



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 8월

석사학위 논문

Dexamethasone 유도 골격근 위축
모델에서 C-peptide의 근감소 예방
효과

조선대학교 대학원

식품영양학과

김진주

Dexamethasone 유도 골격근 위축 모델에서 C-peptide의 근감소 예방 효과

Preventive Effect of C-peptide on Muscle
Degradation in Dexamethasone-induced Skeletal
Muscle atrophy Model

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

식품영양학과

김진주

Dexamethasone 유도 골격근 위축
모델에서 C-peptide의 근감소
예방 효과

지도교수 최 지 영

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

식품영양학과

김 진 주

김진주의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이주민 (인)

위원 조선대학교 교수 판정훈 (인)

위원 조선대학교 교수 최지영 (인)

2023년 5월

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES	IV
LIST OF FIGURES	V
ABSTRACT	VII
제1장 서론	1
제1절 연구 배경	1
1. 근위축증	1
2. C-peptide	3
제2절 연구 목적	4
제2장 실험 재료 및 방법	5
제1절 세포실험	5
1. 실험 재료	5
2. 세포배양	6
3. 세포 형태학적 분석	8
가. Immunofluorescence staining	8
나. Differentiation index 및 Fusion index	8
4. 세포 분자생물학적 분석	9
가. Western blot	9
제2절 동물실험	11
1. 동물 사육	11

2. 체중 측정 및 악력 측정	13
3. 근육조직 형태학적 분석	14
가. Hematoxylin & Eosin (H&E) staining	14
나. Cross-Sectional Area (CSA) 측정	14
4. 혈청 생화학적 분석	15
5. 근육조직 분자생물학적 분석	16
가. Real Time-qPCR	16
나. Western blot	18
제3절 통계학적 분석	20
1. 통계 분석	20
제3장 실험 결과	21
제1절 세포수준에서 C-peptide에 의한 근위축 개선 효과	21
1. C-peptide 농도에 따른 C2C12 분화	21
2. C-peptide 농도에 따른 C2C12 단백질 발현	23
제2절 실험동물에서 C-peptide에 의한 근위축 개선 효과	25
1. C-peptide 처리에 따른 체중 및 악력 변화	25
2. C-peptide 처리에 따른 주요 조직 중량 변화	28
3. C-peptide 처리에 따른 CSA 변화	31
4. 혈청 C-peptide 농도	34
5. 근육조직에서 mRNA 발현	36
가. Gastrocnemius muscle에서 C-peptide의 mRNA 발현 조절	36
나. Quadriceps muscle에서 C-peptide의 mRNA 발현 조절	39
6. 근육조직에서 단백질 발현	42
가. Gastrocnemius muscle에서 C-peptide의 단백질 발현 조절	42

나. Quadriceps muscle에서 C-peptide의 단백질 발현 조절 46

제4장 고찰 및 결론 51

제5장 참고문헌 54

LIST OF TABLES

Table 1. Antibodies for <i>in vitro</i> study western blotting.	10
Table 2. Primers for Real Time-qPCR.	17
Table 3. Antibodies for <i>in vivo</i> study western blotting.	19

LIST OF FIGURES

Figure 1. Image of C-peptide and insulin.	3
Figure 2. The experimental design for <i>vitro</i> study.	7
Figure 3. The experimental design for <i>vivo</i> study.	12
Figure 4. Effect of C-peptide on C2C12 differentiation.	22
Figure 5. The protein expression level in C2C12 treated with various concentrations of C-peptide or dexamethasone.	24
Figure 6. Effect of C-peptide on body weight in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.	26
Figure 7. Effect of C-peptide on grip strength in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.	27
Figure 8. Effect of C-peptide on hindlimb muscle weight in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.	29
Figure 9. Effect of C-peptide on adipose tissue and liver weight in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.	30
Figure 10. H&E staining and CSA of myofibers in gastrocnemius muscle.	32
Figure 11. H&E staining and CSA of myofibers in quadriceps muscle.	33
Figure 12. Serum C-peptide concentration.	35

Figure 13. The mRNA expression associated with muscle atrophy in gastrocnemius muscle..... 37

Figure 14. The mRNA expression associated with autophagy in gastrocnemius muscle..... 38

Figure 15. The mRNA expression associated with muscle atrophy in quadriceps muscle..... 40

Figure 16. The mRNA expression associated with autophagy in quadriceps muscle..... 41

Figure 17. The protein expression of muscle protein synthesis in gastrocnemius muscle..... 43

Figure 18. The protein expression of KLF15 and Akt/FoxO3a pathway in gastrocnemius muscle.....44

Figure 19. The protein expression of autophagy in gastrocnemius muscle..... 45

Figure 20. The protein expression of protein synthesis in quadriceps muscle...47

Figure 21. The protein expression of KLF15 and Akt/FoxO3 pathway in quadriceps muscle..... 48

Figure 22. The protein expression of autophagy in quadriceps muscle..... 49

Figure 23. The summarized effect of C-peptide in this study.....50

ABSTRACT

Preventive Effect of C-peptide on Muscle Degradation in Dexamethasone-induced Skeletal Muscle atrophy Model

Jin Joo Kim

Advisor :Prof. Choi Ji-Young, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

Skeletal muscle accounts for about 40% of total body weight and is involved in physical activity and energy metabolism in human. Skeletal muscle weight is regulated by the signaling balance of muscle synthesis or degradation. When muscle degradation exceeds synthesis, it results in muscle atrophy which leads to a decrease in muscle weight, muscle strength, muscle fiber, and fatigue resistance. Dexamethasone (DEX) is a glucocorticoid medication known to cause muscle atrophy. C-peptide, which is secreted by pancreatic beta cells, has been reported to have various biological activities. However, its effect on muscle atrophy has not been reported yet. Thus, in this study, we investigated the effect of C-peptide on a DEX-induced atrophy model. For *in vitro* study, C2C12 myotubes were incubated with or without DEX and subsequently treated with various concentrations (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM) of C-peptide to evaluate its effect on cell differentiation and regulation muscle atrophic factors. C-peptide inhibited the expression of muscle atrophic factors at low concentrations. Conversely, at high concentrations, the expression of muscle atrophic factors was enhanced in C2C12 cell. For *in vivo* study, C57BL/6J mice were divided into three groups. The control (CON) and DEX groups were injected intraperitoneally with saline or DEX, respectively, for 8 days, followed by saline injection for 12 days. DEX + C-peptide group was injected with DEX and

C-peptide simultaneously for 8 days, followed by C-peptide injection 12 days. As a result, C-peptide significantly augmented body weight and muscle weight in the DEX + CP group compared to the DEX group. Moreover, C-peptide inhibited the expression of muscle atrophy factors, such as Atrogin-1, in the muscles. In conclusion, this study suggests that C-peptide has potential to improve muscle atrophy by ameliorating protein degradation in muscles.

제1장 서론

제1절 연구 배경

1. 근위축증

골격근은 심장근, 내장근과 함께 우리 몸을 구성하는 근육의 한 종류이며 인체에서 전체 체중의 약 40%를 차지하고 신체 단백질의 50~75%를 포함한다 [1]. 또한, 골격근은 화학 에너지를 운동 에너지로 전환하여 자세를 유지하고 신체활동 및 운동을 수행하며 체온유지와 주요 에너지 대사 조직으로서 포도당, 지질 및 아미노산과 같은 에너지 대사 기질의 흡수, 이용 및 저장에 관여한다 [2]. 이러한 근육량은 다양한 신호전달 경로를 통해 근육 단백질의 합성과 분해의 균형으로 조절된다 [3]. 근육 단백질 분해가 합성을 초과하면 근육의 양, 힘, 횡단면적 및 피로저항이 감소하고, 이를 근위축증이라고 한다 [4, 5]. 근위축증은 기아, 노화나 근육을 사용하지 않는 환경에서도 발생하고, 암으로 인한 악액질이나 화상 및 염증과 같은 급격한 부상 및 심부전, 만성신장질환, 폐쇄성폐질환 등 만성질환 등과 같은 질병에 의해서도 발생할 수 있다 [6-8].

본 실험에서 주목한 근육 조절 주요 신호전달 경로는 ubiquitin-proteasome system (UPS), IGF-1/PI3K/Akt pathway 및 autophagy이다 [9]. UPS는 단백질을 표적분해하는 기전으로, ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), ubiquitin-ligase enzyme (E3)에 의한 연쇄 효소 반응이다. 일련의 과정을 통해 표적단백질이 ubiquitin에 의해 표지되면 proteasome에 의해 표적단백질은 아미노산으로 분해된다. 이 과정에서 E3 ubiquitin ligase는 ubiquitin을 표적단백질에 전달하는 것을 돕는다. 따라서, 근육 특이적 E3 ubiquitin ligase인 Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1)과 Atrogin-1은 발현 증가 시 근육 단백질 분해를 유도한다 [10].

Insulin growth factor-1 (IGF-1)은 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)의 활성을 유도하여 Protein kinase B (Akt)의 인산화를 증가시킨다. 이는 mammalian target of rapamycin (mTOR)의 활성을 유도하여 궁극적으로 Ribosomal Protein S6

Kinase B1(P70 S6K1)이나 Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1) 같은 근육 단백질 합성인자의 인산화를 상향 조절하여 근육 단백질 합성에 관여한다. 한편, Forkhead Box O (FoxO)는 탈인산화하여 근육 특이적 E3 ubiquitin ligase인 MuRF1과 Atrogin-1의 발현을 증가시켜 근위축을 유발한다. 이때, Akt의 인산화는 FoxO의 탈인산화를 저해하여 근육 단백질의 분해를 억제한다 [11]. Autophagy는 진핵 세포에서 세포 소기관 거대 분자 및 단백질의 분해 및 분해 생성물을 재활용하는 과정으로, 세포 생존 및 유지에 중요하다 [12]. 그러나 골격근에서 과한 autophagy는 세포 사멸이 유도되어 근위축증이 유도될 수 있다 [13].

Dexamethasone (DEX)은 glucocorticoid계 화합물로, 스트레스 상황 (패혈증, 기아, 약액질 등)에서 방출되는 내분비 호르몬으로서 골격근 위축을 유발할 수 있다. Glucocorticoid는 IGF-1/PI3K/Akt pathway를 통해 mTOR를 하향 조절하여 P70 S6K1를 탈인산화하고 4EBP1을 촉진함으로써 단백질 합성을 억제한다 [14]. 또한, DEX로 조절된 IGF-1/PI3K/Akt pathway는 FoxO의 탈인산화를 촉진하여 최종적으로 MuRF1과 Atrogin-1의 상향 조절로 골격근의 위축을 나타낸다 [15].

2. C-peptide

C-peptide는 proinsulin에서 insulin A 사슬과 B 사슬을 연결하는 connecting peptide로, 인슐린과 함께 췌장의 랑게르한스섬 β -세포에서 생산되어 1:1 농도로 순환계로 분비된다 [16, 17]. C-peptide의 반감기는 인슐린의 반감기인 2~5분에 비해 20~30분으로 상대적으로 길어 췌장 β -세포 기능을 평가할 수 있는 지표로 활용되고 있다 [18, 19]. 이 외에도 선행연구에 따르면 생체 외 수준에서 PI3K 활성화, Na^+/K^+ -ATPase 활성화, 세포 내 칼슘 농도 증가 등을 나타낸다 [20-22]. 또한, 생체 내에서 당뇨병성 합병증과 관련하여 신경병증 완화, 사구체 과여과 개선, 골격근 혈류 증가 및 Na^+/K^+ -ATPase 활성화 등의 효과가 연구되었다 [23-26].

