



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  
석사학위논문

제2형 당뇨병 마우스의  
골격근 위축에 대한  
C-peptide의 효과

조선대학교 대학원

식품영양학과

최 은 원

제2형 당뇨병 마우스의  
골격근 위축에 대한  
C-peptide의 효과

The effects of C-peptide on skeletal muscle atrophy  
in type 2 diabetic mice

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

식품영양학과

최 은 원

제2형 당뇨병 마우스의  
골격근 위축에 대한  
C-peptide의 효과

지도교수 최 지 영

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

식품영양학과

최 은 원

## 최은원의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 주 민 (인)

위 원 조선대학교 교수 최 지 영 (인)

위 원 조선대학교 교수 판 정 훈 (인)

2023년 5월

조선대학교 대학원

## 목 차

LIST OF TABLES .....	V
LIST OF FIGURES .....	VI
ABSTRACT .....	VIII
제1장 서론 .....	1
제1절 연구 배경 .....	1
1. 제2형 당뇨병과 근위축증 .....	1
2. 근위축증의 발생기전 .....	2
3. C-peptide .....	3
제2절 연구 목적 .....	5
제2장 실험 재료 및 방법 .....	6
제1절 C-peptide .....	6
제2절 실험동물 및 사육 .....	7
1. 실험동물 및 사육 방법 .....	7
2. Grip strength test .....	9
3. 혈액 및 장기 채취 .....	9
제3절 형태학적 분석 .....	10
1. Hematoxylin & Eosin (H&E) staining .....	10
2. Cross Sectional Area (CSA) 측정 .....	10
제4절 생화학적 분석 .....	11

1. 혈청 C-peptide 농도 측정 .....	11
제5절 분자생물학적 분석 .....	12
1. Western blot .....	12
제6절 통계학적 분석 .....	14
제7절 Transcriptome analysis using next-generation sequencing (mRNA-seq) .....	15
1. RNA의 분리 .....	15
2. Library 준비 및 Sequencing 진행 .....	15
3. 데이터 분석 과정 .....	16
4. Differential expression of genes (DEGs) 분석 .....	16
제3장 실험 결과 .....	18
제1절 C-peptide 처리에 의한 근육량 및 근육 기능 개선 효과 조사 .....	18
1. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 체중 변화 .....	18
2. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 공복혈당 수준 변화 .....	20
3. Control mice 및 <i>db/db</i> mice의 혈청 C-peptide 농도 .....	21
4. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 부고환 지방 조직 및 간 조직 무게 변화 .....	22
5. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 grip strength 변화 .....	24

6. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 주요 근육량 변화.....	25
7. C-peptide 처리에 따른 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 근섬유 크기 변화 (H&E staining analysis).....	29
가. Gastrocnemius muscle의 횡단 면적 분포.....	29
나. Tibialis anterior muscle의 횡단 면적 분포.....	32
8. C-peptide 처리에 따른 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 근육 분해 관련 단백질 발현.....	35
9. C-peptide 처리에 따른 control mice 및 <i>db/db</i> mice의 근육 합성 관련 단백질 발현.....	37
제2절 C-peptide 처리에 의한 전사체 발현 조사.....	40
1. CON_CH vs CON_PBS 와 <i>db/db</i> _CH vs <i>db/db</i> _PBS 사이 전사체 발현 변화.....	40
가. 유전자 발현 비교 분석.....	40
나. Gene ontology (GO) 분석.....	43
2. 제2형 당뇨와 C-peptide 처리 사이 전사체 발현 변화....	48
가. 유전자 발현 비교 분석.....	48
나. Gene ontology (GO) 분석.....	50
 제4장 고찰.....	 53
 제5장 결론.....	 56



제6장 참고문헌 ..... 57

## LIST OF TABLES

Table 1. Western blot antibody.....	13
Table 2. Total RNA concentration and purity.....	17
Table 3. The number of DEGs identified in different comparisons among the groups of CON_PBS, CON_CH, <i>db/db</i> _PBS, and <i>db/db</i> _CH.....	41
Table 4. List of biological process categories of up-regulated genes in CON_CH vs CON_PBS.....	44
Table 5. List of biological process categories of down-regulated genes in CON_CH vs CON_PBS.....	45
Table 6. List of biological process categories of up-regulated genes in <i>db/db</i> _CH vs <i>db/db</i> _PBS.....	46
Table 7. List of biological process categories of down-regulated genes in <i>db/db</i> _CH vs <i>db/db</i> _PBS.....	47
Table 8. List of biological process categories of contra-regulated genes in <i>db/db</i> _PBS vs CON_PBS and <i>db/db</i> _CH vs <i>db/db</i> _PBS.....	51

