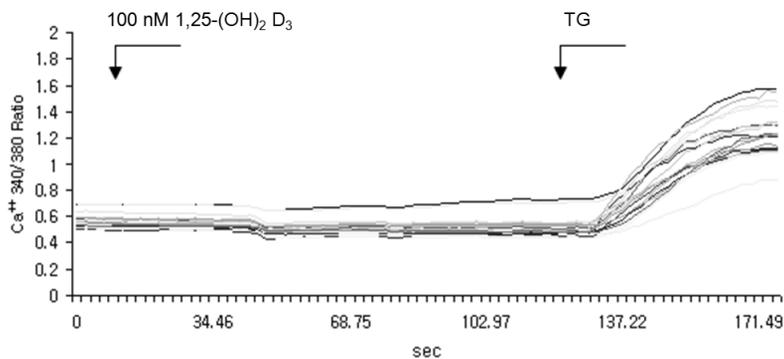


Fig. 4. Change of intracellular calcium concentration in Sol8 cells by adding 100 nM 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> on inverted microscope equipped for fluorescence digital ratiometric imaging.

이를 통한 세포내 칼슘 증가에 기인하였을 것으로 사료된다. 하지만 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> 처리 시 Sol 8 세포내 칼슘 농도의 변화는 없었다. 따라서 위의 결과를 종합해 보면, Sol 8 세포내 1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>에 의한 calpain계 효소의 변화는 기존의 보고 의외에 또 다른 작용 기작이 존재할 가능성이 있으며, 이를 확인하기 위한 보완 실험이 추후 더 진행되어야 한다고 생각된다.

### 참고문헌

1. Carnagey, K. M., Huff-Lonergan, E. J., Trenkle, A., Wertz-Lutz, A. E., Horst, R. L., and Beitz, D. C. (2008) Use of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and vitamin E to improve tenderness of beef from the longissimus dorsi of heifers. *J. Anim. Sci.* **86**: 1649-1657.
2. Chen, P. T., Hsieh, C. C., Wu, C. T., Yen, T. C., Lin, P. Y., Chen, W. C., and Chen, M. F. (2015) 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Inhibits Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by Reducing IL6 Signaling. *Mol Cancer Ther.* **14**: 1365-1375.
3. Cho, S. H., Kim, J. H., Kim, J. H., Seung, P. N., Park, B. Y., Kim, D. H., Lee, J. M., and Ahn, C. N. (2008) Prediction of palatability grading scores analyzed with sensory data of Hanwoo bull and steer beef. *Proc. Kor. J. Anim. Sci. Technol.* pp.136.
4. Evans, R. M., and Mangelsdorf, D. J. (2014) Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell.* **27**: 255-266.
5. Geesink, G. H., and Koohmaraie, M. (1999) Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by mu-calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.* **77**: 2685-2692.
6. Helman, E. E., Huff-Lonergan, E., Davenport, G. M., and Lonergan, S. M. (2003) Effect of dietary protein on calpastatin in canine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* **81**: 2199-2205.
7. Hollis, B. W., Hibbs, J. W., and Conrad, H. R. (1977) Vitamin D binding factors in bovine blood. *J. Dairy. Sci.* **60**: 1605-1611.
8. Koohmaraie, M. (1992) The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases(calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. *Proc. Recip- Meat Conf.* **45**: 63-71.
9. Mathiasen, I. S., Sergeev, I. N., Bastholm, L., Elling, F., Norman, A. W., and Jäätelä, M. (2002) Calcium and calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **23**: 30738-30745.
10. Montgomery, J. L., Blanton, J. R. Jr., Horst, R. L., Galyean, M. L., Morrow, K. J. Jr., Allen, V. G., Wester, D. B., and Miller, M. F., (2004) Effect of supplemental vitamin D<sub>3</sub> concentration on concentrations of calcium, phosphorus, and magnesium relative to protein in subcellular components of the longissimus and the distribution of calcium within longissimus muscle of beef steers. *J. Anim. Sci.* **82**: 2742-2749.
11. Montgomery, J. L., Carr, M. A., Kerth, C. R., Hilton, G. G., Price, B. P., Galyean, M. L., Horst, R. L., and Miller, M. F. (2002) Effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation level on the postmortem tenderization of beef from steers. *J. Anim. Sci.* **80**: 971-981.
12. Morgan, J. B., Miller, R. K., Mendez, F. M., Hale, D. S., and Savell, J. W. (1991) Using calcium chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. *J. Anim. Sci.* **69**: 4469-4476.
13. Murachi, T. (1989) Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem Int.* **18**: 263-294.
14. Naohiko, H., Junko, F., Hideyuki Y., Kaori, F. O., and Hidemitsu K. (2014) 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> downregulates gene expression levels of muscle ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in human

- myotubes. *Biomedical Research (Tokyo)*. **36**: 71-80.
15. Rachele, M. P., Ceglia, L., Olsson, K., Gustafsson, T., Lichtenstein, A. H., Dawson-Hughes, B., and Fielding, R. A., (2015) Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Vitamin D<sub>3</sub> on the Expression of the Vitamin D Receptor in Human Skeletal Muscle Cells. *Calcif. Tissue Int.* **96**: 256-263.
  16. Ravid, A., Koren, R., Rotem, C., Garach-Jehoshua, O., Glaser, T., and Liberman, U. A. (1994) 1,25-Dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> increases the cellular content of the calcium-activated neutral protease mu-calpain in renal cell carcinoma. *Endocrinology*. **135**: 2822-2825.
  17. Swanek, S. S., Morgan, J. B., Owens, F. N., Gill, D. R., Strasia, C. A., Dolezal H. G., and Ray, F. K., (1999) Vitamin D<sub>3</sub> supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. *J. Anim. Sci.* **77**: 874-881.
  18. Sergeev, I. N. (2012) Vitamin D and cellular Ca<sup>2+</sup> signaling in breast cancer. *Anticancer Res.* **32**: 299-302.
  19. SPSS. (2008).