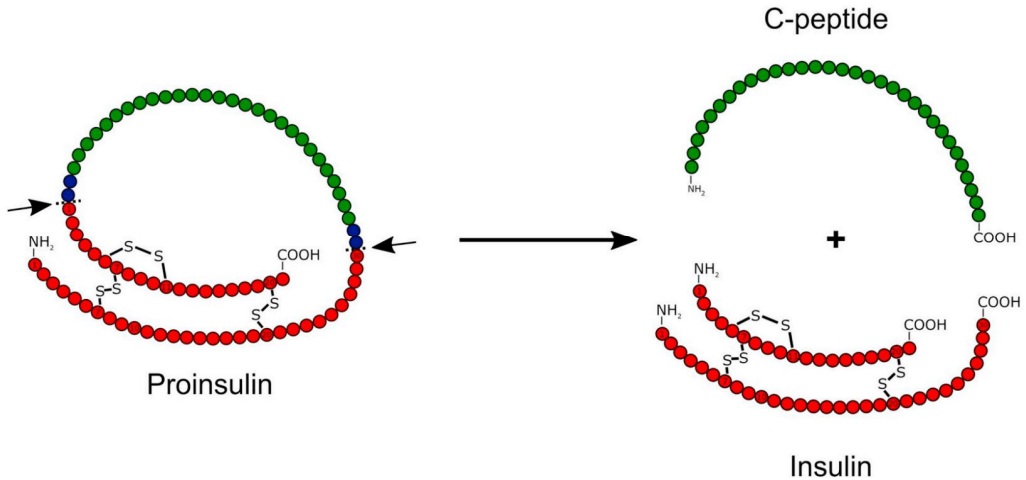


Figure 1. Image of C-peptide and insulin [27].

제2절 연구 목적

근위축증이 유발되면 근력 약화로 인해 신체활동에 제한이 생기고 부족한 신체 활동으로 인해 다시 근감소가 발생하는 악순환에 빠지게 된다 (23). 하지만 근위축 증은 현재까지 치료제가 없어 근위축증에 대한 예방·치료 물질 개발이 필요하다. 주요 근육 조절 기전으로는 IGF-1/PI3K/Akt pathway와 autophagy가 있다. 근위축 증 유도를 위해 널리 사용되는 DEX은 glucocorticoid계 화합물로, IGF-1/PI3K/Akt pathway를 조절하여 근위축을 유도한다.

C-peptide는 인슐린과 밀접하게 관련되어 주로 당뇨병성 합병증에 대한 효능이 주로 연구되어왔다. 하지만 근위축증에서 C-peptide의 영향에 관한 연구는 거의 전 무하다. 한편, 선행연구를 통해 C-peptide는 근위축증 메커니즘과 연관된 AMPK와 PI3K 활성화에 관여한다고 알려진 바 있으므로 DEX으로 유도된 근위축증 개선에 대한 잠재력을 가진다. 또한, 본 연구를 통해 당뇨병성 합병증의 일종인 당뇨병성 근위축증에 대한 C-peptide의 효능 평가를 위한 선행 연구로서 가치를 지닌다.

따라서, 본 연구에서는 분화된 C2C12 세포에 DEX로 근감소 유도 후 C-peptide 농도에 따른 근육 분화능과 근위축증에 효능을 나타내는 농도를 확인하고자 한다. 또한, 동물실험에서 DEX와 C-peptide를 동시 투여하여 근육조직의 생태학적 분석 과 분자생물학적 분석을 통해 생체 내 C-peptide의 작용기전을 규명하고자 한다.

제2장 실험 재료 및 방법

제1절 세포실험

1. 실험 재료

세포실험에 사용한 dexamethasone (DEX, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 100 μ M stock을 제조하여 실험에 사용하였다. C-peptide (Human, C-peptide sequence: EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, molecular formula: C₁₂₉H₂₁₁N₃₅O₄₈, molecular weight: 3020.3)는 Peptron (Daejeon, South Korea)에서 구입하여 1 × phosphate buffered saline (PBS, Bioneer, Daejeon, South Korea)에 농도별로 희석하여 실험에 사용하였다. 세포배양에 사용한 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), horse serum (HS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin (P/S), dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)는 Welgene (South Korea)에서 구매하였다. 세포 수확에는 Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, USA), phenylethylsulfonyl fluoride (PMSF, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail과 PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany)를 제조사의 protocol에 따라 사용하였다.

2. 세포배양

C2C12는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하여 수차례 계대한 것을 사용하였다. 세포는 10% FBS 와 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지와 37°C, 5% CO₂ 가 공급되는 습윤한 조건에서 배양하였다.

Immunofluorescence staining과 western blot을 위해 4 well plate에 2×10⁵ cells/well로 seeding 하여 48시간 후 5% HS와 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지로 교체하여 분화를 유도하고 48시간마다 동일한 배지로 교체하였다. 분화유도 4일째에 1μM DEX를 5시간 동안 처리하지 않거나 처리하고, 이어서 C-peptide를 최종농도 0.01, 0.1, 1, 10, 100nM로 5시간 처리하거나 처리하지 않은 후 MHC와 단백질 발현을 확인하였다 (Figure 2).

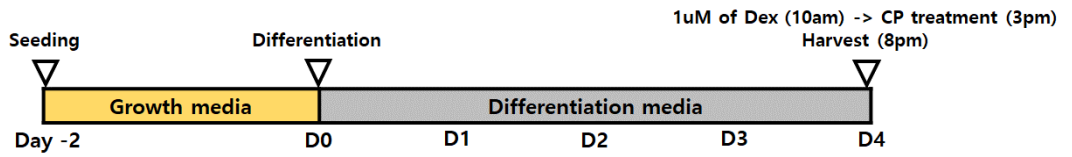


Figure 2. The experimental design for *in vitro* study.

Dex; Dexamethasone, CP; C-peptide.

3. 세포 형태학적 분석

가. Immunofluorescence staining

C2C12 세포를 차가운 DPBS로 3회 세척하고 실온에서 10% formalin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 고정하였다. 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 10분 동안 처리하여 permeabilization 후 실온에서 3% BSA/PBS로 blocking 하였다. C2C12 myotube는 myosin heavy chain (MHC; cat.no, MAB4470; 1:50)를 사용하여 4°C에서 overnight incubation 후 Alexa 488 (cat.no, A21202; 1:250)과 DAPI (cat.no, D9542; 1:1000)를 실온에서 30분 동안 incubation 후 DPBS로 세척 하였다. C2C12 myotube는 형광현미경 (Motic, San Antonio, TX, USA)으로 관찰하였다.

나. Differentiation index 및 Fusion index

C2C12 세포의 분화 효율을 평가하기 위해 MHC 양성 근관의 핵 수를 총 핵 수로 나누어 differentiation index로 나타내었다. 또한, 세포 근관 융합 효율을 평가하기 위해 두 개 이상의 핵을 포함하는 MHC 양성 근관의 핵 수를 총 핵 수로 나누어 fusion index로 나타내었다.

4. 세포 분자생물학적 분석

가. Western blot

세포 수확 후 단백질을 추출하기 위해 원심분리기 (12,000 rpm, 10 min. 4°C)를 이용하여 상층액을 수집하였다. 단백질의 농도는 Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다.

정량한 단백질은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 10 μ g 로딩하였다. 전기영동을 통해 크기별로 분리한 단백질은 poly vinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하였다. Membrane을 ponceau S solution (GenDEPOT, Barker, TX, USA)으로 염색하여 단백질의 위치를 확인하고, 실온에서 1시간 동안 5% skim milk (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)로 blocking 하였다. Membrane은 4°C에서 primary-antibody를 overnight incubation 한 후 tris-buffered saline-tween 20 (TBST)로 3회 세척하고 secondary-antibody를 상온에서 1시간 incubation 후 다시 TBST로 3회 세척 하여 Westar sun (Cyanagen, Bologna, Italy)과 Azure 300 Imaging Systems (Azure biosystems, Dublin, CA, USA)을 사용하여 detection하고 Image J program Software (NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석하였다. 단백질 발현 수준은 alpha-tubulin을 이용하여 표준화하였고 실험에 사용한 antibody와 농도는 다음과 같이 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Antibodies for *in vitro* study western blotting.

Antibody	cat. no	Source	Dilution
p-Akt (Ser473)	9271	Cell Signaling Technology	1:1000
Akt	9272	Cell Signaling Technology	1:2000
Atrogin-1	Sc_166806	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
MuRF1	Sc_398608	Santa Cruz Biotechnology	1:500
alpha-Tubulin	3873	Cell Signaling Technology	1:10000
p-Akt, Phospho-Protein kinase B; Akt, Protein kinase B; MuRF1, Muscle RING-finger protein-1			

제2절 동물실험

1. 동물 사육

9주령 C57BL/6J 수컷 마우스를 (중앙실험동물, Seoul, South Korea)에서 구입하여 동물실험에 사용하였다. 실험동물은 통제된 환경 ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12시간 명/12시간 암 주기, 상대 습도 50~60%)에서 사육했으며, 사료 (altromin spezialfutter GmbH & Co. KG, Germany)와 식수는 자유롭게 제공하였다. 일주일의 적응 기간 후 무작위로 세 개의 그룹으로 나누었다. CON 그룹은 20일간 식염수를 복강 주사하고, DEX 그룹은 8일간 DEX 20mg/kg/day 주사하여 muscle atrophy 유도 후 12일간 식염수를 복강 주사하였다. DEX + CP 그룹은 8일간 DEX 20mg/kg/day와 C-peptide 50 $\mu\text{g/day}$ 를 함께 주사했고, 이후 12일간 C-peptide 50 $\mu\text{g/day}$ 주사하였다. 실험 기간 종료 후 실험동물은 zoletil/rompun으로 마취 후 희생하였다 (Figure 3). Gastrocnemius muscle, quadriceps muscle, tibialis anterior muscle, epididymal fat tissue 및 liver는 적출하여 중량 측정 후 -70°C 에 동결하였다. 본 연구의 동물 실험은 이화여자대학교 윤리위원회에서 승인받아 진행하였다 (IACUC 19-046).

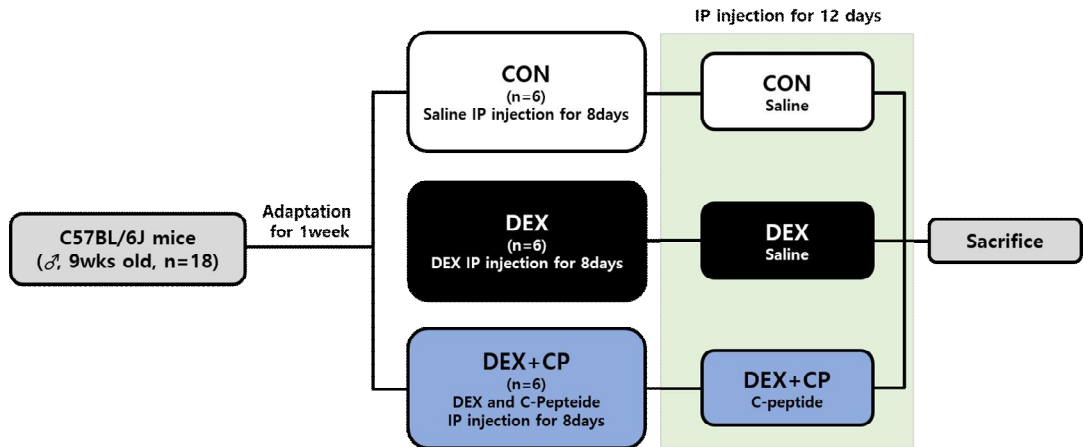


Figure 3. The experimental design for *in vivo* study.

CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group; IP injection, intraperitoneal injection.

2. 체중 측정 및 악력 측정

마우스의 체중은 실험 시작일부터 4일마다 측정하였다. 실험 마지막 날 체중에서 실험 시작일 체중을 뺀 값을 body wight gain (g)으로 나타내었다.

악력 측정을 위해 푸쉬풀 게이지 (FGJN-5, Nidec-Shimpo, Kyoto, Japan)를 사용하였다. 마우스는 네발로 그리드를 잡고, 마우스가 그리드와 분리될 때까지 꼬리를 잡고 일정한 힘으로 당겼다. 그리드와 분리되었을 때를 기록하고 개체별 총 3회 측정하여 최댓값을 분석에 사용하였다. 악력은 각 개체의 체중으로 나누어 grip strength (gf/g)으로 나타내었다.

3. 근육조직 형태학적 분석

가. Hematoxylin & Eosin (H&E) staining

Gastrocnemius muscle과 quadriceps muscle의 횡단면적을 분석하기 위해 근육조직을 10% formalin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 고정하고 paraffin으로 embedding 후 박절기를 이용하여 5 μ m 두께의 슬라이스로 절단한 후 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하였다.