## LIST OF FIGURES

Figure 1. The structure of C-peptide. ....	4
Figure 2. Experimental design. ....	8
Figure 3. Changes in the body weight with C-peptide treatment for 4 weeks. ....	19
Figure 4. Changes in the fasting blood glucose concentration with C-peptide treatment for 4 weeks. ....	20
Figure 5. Serum C-peptide concentration in control mice and <i>db/db</i> mice. ....	21
Figure 6. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on organ weight in control mice and <i>db/db</i> mice. ....	23
Figure 7. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on grip strength in control mice and <i>db/db</i> mice. ....	24
Figure 8. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on quadriceps muscle weight in control mice and <i>db/db</i> mice. ....	26
Figure 9. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on gastrocnemius muscle weight in control mice and <i>db/db</i> mice. ....	27
Figure 10. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on tibialis anterior muscle weight in control mice and <i>db/db</i> mice. ....	28
Figure 11. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on gastrocnemius muscle	

histological analysis in control mice and *db/db* mice. .... 30

Figure 12. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on gastrocnemius muscle fiber distribution in control mice and *db/db* mice. .... 31

Figure 13. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on tibialis anterior muscle histological analysis in control mice and *db/db* mice. .... 33

Figure 14. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on tibialis anterior muscle fiber distribution in control mice and *db/db* mice. .... 34

Figure 15. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on protein expression level related to protein degradation in tibialis anterior muscle of control mice and *db/db* mice. .... 36

Figure 16. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on protein expression level related to protein synthesis in tibialis anterior muscle of control mice and *db/db* mice. .... 38

Figure 17. Summarized molecular action of C-peptide in the muscle of control mice and *db/db* mice. .... 39

Figure 18. Volcano plots visualization of the DEGs in different groups. .... 42

Figure 19. Venn diagram visualization of the DEGs in different groups. .... 49

Figure 20. The heat map of contra-regulated genes in *db/db*\_PBS vs CON\_PBS and *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS. .... 52

## ABSTRACT

### The effects of C-peptide on skeletal muscle atrophy in type 2 diabetic mice

Eunwon Choi

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

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

Type 2 diabetes mellitus is a chronic metabolic disease characterized by hyperglycemia caused by impaired insulin secretion and increased insulin resistance. Type 2 diabetes patients account for 90% of the total diabetic population. Muscle atrophy is one of the complications of Type 2 diabetes. Muscle atrophy occurs when protein degradation exceeds protein synthesis. In diabetic conditions, muscle loss can lead to a decline in physical function and a decrease in the quality of life. However, as of now, exercise therapy is the only known treatment for muscle atrophy. C-peptide is secreted in equimolar amounts with insulin from the pancreas when proinsulin is cleaved into insulin and C-peptide. C-peptide has been reported to have various biological functions, but its effects of on muscle tissue are unknown.

Therefore, in this study, we investigated the effects of C-peptide on skeletal muscle atrophy in both normal mice (C57BL/6J) and type 2 diabetic mice (*db/db*). We treated normal mice and type 2 diabetic mice with low and high concentrations of C-peptide, and the untreated group was administered an equivalent amount of saline. As a result, there were no changes in the weight and the weight of organ tissues caused by C-peptide in all mice. Additionally,

there were no significant differences in fasting blood glucose concentrations and serum C-peptide concentrations with vehicle and C-peptide treatment group. On the other hand, the grip strength was significantly improved in the mice treated with a high dose of C-peptide compared to the control group. Moreover, the tibialis anterior muscles were significantly increased by C-peptide injection in control mice. To elucidate the mechanisms supporting the observed improvements in muscle mass and function, a western blot experiment was conducted using the tibialis anterior muscle. The results of the experiment demonstrated that C-peptide increased the phosphorylation of Akt, which in turn blocked the nuclear translocation of Foxo, resulting in a significant reduction in the expression of major protein degradation markers such as MuRF1 and Atrogin-1. Additionally, phosphorylation of protein synthesis-related markers P70S6K and 4E-BP1 was significantly decreased in the *db/db* mice group, while C-peptide led to a marked elevation in the phosphorylation of P70S6K1 in both control and diabetic mice. In control mice, the phosphorylation of 4E-BP1 was significantly increased. In summary, while C-peptide did not show significant effects on muscle mass and function improvement, it inhibited muscle protein degradation in vivo and increased muscle protein synthesis in *db/db* mice. Moreover, C-peptide augmented muscle mass and function in normal conditions, inhibited protein degradation and increased protein synthesis. Furthermore, upon conducting transcriptome analysis, the common transcriptomic responses in both types of mice by C-peptide were found to be related to protein ubiquitination and inflammation-associated reactions. In conclusion, this study suggests that C-peptide may contribute to the improvement for muscle atrophy in type 2 diabetes and may help improve muscle mass and function in normal conditions.