나. Cross-Sectional Area (CSA) 측정

염색된 근육 절편은 200배 확대하여 그룹당 4개의 대표 이미지를 얻었다. CSA는 Image J program Software (NIH, USA)를 사용하여 측정하였으며 그룹당 700세트 이상의 데이터를 수집하였다.

4. 혈청 생화학적 분석

그룹 간 혈청 C-peptide의 농도를 평가하기 위해 실험동물 희생 후 혈액을 채취하고 Mouse C-peptide ELISA kit (Alpco, Salem, NH, USA)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 진행하였다.

5. 근육조직 분자생물학적 분석

가. Real Time-qPCR

Gastrocnemius muscle과 quadriceps muscle에서 mRNA 발현을 분석하기 위해 QIAzol[®] Lysis Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Nabi-UV/VIS Nano Spectrophotometer (Micro Digital, Gyeonggi-do, South Korea)로 정량하고 TOPscript[™] RT DryMIX kit (Enzynomics, Daejeon, South Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현 분석은 TOPreal SYBR Green qPCR PreMIX (Enzynomics, South Korea)를 사용하여 제조업체의 protocol에 따라 CFX Connect[™] Real time system (Bio-rad, USA)으로 Real Time-qPCR (RT-qPCR)을 진행하였다. 그 결과는 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method로 정량분석 하였고 모든 유전자는 *Gapdh*를 이용하여 표준화하였다. 유전자에 대한 primer의 염기서열은 다음과 같이 나타내었다 (Table 2).

Table 2. Primers for Real Time-qPCR.

Gene name	Direction	Sequence (5'-3')
<i>Foxo3</i>	Forward	AGC CGT GTA CTG TGG AGC TT
	Reverse	TCT TGG CGG TAT ATG GGA AG
<i>Fbxo32</i>	Forward	ATG CAC ACT GGT GCA GAG AG
	Reverse	TGT AAG CAC ACA GGC AGG TC
<i>Trim63</i>	Forward	ACC TGC TGG TGG AAA ACA TC
	Reverse	CTT CGT GTT CCT TGC ACA TC
<i>Klf15</i>	Forward	GAG ACC TTC TCG TCA CCG AAA
	Reverse	GCT GGA GAC ATC GCT GTC AT
<i>Sqstm1</i>	Forward	AGG ATG GGG ACT TGG TTG C
	Reverse	TCA CAG ATC ACA TTG GGG TGC
<i>Lc3b</i>	Forward	CCC ACC AAG ATC CCA GTG AT
	Reverse	CCA GGA ACT TGG TCT TGT CCA
<i>Gapdh</i>	Forward	TCC CAC TCT TCC ACC TTC GA
	Reverse	CAG GAA ATG AGC TTG ACA AAG TTG

Foxo3a, forkhead box O3; *Fbxo32*, F-Box Protein 32; *Trim63*, tripartite motif-containing 63; *Klf15*, Kruppel-like factor 15; *Sqstm1*, sequestosome 1; *Lc3b*, light chain 3 beta; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

나. Western blot

Gastrocnemius muscle과 quadriceps muscle의 단백질을 추출을 위한 완충액으로 T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail과 PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany)을 사용하였다. BeadBlaster™24 Tissue Homogenizer (Benchmark scientific, USA)로 조직 파쇄 후 원심분리기 (12,000 rpm, 10 min, 4°C)를 이용하여 상층액을 수집하였다. 단백질의 농도는 Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 이후 과정은 위에 언급한 방법과 동일하게 진행하였다. 실험에 사용한 antibody와 농도는 다음과 같이 나타내었다 (Table 3).

Table 3. Antibodies for *in vivo study* western blotting

Antibody	cat. no	Source	Dilution
p-FoxO3 (Ser318/321)	9465	Cell Signaling Technology	1:500
FoxO3	12829	Cell Signaling Technology	1:1000
p-Akt (Ser473)	9271	Cell Signaling Technology	1:500
Akt	9272	Cell Signaling Technology	1:1000
Atrogin-1	Sc_166806	Santa Cruz Biotechnology	1:500
MuRF1	Sc_398608	Santa Cruz Biotechnology	1:250
KLF15	Sc_271675	Santa Cruz Biotechnology	1:250
p-P70 S6K1 (Thr389)	9205	Cell Signaling Technology	1:500
P70 S6K1	2708	Cell Signaling Technology	1:500
p-4EBP1 (Thr37/46)	2855	Cell Signaling Technology	1:1000
4EBP1	9644	Cell Signaling Technology	1:1000
SQSTM1/p62	39749	Cell Signaling Technology	1:1000
LC3B	NB100-2220	Novus Biological	1:2000
GAPDH	Ab8245	abcam	1:10000

p-FoxO3a, Phospho-Forkhead Box O3; FoxO3a, Forkhead Box O3; p-Akt, Phospho-Protein kinase B; Akt, Protein kinase B; MuRF1, Muscle RING-finger protein-1; KLF15, Krüppel-like factor 15; p-S6K1, Phospho-Ribosomal Protein S6 Kinase B1; S6K1, Ribosomal Protein S6 Kinase B1; p-4EBP1, Phospho-Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; 4EBP1, Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; SQSTM1/p62, Sequestosome 1; LC3B, Light Chain 3 Beta, GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

제3절 통계 분석

1. 통계 분석

연구의 모든 실험 결과는 GraphPad Prism (Version 9.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 산출하였다. 그룹 간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA) 진행 후 Tukey의 다중범위 테스트를 수행하였다. 모든 결과는 Mean \pm S.E.M (standard error of mean)으로 표시하였다.

제3장 실험 결과

제1절 세포수준에서 C-peptide에 의한 근위축 개선 효과

1. C-peptide 농도에 따른 C2C12 분화

Differentiation media (DM)로 분화시킨 C2C12 세포에 DEX를 처리하여 근위축을 유도한 후 C-peptide를 농도별로 처리하여 MHC 발현을 확인하였다. Immunofluorescence staining 결과, DEX 그룹에서 DM 그룹에 비해 MHC 발현이 감소하였고 DEX + C-peptide 1nM (DEX + CP1) 그룹에서 MHC 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 반면, DEX + C-peptide 100nM (DEX + CP100) 그룹에서 MHC의 발현이 오히려 감소하였다 (Figure 4A).

Western blot으로 MHC 단백질 발현 수준을 분석한 결과, DEX로 근위축을 유도하지 않고 C-peptide만 저농도 (0.01~10nM) 처리 시 DM 그룹에 비해 유의적인 변화를 나타내지 않았다. DEX로 근위축을 유도하고 C-peptide 저농도 처리 시 DEX 그룹에 비해 MHC 발현이 증가하였다. 하지만, C-peptide 고농도 (100nM) 그룹에서는 DEX 처리와 관계없이 저농도 그룹에 비해 MHC 발현이 감소하였다 (Figure 4B).

Immunofluorescence staining 이미지를 이용해 C2C12 myotube의 분화와 융합을 평가하기 위한 differentiation index와 fusion index를 분석하였다. Differentiation index와 fusion index 모두 DEX 처리 시 DM 그룹에 비해 유의적으로 감소하였고 DEX + CP1 그룹은 DEX 그룹에 비해 differentiation index가 증가하는 경향 ($P=0.0640$)을 보였고, fusion index는 유의적으로 증가하였다. 한편, DEX + CP100 그룹은 differentiation index와 fusion index 모두 DEX 그룹 대비 유의적인 증가를 나타내지 않았다 (Figure 4C).

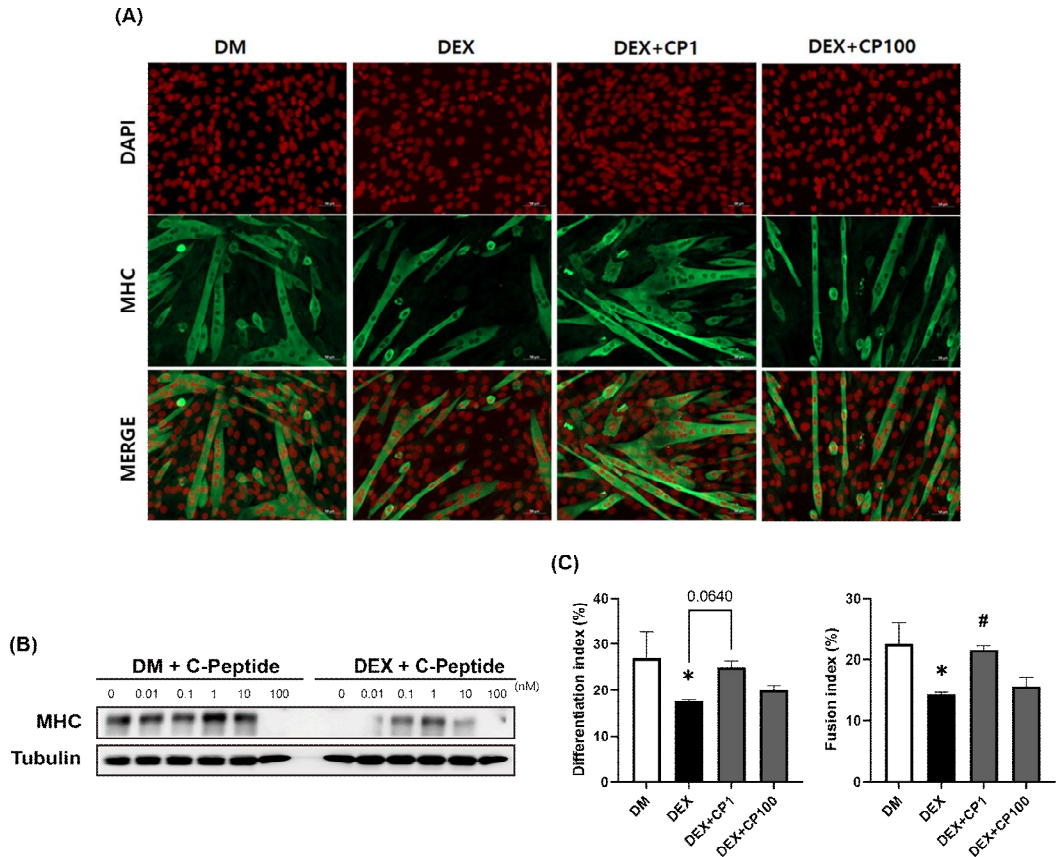


Figure 4. Effect of C-peptide on C2C12 differentiation.

(A) Representative image of MHC immunofluorescence staining. (B) Western blot analysis for MHC. (C) Differentiation index and fusion index. Data are Mean \pm S.E.M (n = 3); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX vs. DM; * $P < .05$. C-peptide vs. DEX; # $P < .05$. DM, differentiation media; DEX, dexamethasone; CP, C-peptide.

2. C-peptide 농도에 따른 C2C12 단백질 발현

Western blot을 통해 C-peptide 농도에 따른 C2C12 myotube에서 근위축증 관련 단백질 발현을 분석하였다. DM + CP100 그룹에서 다른 DM 처리 그룹에 비해 Atrogin-1과 MuRF1의 발현이 증가하였다. DEX + CP 그룹에서는 p-Akt/Akt의 발현이 DEX 그룹에 비해 DEX + CP0.1 그룹까지 농도 의존적으로 증가하다가 C-peptide 농도가 높아질수록 감소하였다. DEX 처리 그룹에서 C-peptide 0.01~10nM 처리시 Atrogin-1은 농도 의존적으로 감소하다가 C-peptide 100nM 처리시 증가하였다 (Figure 5C). 또한 MuRF1 단백질 발현도 C-peptide 0.01~10nM 처리시 DEX 그룹보다 낮게 관찰된 반면, C-peptide 100nM 처리시 오히려 MuRF1의 발현이 증가하였다 (Figure 5D).

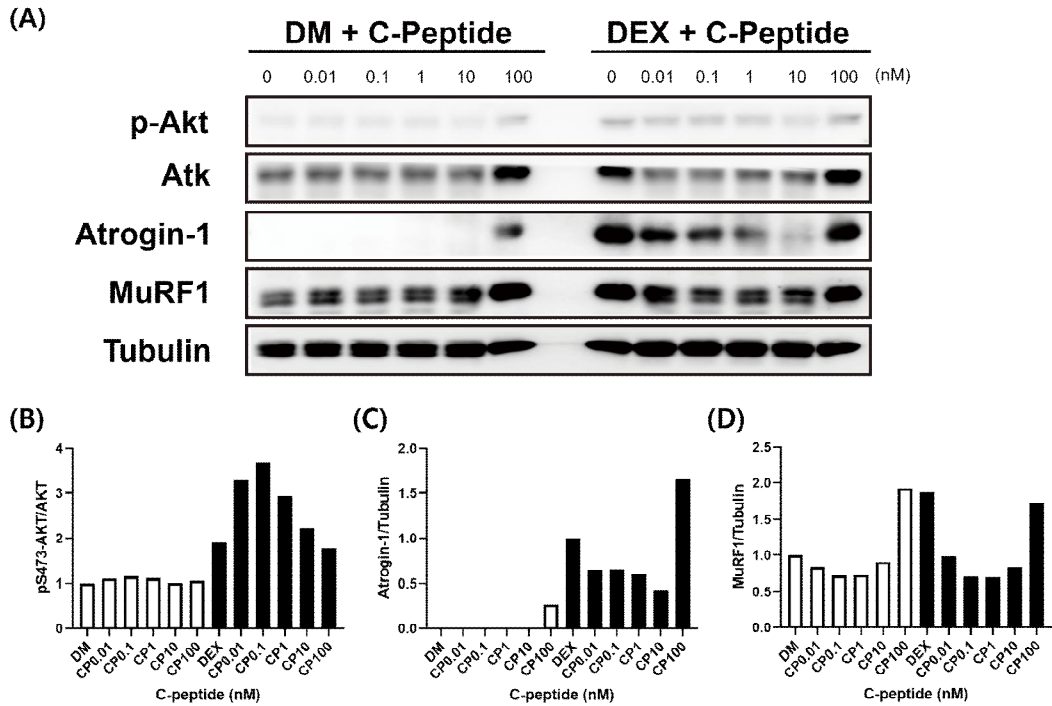


Figure 5. The protein expression levels in C2C12 treated with various concentrations of C-peptide or dexamethasone.

(A) Representative image of western blot analysis of C2C12. The protein levels of (B) p-Akt/Akt, (C) Atrogin-1, (D) MuRF1. DM, differentiation media; DEX, dexamethasone; CP, C-peptide.

제2절 실험동물에서 C-peptide에 의한 근위축 개선 효과

1. C-peptide 처리에 따른 체중 및 악력 변화

동물실험 시작일부터 4일 간격으로 체중을 측정하여 그 결과를 다음과 같이 나타내었다 (Figure 6A). DEX 그룹의 체중은 CON 그룹에 비해 4일 차부터 유의적으로 감소하여 실험 종료일까지 유의적인 차이를 나타내었다. DEX + CP 그룹은 DEX 그룹에 비해 8일 차부터 실험 종료일까지 유의적으로 높은 체중을 나타내었다. 그 결과, final body weight와 body weight gain 모두에서 DEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의적으로 감소하였고, DEX + CP 그룹은 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다 (Figure 6B-6C).

악력은 DEX 그룹이 CON 그룹에 비해 유의적으로 감소하였고, DEX + CP 그룹은 DEX 그룹에 비해 증가하는 경향 ($P=0.0506$)을 보였다 (Figure 7).

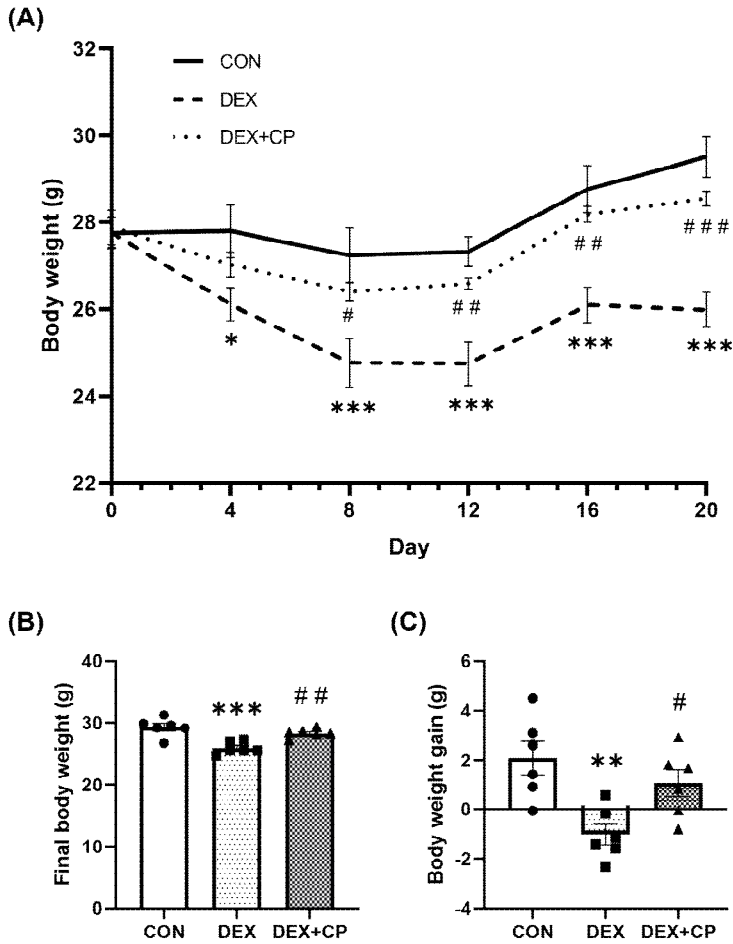


Figure 6. Effect of C-peptide on body weight in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.

(A) Mice body weight during the experiment. (B) Mice body weight on the last day of the experiment. (C) Body weight gain. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test. DEX vs. CON; * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$. DEX + CP vs. DEX; # $P < .05$, ## $P < .01$, ### $P < .001$. CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

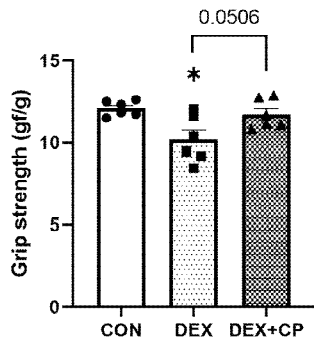


Figure 7. Effect of C-peptide on grip strength in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.

Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX vs. CON; * $P < .05$. CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

2. C-peptide 처리에 따른 주요 조직 중량 변화

각 그룹의 주요 조직 중량 측정 결과 gastrocnemius muscle의 총중량은 CON 그룹과 DEX 그룹은 차이를 보이지 않았고, DEX 그룹에 비해 DEX + CP 그룹에서 유의적으로 증가하였다. 또한 단위 체중당 gastrocnemius muscle 중량은 DEX 그룹에 비해 DEX + CP 그룹에서 증가하는 경향 ($P=0.0610$)을 나타내었다 (Figure 8A-8B). Quadriceps muscle 중량은 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 감소하는 경향 ($P=0.0627$)을 나타내었고, DEX 그룹에 비해 DEX + CP 그룹에서 유의적으로 증가하였다. 단위 체중당 quadriceps muscle 중량은 그룹 간 차이를 나타내지 않았다 (Figure 8C-8D). Tibialis anterior muscle의 총중량과 단위 체중당 조직 중량은 그룹 간 차이를 나타내지 않았다 (Figure 8E-8F).

한편, epididymal fat tissue와 liver 중량 모두 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 유의적으로 감소하였고, DEX 그룹에 비해 DEX + CP 그룹에서 epididymal fat tissue 중량은 증가하는 경향 ($P=0.0718$)을 나타내었고 liver 중량은 유의적으로 증가하였다. 단위 체중당 epididymal fat tissue와 liver 중량은 그룹 간 차이를 나타내지 않았다 (Figure 9).

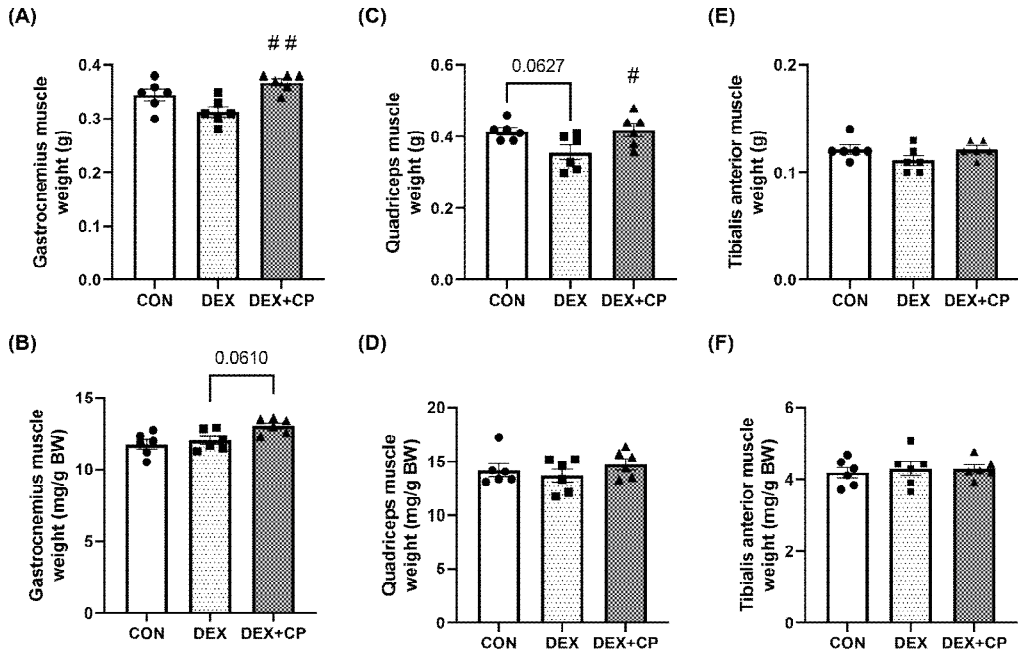


Figure 8. Effect of C-peptide on hindlimb muscle weight in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.

Weight of (A) gastrocnemius muscle, (C) quadriceps muscle, (E) tibialis anterior muscle. (B) Gastrocnemius muscle, (D) quadriceps muscle, (F) tibialis anterior muscle weight per body weight. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX + CP vs. DEX; [#] $P < .05$, ^{##} $P < .01$. CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group; BW, body weight.

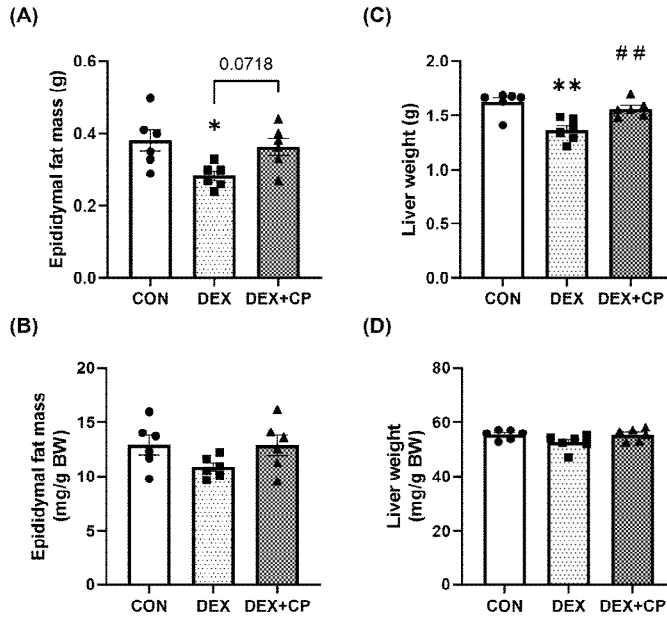


Figure 9. Effect of C-peptide on epididymal fat tissue and liver weight in dexamethasone-induced muscle atrophy mice.