# 제1장 서론

## 제1절 연구 배경

### 1. 제2형 당뇨병과 근위축증

제2형 당뇨병 (T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus)은 췌장에서 인슐린을 생산하지 못하여 발생하는 제1형 당뇨병과 달리 인슐린 (insulin)분비 기능은 남아있지만 인슐린 분비 장애와 인슐린 저항성 (insulin resistance)과 같은 유전적 요인과 비만, 과식, 영양부족 등의 환경적 요인이 복합적으로 작용하여 발병하는 질병이다 [1]. 제2형 당뇨병은 지속된 고혈당증 (hyperglycemia)을 특징으로 하며 당뇨 환자의 90% 이상을 차지하고 있다 [2].

대한당뇨병학회의 보고에 따르면 2018년 기준 대한민국 30세 이상 성인 중 당뇨병을 가진 사람은 494만 명이었으며, 연령별 분포는 30대는 24만 명, 40대는 71만 명이었다 [3]. 또한, 전 세계적으로 당뇨병의 유병률이 급속도로 증가하고 있다. 전 세계 성인 당뇨병 환자의 수는 1980년 1억 800만 명에서 2014년 4억 2,200만 명으로 증가하였으며, 국제당뇨병연맹은 2045년 당뇨병 환자의 수가 6억 9,300만 명으로 증가할 것으로 예상하고 있다 [4, 5].

당뇨병의 합병증으로는 신장병증 (nephropathy), 당뇨 망막병증 (diabetic retinopathy) 및 신경병증 (peripheral neuropathy)등을 포함한 다양한 합병증이 있다 [6, 7]. 근위축증은 제2형 당뇨병의 합병증 중 하나로 근육 단백질의 합성과 분해의 불균형에 의해 발생하고 단백질의 분해가 단백질 합성을 초과할 때 근육량의 손실이 일어나면서 발생한다 [8-10]. 또한, 근육의 장기간 비활성 또는 노화, 암, 당뇨병, 만성신장질환 등 다양한 요인에 의해 발생한다 [11]. 당뇨병 환자의 경우 정상인에 비해 근육 소실이 촉진되고 근육 단백질 합성 능력이 저하 되며 근육의 기능 저하가 가속화된다. 하지만 현재까지 당뇨병성 근위축증의 원인에 관한 메커니즘은 명확하게 규명되지 않았으며 당뇨병성 근위축증의 치료는 운동치료뿐이기에 당뇨병성 근위축증의 치료와 예방에 관한 연구는 아직 더 필요한 상황이다 [12-14].

당뇨병 상태에서 근육 손실은 신체 기능 저하 및 삶의 질 저하를 초래할 수 있다.

특히 고령의 제2형 당뇨병 환자의 경우 근육량, 근력 등 근육의 기능이 더 빠르게 감소한다 [15]. 이전 연구에서 제2형 당뇨병 환자는 정상적인 상태의 대상자에 비해 단백질 대사와 관련된 신호전달 경로의 주요 인자인 Protein kinase B (Akt)의 인산화 감소를 확인하였다 [16]. Akt 인산화의 감소는 Forkhead Box Protein (FoxO) 전사인자의 인산화의 감소로 이어져 FoxO 전사인자를 핵으로 translocation을 증가시킨다. FoxO 전사인자의 nuclear translocation은 근육 분해 마커인 Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1)과 Atrogin-1의 발현을 증가시켜 단백질의 분해를 초래하여 근육 소모를 증가시키고 근육 기능을 저하시킨다 [16-18]. 지속된 제2형 당뇨병의 근위축과 합병증은 결과적으로 의료비용의 급증과 사망률의 증가로 심각한 사회문제로 이어질 수 있으므로 당뇨병성 근위축증의 예방 및 개선 방안 모색이 필요하다 [19].