Weight of (A) epididymal fat, (C) liver. (B) Epididymal fat, (D) liver weight per body weight. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX vs. CON; * $P < .05$, ** $P < .01$. DEX + CP vs. DEX; ## $P < .01$. CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group; BW, body weight.

3. C-peptide 처리에 따른 CSA 변화

Gastrocnemius muscle의 CSA 측정 결과, CON 그룹은 1500-2000 μm^2 를 37.2%로 가장 많이 나타내었고, DEX 처리 시 1000-1500 μm^2 를 30.1%로 가장 많이 나타내어 CON 그룹에 비해 작은 영역의 CSA가 증가하였다. DEX + CP 그룹은 2000-2500 μm^2 를 32.5%를 나타내어 DEX으로 유도된 근위축증에서 CSA의 개선을 나타내었다. CSA의 평균값 또한 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 감소하는 경향 ($P=0.0641$)을 보였고 DEX + CP 그룹은 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다 (Figure 10).

Quadriceps muscle의 CSA는 CON 그룹에서 2500-3000 μm^2 를 18.8%로 가장 많이 나타내었고, DEX 그룹에서 500-1000 μm^2 를 26.2%로 가장 많이 나타내었다. DEX + CP 그룹은 2500-3000 μm^2 를 18.0%로 개선되었다. CSA의 평균값 또한 CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 유의적으로 감소하였고, DEX + CP 그룹은 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다 (Figure 11).

(A)

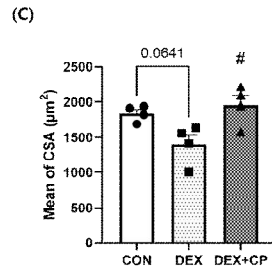
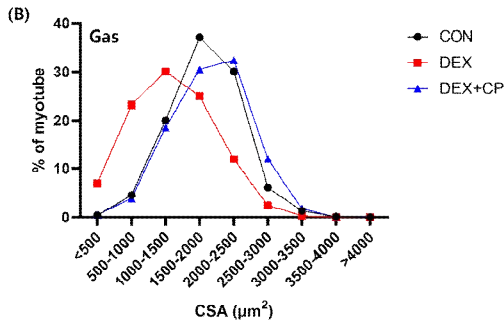
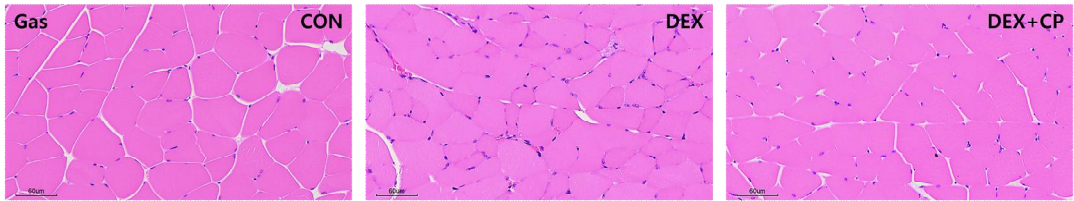
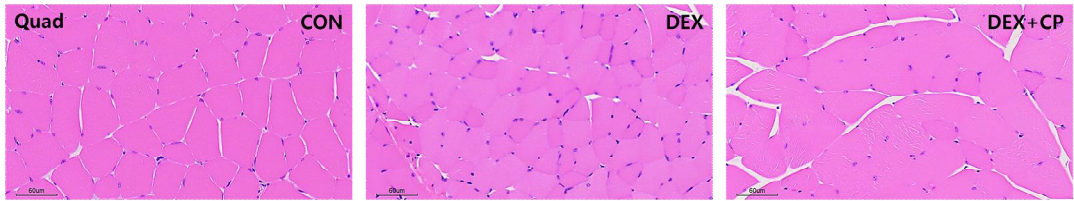


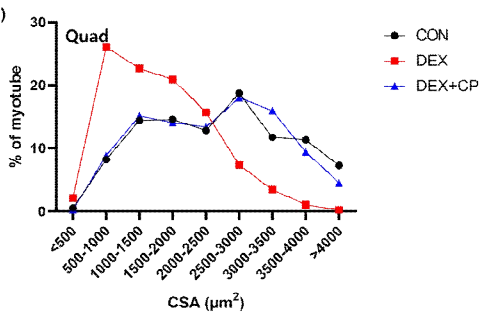
Figure 10. H&E staining and CSA of myofibers in gastrocnemius muscle.

(A) Representative H&E staining image of gastrocnemius muscle (n=4 per group). (B) Cross-sectional area (CSA) distribution in each group. (C) Mean of CSA in each group. Data are Mean \pm S.E.M (n = 4); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX + CP vs. DEX; $^{\#}P<.05$. Gas, gastrocnemius muscle; CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

(A)



(B)



(C)

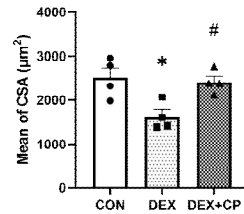


Figure 11. H&E staining and CSA of myofibers in quadriceps muscle.

(A) Representative H&E staining image of quadriceps muscle (n=4 per group). (B) Cross-sectional area (CSA) distribution in each group. (C) Mean of CSA in each group. Data are Mean \pm S.E.M (n = 4); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX vs. CON; * $P < .05$. DEX + CP vs. DEX; # $P < .05$. Quad, quadriceps muscle; CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

4. 혈청 C-peptide 농도

실험동물 혈청 C-peptide 농도 측정 결과, DEX + CP 그룹과 C-peptide를 투여하지 않은 두 그룹, CON 그룹과 DEX 그룹 간 혈청 C-peptide 농도는 차이를 나타내지 않았다 (Figure 12).

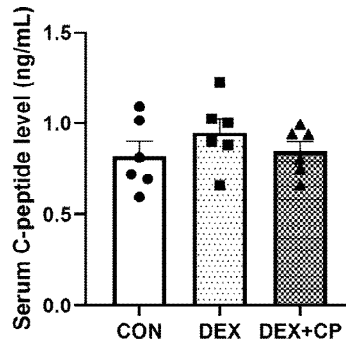


Figure 12. Serum C-peptide concentration.

Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

5. 근육조직에서 mRNA 발현

가. Gastrocnemius muscle에서 C-peptide의 mRNA 발현 조절

Gastrocnemius muscle에서 *Foxo1*과 *Trim63*의 발현은 그룹 간 차이를 보이지 않았지만, *Klk15*와 *Foxo3a*의 발현은 DEX + CP 그룹에서 CON 그룹과 DEX 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. *Fbxo32*는 DEX + CP 그룹에서 CON 그룹에 비해 감소하는 경향 ($P=0.0568$)과 DEX 그룹에 비해 유의적으로 감소를 나타내었다 (Figure 13). 한편, autophagy 관련 유전자인 *Lc3b*와 *Sqstm1*의 발현은 그룹 간 차이를 보이지 않았다 (Figure 14).

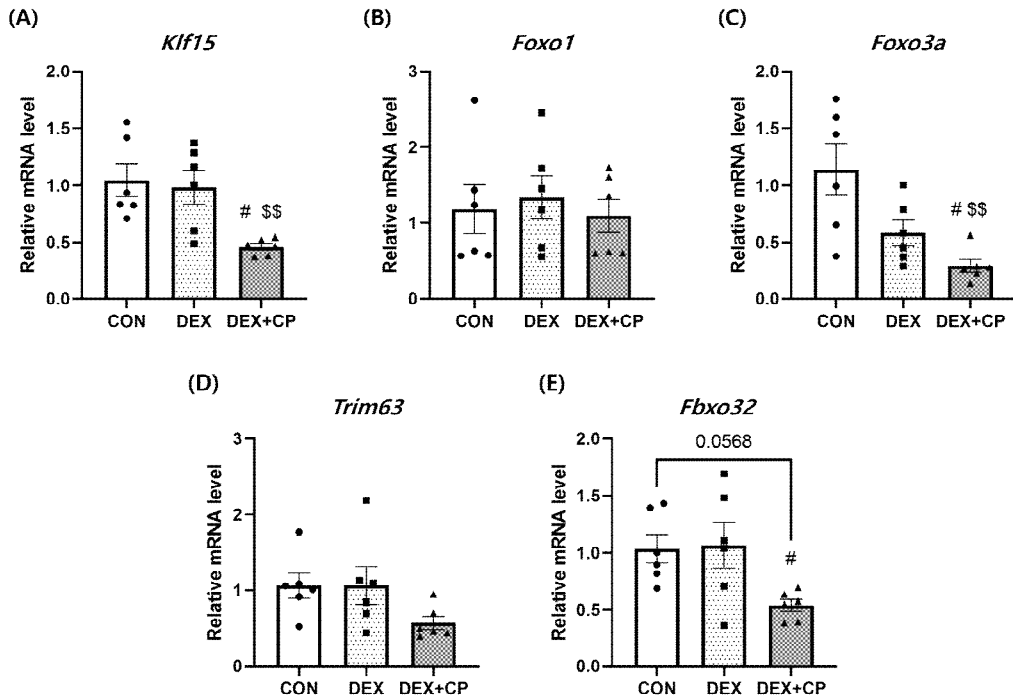


Figure 13. The mRNA expression associated with muscle atrophy in gastrocnemius muscle.

The mRNA expressions of (A) *Klf15*, (B) *Foxo1*, (C) *Foxo3a*, (D) *Trim63*, (E) *Fbxo32* in gastrocnemius muscle were quantified to *Gapdh*. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX + CP vs. DEX; [#] $P < .05$, ^{##} $P < .01$. DEX + CP vs. CON; ^{\$} $P < .05$, ^{\$\$} $P < .01$. CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

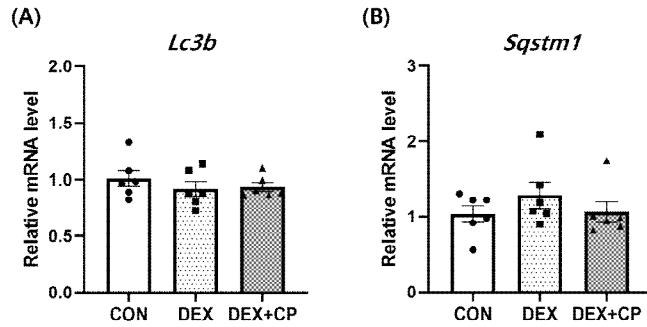


Figure 14. The mRNA expression associated with autophagy in gastrocnemius muscle. The mRNA expressions of (A) *Lc3b*, (B) *Sqstm1* in gastrocnemius muscle were quantified to *Gapdh*. Data are Mean ± S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; ns (not shown). CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

나. Quadriceps muscle에서 C-peptide의 mRNA 발현 조절

Quadriceps muscle에서 mRNA 발현을 확인한 결과, *Klf15*, *Foxo1* 및 *Foxo3a*의 발현은 그룹 간 차이를 보이지 않았다. *Trim63*과 *Fbxo32* 또한 그룹 간 발현의 차이를 보이지 않았다 (Figure 15). 한편, autophagy 관련 유전자인 *Lc3b*와 *Sqstm1*의 발현은 그룹 간 차이를 보이지 않았다 (Figure 16).

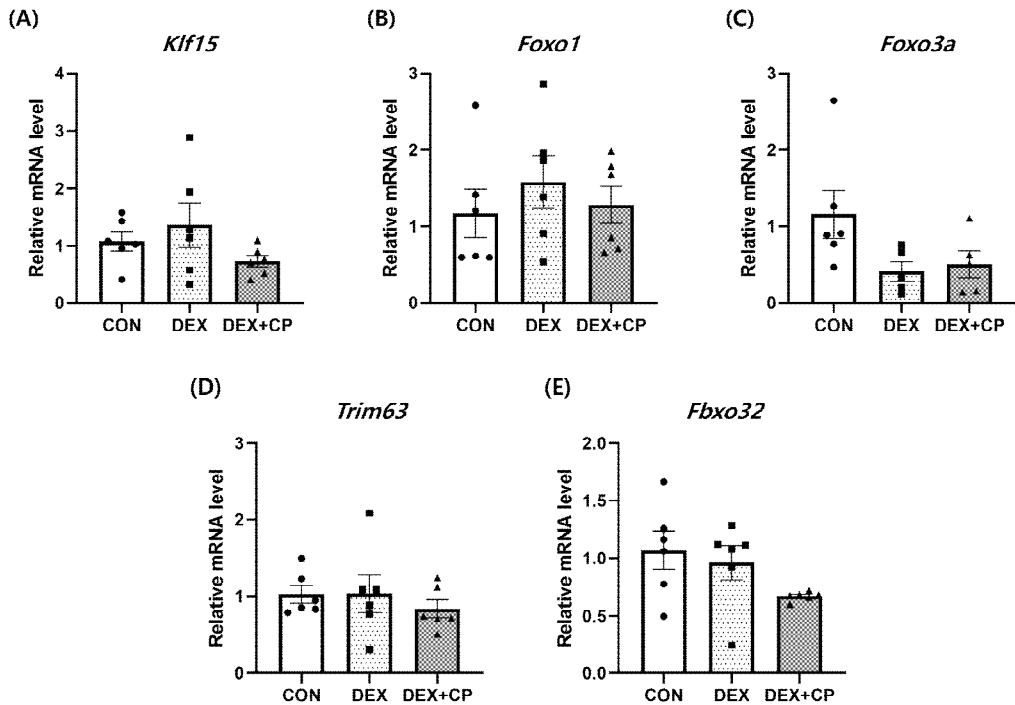


Figure 15. The mRNA expression associated with muscle atrophy in quadriceps muscle.

The mRNA expressions of (A) *Klf15*, (B) *Foxo1*, (C) *Foxo3a*, (D) *Trim63*, (E) *Fbxo32* in quadriceps muscle were quantified to *Gapdh*. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test. Outlier test was conducted using a ROUT test; ns (not shown). CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

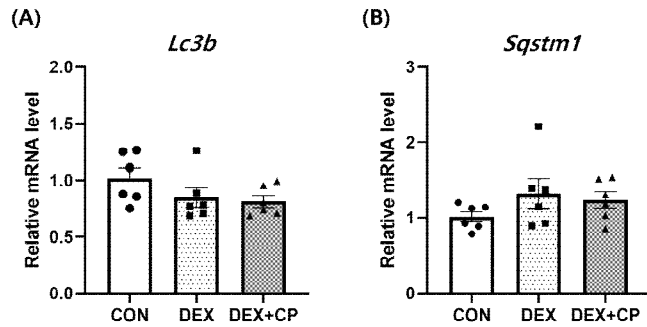


Figure 16. The mRNA expression associated with autophagy in quadriceps muscle.

The mRNA expressions of (A) *Lc3b*, (B) *Sqstm1* in quadriceps muscle were quantified to *Gapdh*. Data are Mean ± S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; ns (not shown). CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

6. 근육조직에서 단백질 발현

가. Gastrocnemius muscle에서 C-peptide의 단백질 발현 조절

Western blot을 통해 gastrocnemius muscle에서 근육 합성 관련 마커인 p-P70 S6K1/P70 S6K1과 p-4EBP1/4EBP1의 단백질 발현을 분석한 결과, 두 마커 모두 그룹 간 차이를 나타내지 않았다 (Figure 17). 근위축 관련 마커인 KLF15와 p-Akt/Akt 및 MuRF1은 그룹 간 차이를 나타내지 않았지만 p-FoxO3a/FoxO3a의 발현은 DEX + CP 그룹에서 DEX 그룹에 비해 증가하는 경향 ($P=0.0824$)을 보였다. Atrogin-1은 DEX + CP 그룹에서 CON 그룹과 DEX 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다 (Figure 18). 한편 autophagy 관련 마커인 LC3B와 p62는 그룹 간 차이를 나타내지 않았다 (Figure 19).

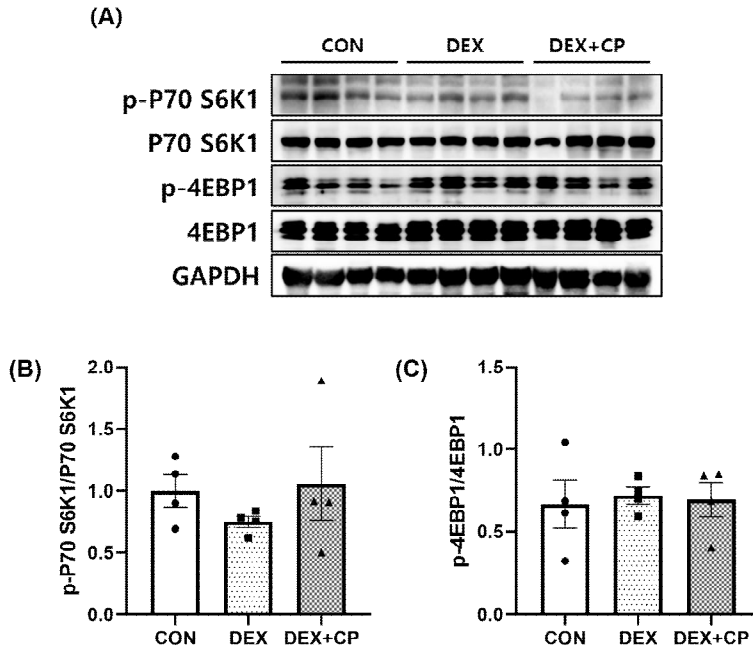


Figure 17. The protein expression of muscle protein synthesis in gastrocnemius muscle.

(A) Representative images western blot analysis of gastrocnemius muscle. Quantification of the phosphorylated level of (B) P70 S6K1 and (C) 4EBP1. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; ns (not shown). CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

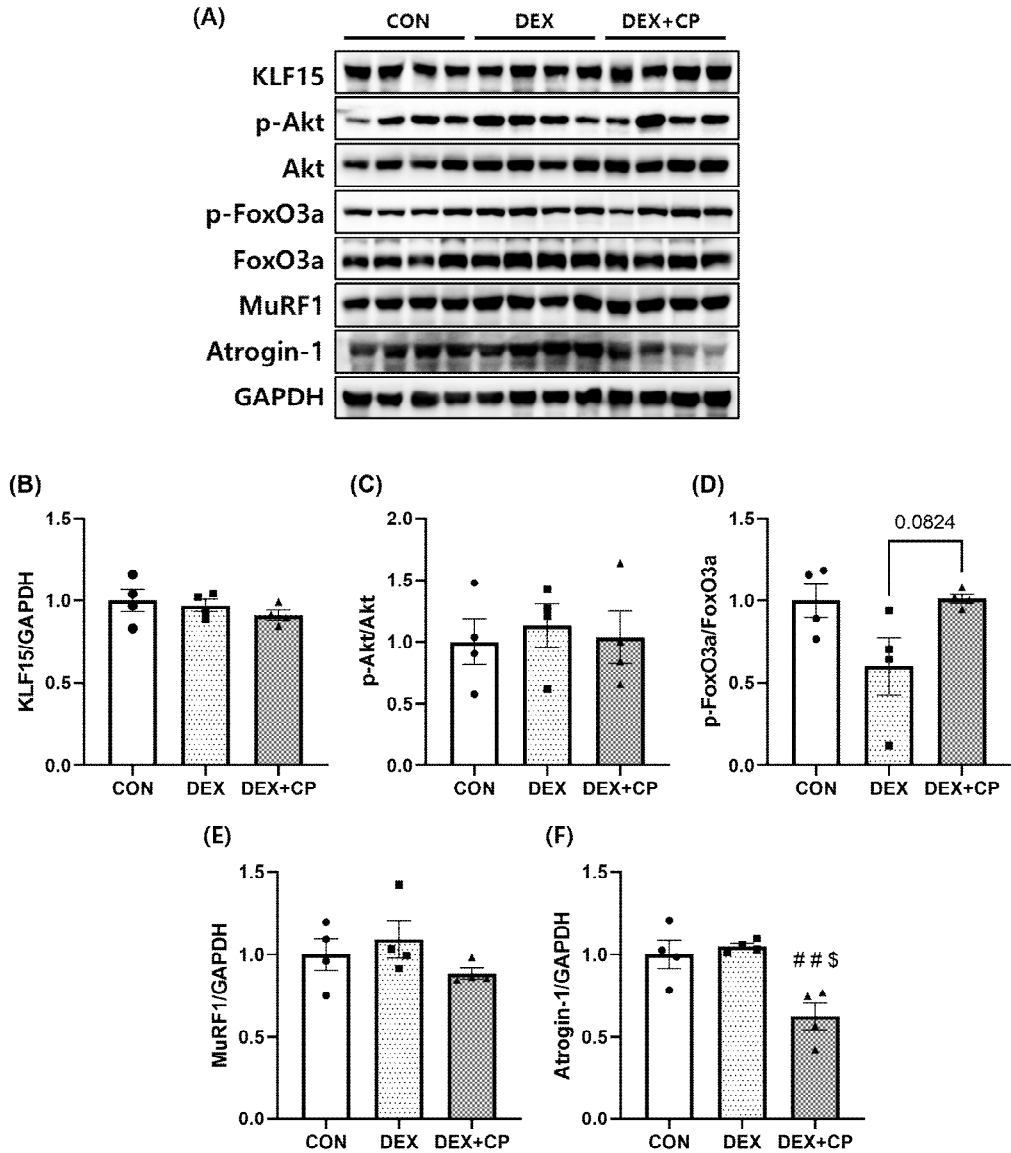


Figure 18. The protein expression of KLF15 and Akt/FoxO3a pathway in gastrocnemius muscle.

(A) Representative images western blot analysis of gastrocnemius muscle. The protein level of (B) KLF15, (C) p-Akt/Akt, (D) p-FoxO3a/FoxO3a, (E) MuRF1, and (F) Atrigin-1. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX + CP vs. DEX; $^{\#}P < .05$, $^{\#\#}P < .01$. DEX + CP vs. CON; $^{\$}P < .05$. CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

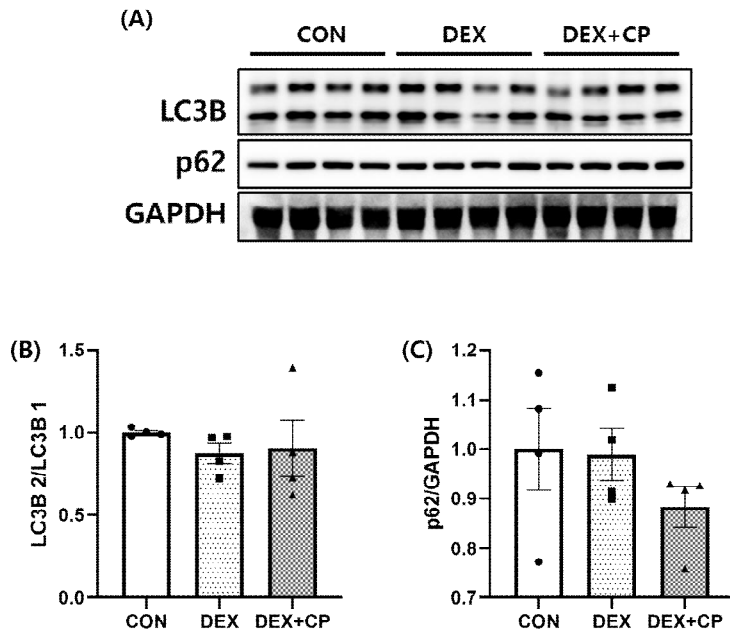


Figure 19. The protein expression of autophagy in gastrocnemius muscle.

(A) Representative images western blot analysis of gastrocnemius muscle. The protein level of (B) LC3B and (C) p62. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; ns (not shown). CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

나. Quadriceps muscle에서 C-peptide의 단백질 발현 조절

Quadriceps muscle에서 단백질 발현 분석 결과, 근육 합성과 관련된 p-P70 S6K1/P70 S6K1과 p-4EBP1/4EBP1의 발현은 그룹 간 차이를 나타내지 않았다 (Figure 20). 근위축 관련 마커인 KLF15와 p-Akt/Akt는 그룹 간 차이를 나타내지 않았다. FoxO3a의 인산화는 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 감소하였고 DEX+CP 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. MuRF1의 발현은 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 증가하였고 DEX + CP 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. Atrogin-1은 DEX + CP 그룹에서 CON 그룹과 DEX 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다 (Figure 21). Autophagy 관련 마커인 LC3B와 p62는 그룹 간 차이를 나타내지 않았다 (Figure 22).