## 2. 근위축증의 발생기전

골격근은 신체활동이나 대사, 호르몬의 변화에 따라 그 크기나 질량이 증가하거나 감소한다. 노화나 당뇨, 근육의 비활성 등 여러 조건에 의해 발생하는 단백질 분해의 증가는 근육의 소모를 유발하게 된다 [20]. 주요 단백질 분해경로인 유비퀴틴-프로테아좀 시스템 (ubiquitin-proteasome system)은 근육 위축 시 활성화되어 근육량 손실에 기여한다 [21]. 유비퀴틴-프로테아좀 시스템에서 E3 유비퀴틴 리가아제 (E3 ubiquitin ligase)는 E2-컨쥬게이팅 (E2 ubiquitin conjugating) 효소와 상호작용하여, 유비퀴틴을 표적 단백질에 전달한다. 결과적으로 유비퀴틴화된 단백질이 생성되어 프로테아제 활성화에 의해 표적 단백질이 분해된다 [22].

FoxO는 에너지 대사 조절에 관여하며 골격근과 지방 조직 형성에도 관여한다 [23]. 잠재적 인산화 상태의 FoxO는 세포질에 존재하며 Akt는 FoxO1과 FoxO3a를 인산화하여 핵으로의 translocation을 막아 세포질에 유지하게 한다 [24]. 그러나 Akt의 탈인산화는 FoxO의 핵으로의 이동을 억제하지 못하고 이는 E3 유비퀴틴 리가아제인 MuRF1과 Atrogin-1의 전사를 유도하게 되어 근육 단백질의 분해를 일으키게 된다 [25].



### 3. C-peptide

C-peptide (C-peptide sequence: EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, molecular formula: C<sub>129</sub>H<sub>211</sub>N<sub>35</sub>O<sub>48</sub>, molecular weight: 3020.3)는 31개의 아미노산으로 구성된 peptide로 인슐린의 전구물질인 proinsulin의 알파 사슬과 베타 사슬을 연결하는 connecting peptide이다 [26-28]. C-peptide는 proinsulin이 인슐린과 C-peptide로 분해될 때 췌장 랑게르한스섬의 베타 세포에서 인슐린과 등몰량으로 분비된다 [29]. C-peptide는 항 인슐린 항체나 치료의 목적으로 투여된 외인성 인슐린의 영향을 받지 않아 지난 수십 년 동안 당뇨병에서 인슐린 분비 척도 및 췌장의 베타 세포 기능을 판단하는 지표로 사용되고 있다 [30, 31]. 과거에는 C-peptide가 생물학적으로 비활성인 것으로 간주되어왔다. 하지만 최근 연구에서는 C-peptide가 생체 내에서 다양한 생리활성 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 [32]. C-peptide의 생체 내 생리활성 효과로는 세포 내 칼슘 증가, PI-3-kinase activity 증가, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase의 활성화 stimulation, MAPK signaling activation 등 있다 [33-35]. 또한 췌장 베타 세포 기능의 결함으로 인한 고혈당 상태에서 C-peptide의 투여가 당뇨병에서 신경병증 (neuropathy) [36]과 신장질환 (nephropathy) [37], 폐섬유증 (pulmonary fibrosis) [38], 심혈관질환 (cardiovascular disease)과 상처 치유 (impaired wound healing) 등의 다양한 당뇨 합병증의 예방 또는 개선에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 [39, 40]. 하지만 근육 조직에서 C-peptide의 조절 메커니즘에 관한 연구는 거의 전무하다.