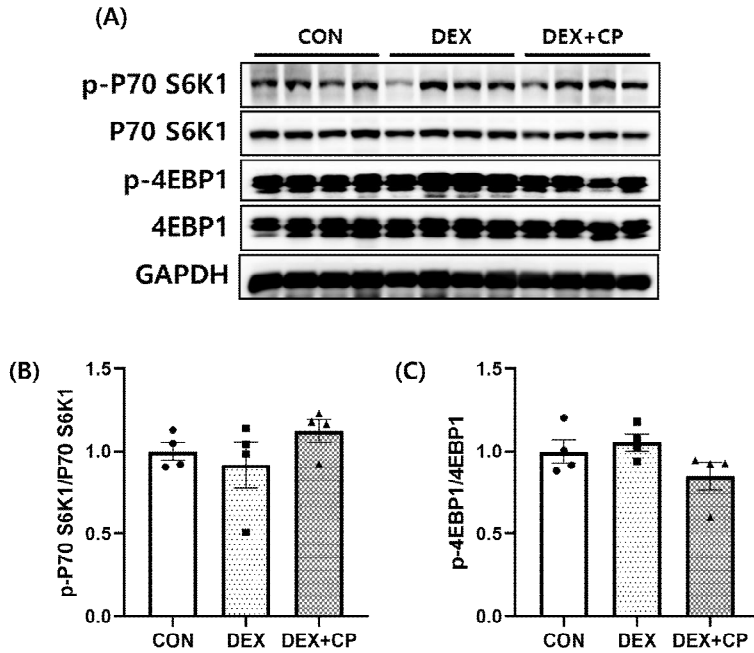


Figure 20. The protein expression of protein synthesis in quadriceps muscle.

(A) Representative images western blot analysis of quadriceps muscle. Quantification of the phosphorylated level of (B) P70 S6K1 and (C) 4EBP1. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; ns (not shown). CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

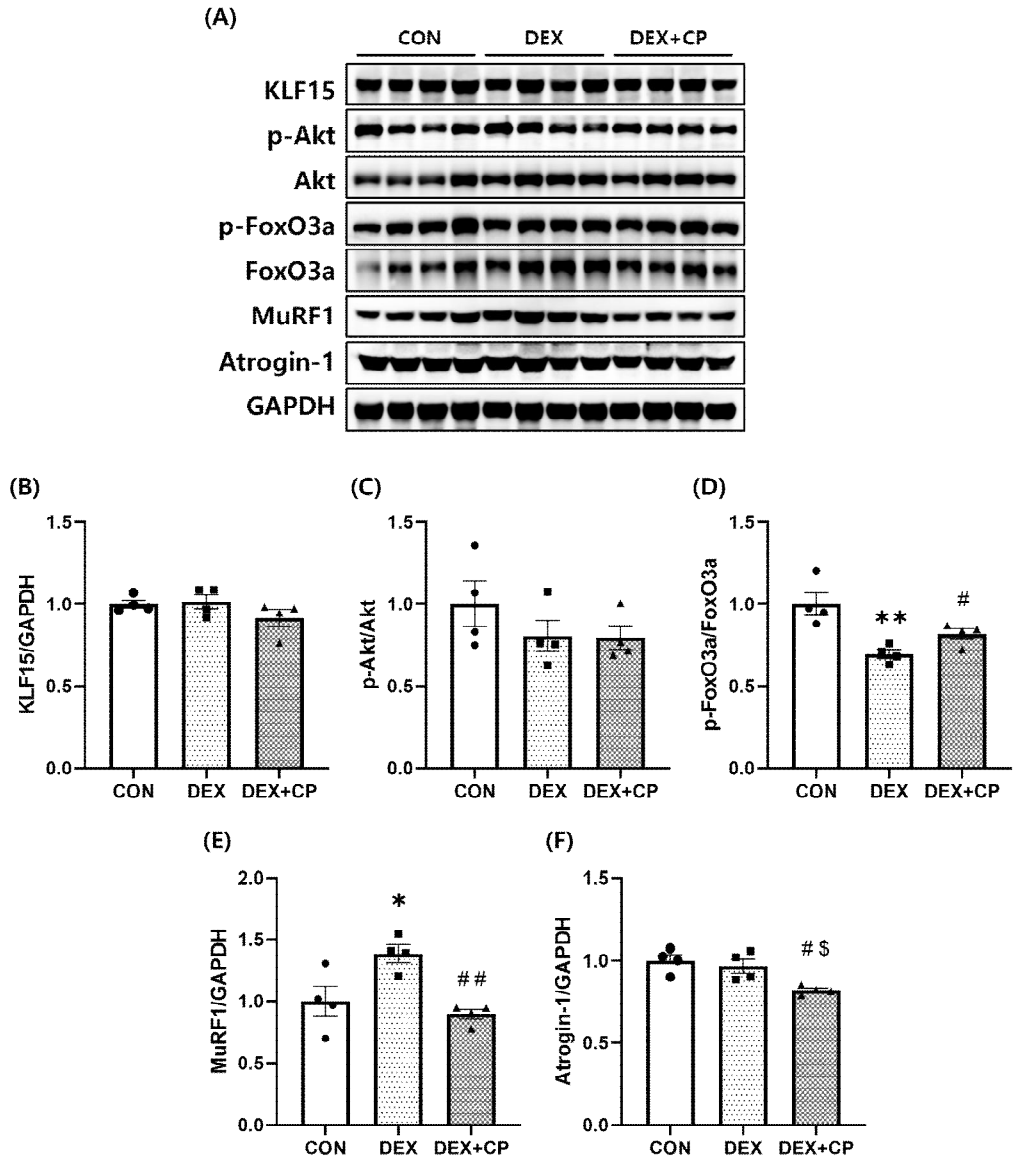


Figure 21. The protein expression of KLF15 and Akt/FoxO3 pathway in quadriceps muscle.

(A) Representative images western blot analysis of quadriceps muscle. The protein level of (B) KLF15, (C) p-Akt/Akt, (D) p-FoxO3a/FoxO3a, (E) MuRF1, and (F) Atrogin-1. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; DEX vs. CON; * $P < .05$, ** $P < .01$. DEX + CP vs. DEX; # $P < .05$, ## $P < .01$. DEX + CP vs. CON; \$ $P < .05$. CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

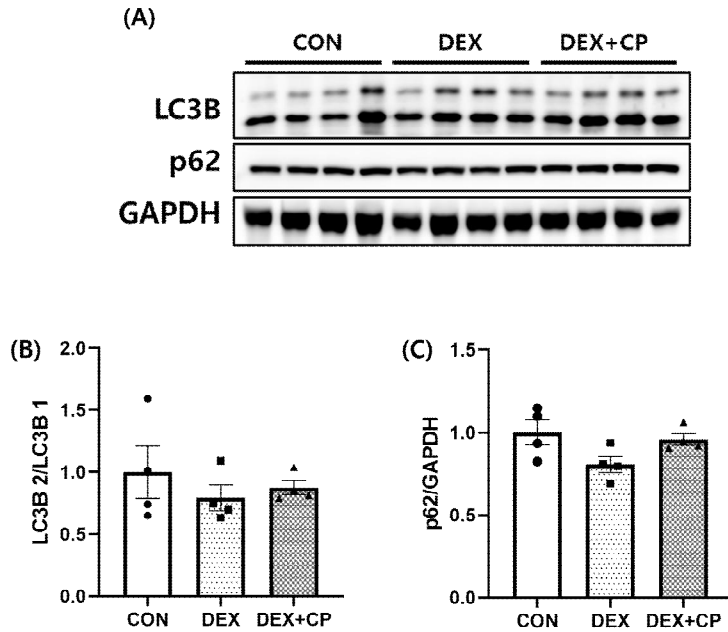


Figure 22. The protein expression of autophagy in quadriceps muscle.

(A) Representative images western blot analysis of quadriceps muscle. The protein level of (B) LC3B and (C) p62. Data are Mean \pm S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test.; ns (not shown). CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP, dexamethasone + C-peptide group.

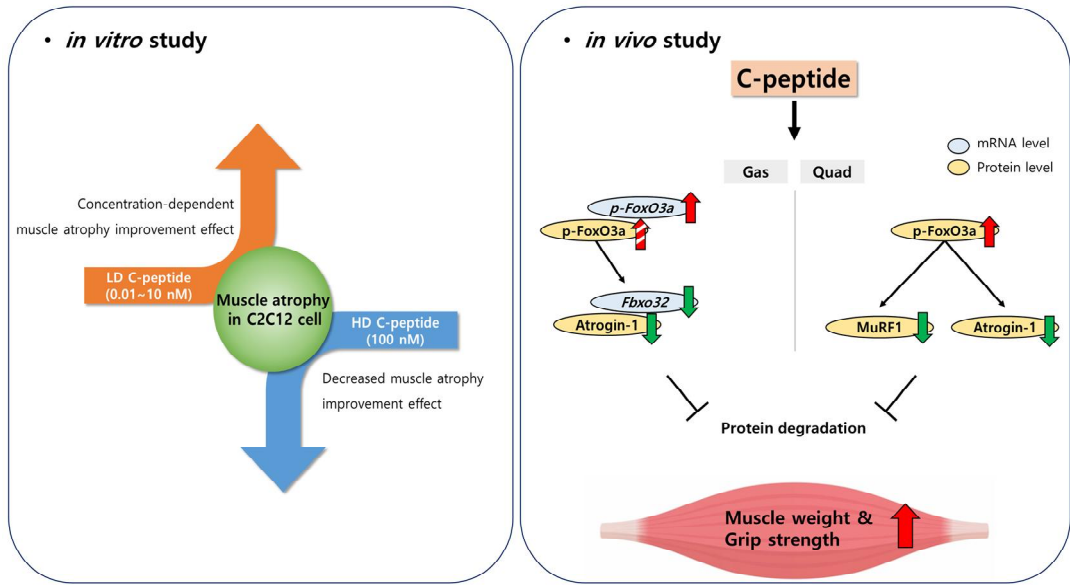


Figure 23. The summarized effect of C-peptide in this study.

LD, Low dose; HD, High dose; Gas, gastrocnemius muscle; Quad, quadriceps muscle; CON, control group; DEX, dexamethasone group; DEX + CP; dexamethasone + C-peptide group.

제4장 고찰 및 결론

골격근은 우리 몸을 구성하는 근육으로, 신체활동을 수행하고 체온을 유지한다. 또한 인체의 주요한 에너지 대사 조직으로서, 근육 손실과 기능 저하는 삶의 질을 현저히 감소시킨다 [1-3]. 근위축증은 근육 단백질 합성과 분해의 불균형으로 인해 발생하며, 기아나 노화뿐만 아니라 급격한 부상이나 약물 및 여러 만성질환에 의한 부작용으로 발생할 수 있다 [6-8]. 근육의 합성과 분해를 조절하는 기전은 ubiquitin proteasome system, IGF-1/PI3K/Akt pathway 및 autophagy 등이 알려져 있다 [9-13]. 이처럼 조절 기전이 다양하고 발병 시 삶의 질을 크게 저하시키는 근위축증은 아직까지 치료제가 개발되지 않아 진행을 늦추거나 개선을 위한 물질 개발이 필요하다.

한편, C-peptide는 proinsulin을 연결하는 connecting peptide로, 췌장 β -세포 기능을 평가할 수 있는 유용한 지표로 사용되고 있다 [16-19]. 최근 연구를 통해 C-peptide가 여러 당뇨병성 합병증의 개선에 대한 효과를 포함한 다양한 생리활성 기능이 보고되어왔다 [20-26]. 그중 C-peptide의 PI3K 활성화 효과에 관한 선행연구에 따라 C-peptide가 근위축증 발생 기전인 IGF-1/PI3K/Akt pathway를 활성화하여 근육 단백질 합성 증가 및 분해 저해 효과를 나타낼 가능성이 있을 것으로 가설을 수립하였다. C-peptide의 근위축증 개선 효과에 대한 가설을 세움에 따라 DEX로 유발된 근위축증 모델에서 C-peptide의 농도별 생리활성을 확인하고 근육 조절 기전을 규명하고자 본 연구를 진행하였고 본 연구 결과를 Figure 23에 요약하여 나타내었다.