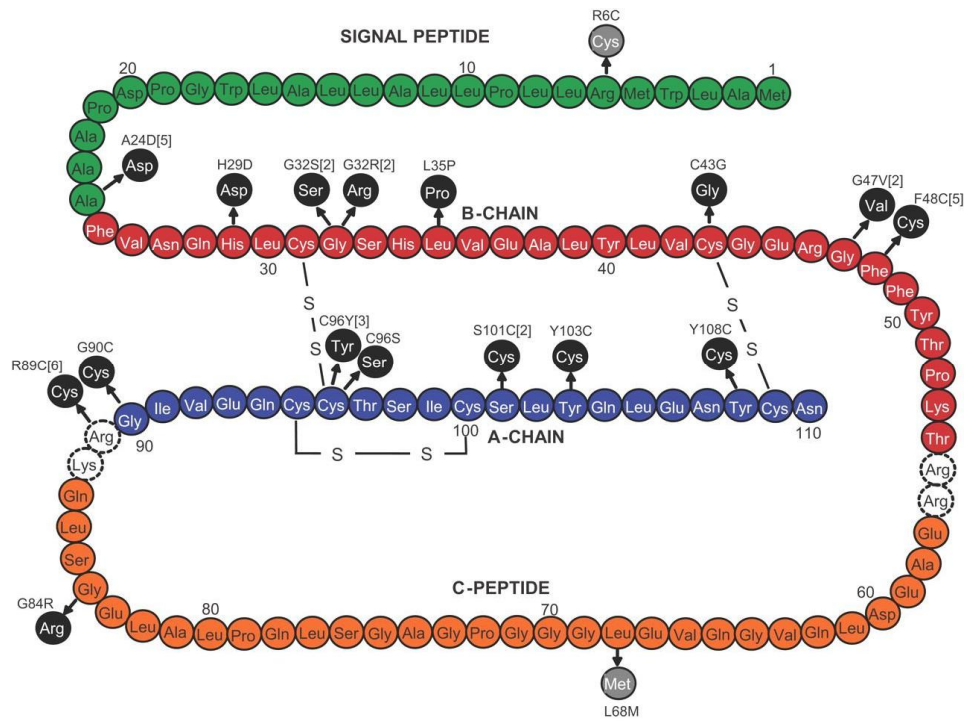


Figure 1. The structure of human C-peptide [26].

## 제2절 연구 목적

C-peptide는 지금까지 췌장의 베타 세포 기능을 평가하는 지표로 활용되고 있었으며, 최근 생체 내 다양한 생리적인 효과를 가지는 것으로 보고되었다 [41]. 하지만 근육 조직에서 C-peptide 영향에 관한 연구는 부족하다. 지금까지의 선행 연구 결과에 따르면 C-peptide는 활성산소 (reactive oxygen species)의 생성을 억제하고, 염증반응의 억제제로 작용하는 것으로 보고되었다 [42]. 활성산소와 염증성 사이토카인은 근육에서 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)와 FoxO 전사인자의 활성제로 작용하여 Atrogin-1과 MuRF1 등의 atrogenes의 발현을 통한 근육 단백질 감소를 유발한다 [43, 44]. 따라서 C-peptide에 의한 활성산소와 염증반응의 억제는 atrogenes의 발현에 의한 단백질 분해를 억제하여 당뇨병으로 인한 근위축 개선에 기여할 가능성이 높다. 또한, C-peptide에 의한 PI-3-kinase activity 증가가 보고되어, 이는 Akt 인산화 활성화에 의한 mTOR signaling의 조절과 FoxO 전사인자의 핵으로의 이동을 억제하여 atrogenes의 발현 조절에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다 [45].

따라서 본 연구에서는 C-peptide가 제2형 당뇨병 상태에서의 근육 단백질 조절을 통해 골격근 위축을 개선할 수 있다는 가설을 세워 4주간의 C-peptide 처리에 의한 제2형 당뇨병 마우스의 골격근 위축에 대한 C-peptide의 영향을 조사하였다.

## 제2장 실험 재료 및 방법

### 제1절 C-peptide

본 연구에서 사용된 C-peptide (human)는 Pepton (Daejeon, South Korea)에서 합성 및 구입하여 사용하였다. 가루 형태의 C-peptide를 1× Phosphate-Buffered Saline (Bioneer, Daejeon, South Korea)에 용해하여 사용하였다.

## 제2절 실험동물 및 사육

### 1. 실험동물 및 사육 방법

8주령 수컷 C57BL/6J 마우스 (n=24)와 제2형 당뇨병 마우스 모델인 BKS.Cg-Dock7<sup>m</sup> +/+ Lepr<sup>db</sup>/J (*db/db*) 마우스 (n=24)를 Saeron Bio (Uiwang, Gyeonggi, South Korea)로부터 구입하여 2주일간의 적응 기간 후, 10주령 마우스를 이용하여 실험을 진행하였다. 실험동물의 사육은 온도 (20-24℃)와 습도 (45-55%)가 조절되고 12시간 간격으로 명암이 조절되는 환경에서 일반 사료 (altromin spezialfutter GmbH & Co. KG, Germany)를 공급하였으며, 식수로 멸균수를 자유롭게 섭취하도록 (*ad libitum*)하였다.