근위축과 관련한 많은 세포실험 연구에서 DEX 처리된 C2C12 근관이 근위축으로 인해 세포 생존력, 근관 지름, MHC 염색 영역 및 fusion index의 상당한 감소를 나타내는 것으로 나타났다 [14, 15, 28]. 본 연구에서 DEX로 근위축이 유도된 C2C12 myotube에 C-peptide 1nM 처리 시 MHC 염색 영역의 증가와 differentiation index와 fusion index의 증가를 나타내었다. 하지만, C-peptide 100nM 처리 시 MHC 발현이 오히려 감소하여 DEX 그룹에 비해 fusion index의 증가를 보이지 않았다. 근육 특이적 E3 ubiquitin ligase인 MuRF1과 Atrogin-1의 발현 또한 C-peptide 저농도 (0.01~10nM) 처리 시 농도 의존적으로 감소를 나타내었으나, 고농도 (100nM)에서는 DEX 그룹보다 높거나 비슷한 수준을 나타내었

다. 게다가 DM + CP100 그룹에서도 DM 그룹에 비해 MuRF1과 Atrogin-1의 발현 증가를 나타내었다. 이 결과는 세포 수준에서 C-peptide는 10nM 농도 이하에서 근위축 저해 효능을 나타내고, 그보다 높은 농도인 100nM에서는 오히려 근위축을 유도함을 시사한다. 이러한 물질 고농도에서 근위축 효과 역전은 Li Chen 등의 선행연구 결과에서도 나타난 바 있다 [29].

생체 내에서 C-peptide의 효과를 평가하기 위해 실험동물에 DEX와 C-peptide를 동시에 투여한 후 CON 그룹 및 DEX 그룹과 비교 분석하였다. 실험동물의 체중은 DEX 그룹에서 CON 그룹에 비해 실험 4일 차부터 유의적인 감소를 보였다. DEX + CP 그룹은 DEX 그룹에 비해 실험 8일 차부터 유의적으로 높은 체중을 나타내었다. 이러한 DEX 그룹과 DEX + CP 그룹의 체중 차이는 DEX와 C-peptide 동시 투여로 인해 DEX로 인한 체중감소를 C-peptide가 저해했음을 시사한다. 근육의 기능을 평가하기 위한 악력 측정 결과, DEX 그룹에서 유의적으로 감소한 악력이 DEX + CP 그룹에서 증가하는 경향을 보여 C-peptide의 근육 기능 개선 효과를 나타내었다.

근육조직의 중량은 tibialis anterior muscle을 제외한 gastrocnemius muscle과 quadriceps muscle에서 모두 DEX + CP 그룹에서 DEX 그룹에 비해 유의적으로 큰 중량을 나타내었다. 한편, 단위 체중당 근육조직 중량은 그룹 간 유의적인 차이를 나타내지 않았는데, 이는 근육조직 중량 증가에 따라 체중도 함께 증가했기 때문이라고 사료된다.

그룹 간 조직 중량에 유의적인 차이를 보인 gastrocnemius muscle과 quadriceps muscle의 CSA 측정 결과, 두 근육조직 모두 DEX에 의해 감소한 경향을 나타내거나 유의적으로 감소하였고 DEX + CP 그룹은 DEX 그룹에 비해 유의적으로 증가하여 CSA의 개선을 통해 C-peptide가 DEX로 유도된 근섬유 위축을 저해함을 나타내었다. 한편, 반감기가 20~30분으로 짧은 C-peptide의 특성상 하루 1번 복강 주사 시 일정한 혈중 농도 유지가 어려움에 따라, 혈청 C-peptide 농도는 그룹 간 차이를 나타내지 않았다.

선행연구에서 보고된 DEX로 유도된 근위축증에서 CON 그룹에 비해 실험동물의 체중, 악력 및 근육조직의 CSA의 감소를 본 연구에서도 확인하였다 [29, 30]. 반면, DEX와 C-peptide 동시 투여 시 DEX 그룹에 비해 체중, 악력 및 근육조직의 CSA가 증가하여 CON 그룹과 비슷한 수준을 나타내었다. 이를 통해 C-peptide가 DEX 유도 근위축증에 의한 근육 기능 저하와 근육섬유의 위축 개선 효과를 확인하였다.

이어서 gastrocnemius muscle과 quadriceps muscle에서 C-peptide의 작용기전을 규명하기 위해 Real Time-qPCR과 western blot을 진행하였다. 먼저, gastrocnemius muscle에서 mRNA 발현을 분석한 결과, CON 그룹에 비해 DEX 투여로 근위축에 따른 유의적인 mRNA 발현 변화를 나타내지 않았다. 반면, DEX + CP 그룹은 *Klf15*, *Foxo3a*, *Fbxo32*의 발현이 CON 그룹과 DEX 그룹에 비해 감소하였다. 또한 gastrocnemius muscle에서 단백질 발현 수준 분석 결과, FoxO3a의 인산화가 DEX 그룹에 비해 DEX + CP 그룹에서 증가하는 경향 ($P=0.0824$)을 보였고, Atrogin-1의 발현은 DEX + CP 그룹에서 나머지 두 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 단백질 합성 관련 마커의 발현은 그룹 간 차이를 나타내지 않았다. Autophagy 관련 mRNA와 단백질 발현 또한 그룹 간 차이를 나타내지 않았다.

Quadriceps muscle에서 mRNA 발현 분석 결과, 모든 마커에서 그룹 간 차이를 나타내지 않았다. 단백질 발현 수준은 autophagy 관련 마커에서는 그룹 간 차이를 보이지 않았지만, CON 그룹에 비해 DEX 그룹에서 감소한 FoxO3a의 인산화가 DEX + CP 그룹에서 증가하였다. 이에 따라 MuRF1의 발현이 DEX 그룹에 비해 DEX + CP 그룹에서 유의적으로 감소하였고 Atrogin-1은 DEX + CP 그룹에서 나머지 두 그룹에 비해 유의적으로 감소하였다. 이 결과를 통해 DEX + CP 그룹에서 두 근육조직 모두 Atrogin-1의 발현이 감소하여 근위축증 개선 효과를 나타냄을 확인하였다.

결론적으로, DEX로 유도된 근위축증에서 C-peptide에 의한 체중, 악력, 근육조직 중량 및 CSA의 개선은 FoxO3a의 인산화를 통해 ubiquitin proteasome system 중 근육 특이적 E3 ubiquitin ligase, 특히 Atrogin-1 발현의 하향 조절로 인한 것으로 확인되었다. 한편, 근육 조절 경로 중 하나인 autophagy 관련 인자의 유전자 발현과 단백질 발현은 두 근육조직에서 모두 그룹 간 차이를 나타내지 않아 C-peptide는 autophagy에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

본 연구는 근육세포과 실험동물을 이용하여 DEX로 유발된 근위축증에서 human C-peptide의 효과에 대한 형태학적, 생화학적, 분자생물학적 분석을 수행하였다. C-peptide의 근육 조절 관련 선행 연구가 거의 전무한 상황에서 분자생물학적 분석을 통해 근육 조절 기전을 규명하여 C-peptide의 근위축증 제어 생리활성 물질로서 가능성을 확인하였다. 또한 이는 추후 당뇨병성 근위축증에 대한 C-peptide의 효능 평가 연구에 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

제5장 참고문헌

- (1) FRONTERA, Walter R.; OCHALA, Julien. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 2015, 96: 183-195.
- (2) WOLFE, Robert R. The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*, 2006, 84.3: 475-482.
- (3) SCHIAFFINO, Stefano, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal*, 2013, 280.17: 4294-4314.
- (4) BODINE, Sue C.; BAEHR, Leslie M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2014, 307.6: E469-E484.
- (5) YIN, Lin, et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacological research*, 2021, 172: 105807.
- (6) COHEN, Shenhav; NATHAN, James A.; GOLDBERG, Alfred L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nature reviews Drug discovery*, 2015, 14.1: 58-74.
- (7) BODINE, Sue C. Disuse-induced muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2013, 45.10: 2200-2208.
- (8) WANG, Yanan, et al. Nutraceuticals in the Prevention and Treatment of the Muscle Atrophy. *Nutrients*, 2021, 13.6: 1914.
- (9) BONALDO, Paolo; SANDRI, Marco. Cellular and molecular mechanisms of

- muscle atrophy. *Disease models & mechanisms*, 2013, 6.1: 25-39.
- (10) ROM, Oren; REZNICK, Abraham Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 98: 218-230.
- (11) MCKINNELL, Iain W.; RUDNICKI, Michael A. Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell*, 2004, 119.7: 907-910.
- (12) PARZYCH, Katherine R.; KLIONSKY, Daniel J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 2014, 20.3: 460-473.
- (13) SANDRI, Marco. Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2010, 298.6: C1291-C1297.
- (14) SCHAKMAN, Olivier, et al. Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Hormone Research in Paediatrics*, 2009, 72.Suppl. 1: 36-41.
- (15) SCHAKMAN, Olivier, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2013, 45.10: 2163-2172.
- (16) WAHREN, J.; EKBERG, K.; JÖRNVALL, H. C-peptide is a bioactive peptide. *Diabetologia*, 2007, 50: 503-509.
- (17) BLOCK, Marshall B., et al. Circulating C-peptide immunoreactivity: studies in normals and diabetic patients. *Diabetes*, 1972, 21.10: 1013-1026.
- (18) POLONSKY, K. S., et al. Use of biosynthetic human C-peptide in the

- measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. *The Journal of clinical investigation*, 1986, 77.1: 98-105.
- (19) WAHREN, John, et al. Role of C-peptide in human physiology. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 2000, 278.5: E759-E768.
- (20) AL-RASHEED, N. M., et al. Potent activation of multiple signalling pathways by C-peptide in opossum kidney proximal tubular cells. *Diabetologia*, 2004, 47: 987-997.
- (21) GALUSKA, Dana, et al. C-peptide increases Na, K-ATPase expression via PKC-and MAP kinase-dependent activation of transcription factor ZEB in human renal tubular cells. *PloS one*, 2011, 6.12: e28294.
- (22) WALLERATH, Thomas, et al. Stimulation of endothelial nitric oxide synthase by proinsulin C-peptide. *Nitric Oxide*, 2003, 9.2: 95-102.
- (23) KAMIYA, Hideki, et al. C-Peptide reverses nociceptive neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2006, 55.12: 3581-3587.
- (24) JOHANSSON, B. -L.; SJÖBERG, S.; WAHREN, J. The influence of human C-peptide on renal function and glucose utilization in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 1992, 35: 121-128.
- (25) JOHANSSON, B. -L.; LINDE, B.; WAHREN, J. Effects of C-peptide on blood flow, capillary diffusion capacity and glucose utilization in the exercising forearm of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 1992, 35: 1151-1158.
- (26) SIMA, A. A. F., et al. C-peptide prevents and improves chronic Type I

- diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat. *Diabetologia*, 2001, 44: 889–897.
- (27) HÖRBER, Sebastian, et al. Harmonization of immunoassays for biomarkers in diabetes mellitus. *Biotechnology advances*, 2020, 39: 107359.
- (28) KIM, Jae-Yong, et al. Salvia plebeia R. Br. and Rosmarinic Acid Attenuate Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy in C2C12 Myotubes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24.3: 1876.
- (29) CHEN, Li, et al. Matrine improves skeletal muscle atrophy by inhibiting E3 ubiquitin ligases and activating the Akt/mTOR/FoxO3a signaling pathway in C2C12 myotubes and mice. *Oncology reports*, 2019, 42.2: 479–494.
- (30) LEE, Hyunjung, et al. Chrysanthemum zawadskil Herbich attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy through the regulation of proteostasis and mitochondrial function. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 136: 111226.