적응 기간 후 일반 모델과 질환 모델을 C-peptide 처치 용량에 따라 음성대조군 (CON\_PBS, Control mice + Saline), 음성대조군 + 저용량 C-peptide 처치군 (CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide), 음성대조군 + 고용량 C-peptide 처치군 (CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide), 제2형 당뇨병 마우스군 (*db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline), 제2형 당뇨병 마우스군 + 저용량 C-peptide 처치군 (*db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide), 제2형 당뇨병 마우스군 + 고용량 C-peptide 처치군 (*db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide)으로 각 그룹당 8마리씩 난괴법 (randomized block design)으로 분류하였다 (Figure 2).

C-peptide를 저용량 그룹 (1mg/kg body weight), 고용량 그룹 (2mg/kg body weight)에 4주간 복강 내 주사하였다. C-peptide를 처리하지 않은 그룹의 경우 동량의 saline을 주사하였다.

모든 마우스의 체중은 매주 측정하였으며 공복혈당은 2주마다 측정하였다. 모든 동물실험은 이화여자대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았으며 규정에 따라 진행하였다 (IACUC 19-046).

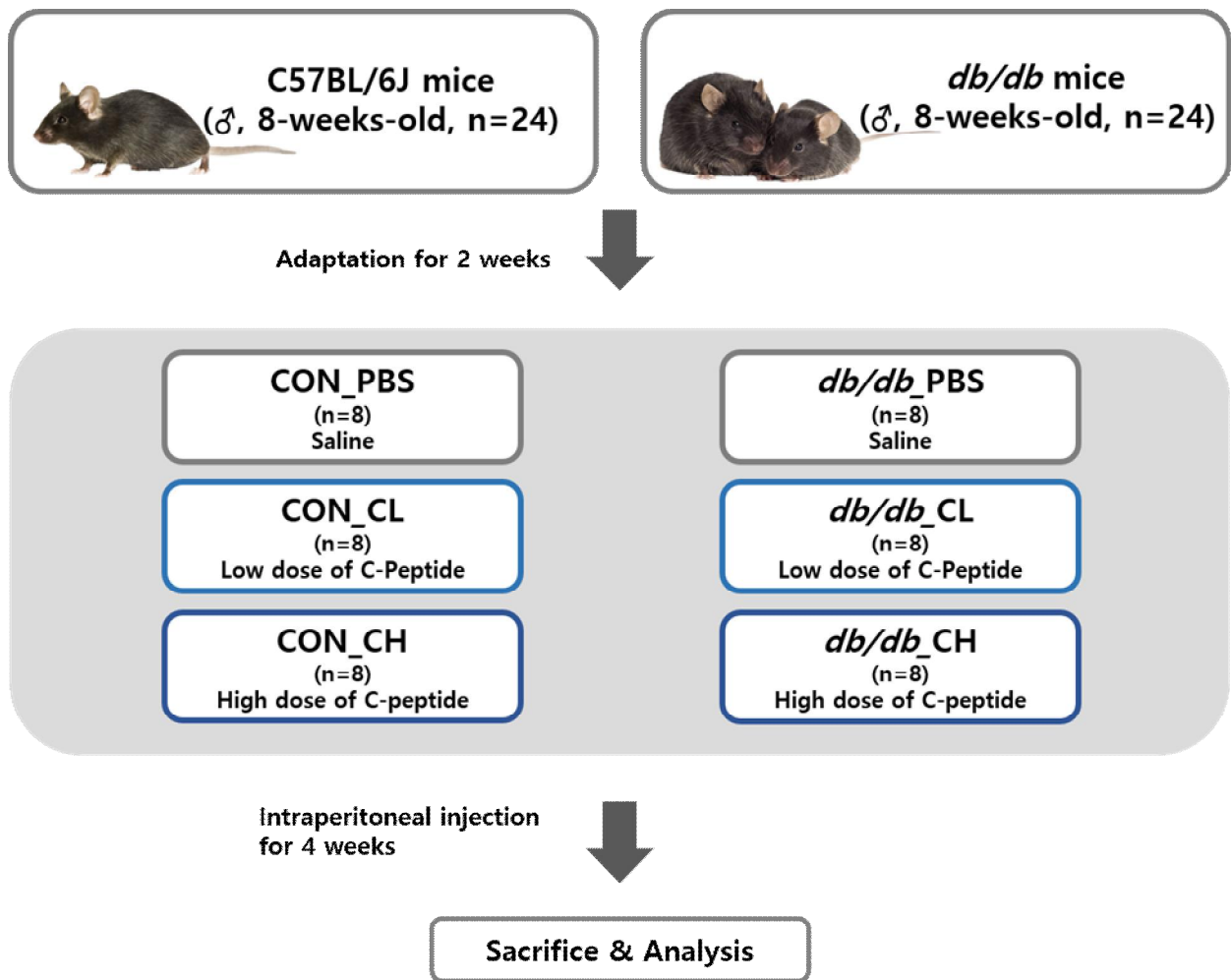


Figure 2. Experimental design.

CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide.

## 2. Grip strength test

모든 실험동물은 실험기기에 대한 2주간의 적응 기간을 가진 후 실험 종료 직전 grip strength test를 시행하였다. Grip strength test는 FGJN-5 (Nidec-Shimpo, Kyoto, Japan) 기기를 사용하여 측정 및 평가하였다. 각 그룹 마우스의 전체 다리 힘의 강도를 평가하기 위해 마우스를 grid 위에 올려두어 grid를 잡게 한 뒤 꼬리를 동일한 힘으로 잡아당겨 마우스가 grid를 놓을 때까지의 힘을 평가하였다. 각 마우스의 grip strength를 총 3회씩 측정하였고, 그중 최댓값을 통계 분석에 사용하였다. Grip strength는 힘을 최종 체중으로 나눈 값으로 계산되었다.

## 3. 혈액 및 장기 채취

실험 기간 종료 시 모든 마우스를 12시간 금식시킨 후 Zoletil/Rompun을 사용하여 마취시킨 후 희생하였다.

혈액은 복부 하대정맥 (inferior vena cava)에서 공복 혈액을 채취한 후, 원심분리 (3,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 혈청을 분리하였고, 시료 분석 시까지 -70°C에 보관하였다. 조직학적 분석을 위해 간, 근육 조직을 즉시 적출하여 생리식염수로 세척한 후 표면의 수분을 제거하여 칭량하였다. 근육 일부는 형태학적 분석에 사용하였고, 나머지 장기조직은 액체질소에 급속 냉동 후 시료 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

## 제3절 형태학적 분석

### 1. Hematoxylin & Eosin (H&E) staining

적출한 근육조직을 10% 포르말린 용액 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정하고 PBS로 세척 후 파라핀으로 포매하여 박절기를 이용하여 5 $\mu$ m 두께의 절편을 제작하여 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하였다. 염색된 조직은 현미경 (Motic, Carlsbad, CA, USA)으로 무작위로 선정하여 분석하였다.

### 2. Cross Sectional Area (CSA) 측정

근육의 횡단면 측정은 H&E 염색 부분을 사용하여 분석하였다. 염색된 부분은 현미경을 사용하여 검사 (200배 확대)하였다. 그 후, Image J 프로그램 (NIH, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 근섬유 횡단 면적을 측정하였다.



## 제4절 생화학적 분석

### 1. 혈청 C-peptide 농도 측정

모든 실험동물의 혈청 C-peptide의 농도는 희생 후 측정하였다. 수집한 혈액을 Mouse C-peptide ELISA kit (Alpco, Salem, NH, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실험을 진행하여 분석하였다. 혈청 C-peptide의 농도는 microplate spectrophometer (Bio Tek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다.

## 제5절 분자생물학적 분석

### 1. Western blot

근육 조직은 T-Per<sup>™</sup> Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), cOmplete<sup>™</sup> ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany), PhosSTOP EASYpack Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche, Germany)을 용해시킨 후 조직 0.1g 당 1ml Lysis Buffer를 첨가하여 원심분리 (12,000 rpm, 15 min, 4°C)를 통해 상층액을 수집하여 단백질을 분리하였다. 조직에서 추출한 단백질은 Bradford Assay에 따라 정량화하였다 [46].

이후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 단백질을 크기별로 분리하고, 분리된 단백질을 PVDF membrane으로 transfer 한 뒤 Ponceau S solution (GenDEPOT, Barker, TX, USA)을 사용하여 염색해 밴드의 위치를 확인하였다. 다음으로 5% skim milk (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)가 함유된 Tris-Buffered saline with Tween-20 (TBST, Biosolution, Suwon, South Korea)로 2시간 동안 blocking 후 각각의 1차 antibody를 4°C에서 밤새 반응시켰다 (Table 1). TBST buffer를 사용하여 10분간 3회 세척 후 antibody의 host에 따라 anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 혹은 anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (Cell Signaling Technology)로 반응시킨 후 TBST buffer를 사용하여 10분간 4회 세척하였다.

Antibody에 결합된 단백질들의 signal은 Westar antares ECL solution (Cyanagen, Bologna, Italy)을 사용하여 반응시킨 후 AZURE 300 Chemiluminescent Western Blot Imager (Azure biosystems, Dublin, CA, USA)를 이용하여 membrane을 촬영하였다. 촬영된 western blot 이미지들은 Image J 프로그램으로 측정하고 분석하였다.

Table 1. Western blot antibody.

Primary antibody	Primary antibody dilution	Secondary antibody	Secondary antibody dilution
GAPDH	1:5000	anti-mouse IgG	1:4000
p-Akt (Ser473)	1:250	anti-rabbit IgG	1:4000
Akt	1:1000	anti-rabbit IgG	1:4000
p-FoxO3a (Ser318/321)	1:500	anti-rabbit IgG	1:4000
FoxO3a	1:1000	anti-rabbit IgG	1:4000
Atrogin-1	1:500	anti-mouse IgG	1:4000
MuRF1	1:250	anti-mouse IgG	1:4000
p-P70S6K1 (Thr389)	1:500	anti-rabbit IgG	1:4000
P70S6K1	1:500	anti-rabbit IgG	1:4000
p-4E-BP1 (Thr37/46)	1:1000	anti-rabbit IgG	1:4000
4E-BP1	1:1000	anti-rabbit IgG	1:4000

GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; p-Akt, Phospho-Protein kinase B; Akt, Protein kinase B; p-FoxO3a, Phospho-Forkhead Box O3; FoxO3a, Forkhead Box O3; MuRF1, Muscle RING-finger protein-1; p-S6K1, Phospho-Ribosomal Protein S6 Kinase 1; S6K1, Ribosomal Protein S6 Kinase 1; p-4E-BP1, Phospho-Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; 4E-BP1, Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1.

GAPDH (Ab8245, Abcam, Cambridge, UK), p-Akt (9271, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), Akt (9272, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), p-FoxO3a (9465, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), FoxO3a (12829, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), MuRF1 (Sc-398608, Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA), Atrogin-1(Sc-166806, Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX, USA), p-P70S6K1 (9205, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), P70S6K1 (2708, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), p-4E-BP1 (2855, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 4E-BP1 (9644, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

## 제6절 통계학적 분석

모든 실험 결과의 통계분석은 GraphPad Prism 9 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) 프로그램을 사용하여 수행하였으며, 평균값 (Mean)  $\pm$  표준오차 (S.E.M)로 나타내었다. 각 그룹 간의 통계적 유의성 검정을 위하여 이원배치 분산분석법 (Two-way ANOVA)을 실시하여 분석하였고, Tukey's multiple range test를 실시하여 상호 간의 평균치를 검증하여,  $p < 0.05$  값을 통계적으로 유의미한 것으로 검증하였다.

## 제7절 Transcriptome analysis using next-generation sequencing (QuantSeq 3' mRNA-seq)

### 1. RNA의 분리

근육 조직 (Tibialis anterior muscle)에 QIAzol<sup>®</sup> Lysis Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA의 농도 및 순도는 Nabi UV/Vis NANO Spectrophotometer (MicroDigital, Pangyo, Gyeonggi, South Korea)를 사용하여 확인하였고 농도가 100ng/ $\mu$ l 이상이며 260/280 ratio가 1.8~2.0 범위 안에 있는 RNA를 사용하였다. RNA 품질은 RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)을 사용하여 Agilent 2100 bioanalyzer로 평가하였으며, RNA Integrity number (RIN) 값이 7 이상을 기준으로 선발했다 (Table 2).

### 2. Library 준비 및 sequencing 진행

RNA는 QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen, Inc., Vienna, Austria)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 library를 구성하였다. Library를 구성을 위해 각각의 RNA의 5' 말단에 Illumina 호환 서열을 포함하는 oligo-dT primer를 RNA에 혼합하여 역전사를 수행하였다. RNA template의 분해 후, 5' 말단에 Illumina 호환 링커 서열을 포함하는 무작위 primer에 의해 두 번째 가닥 합성을 시작하였다. 이중 가닥 library는 모든 반응 성분을 제거하기 위해 magnetic beads를 사용하여 정제되었고, 클러스터 생성에 필요한 complete adapter sequences를 추가하기 위해 library가 증폭되었다. Sequencing은 QuantSeq 3' mRNA-sequencing (QuantSeq)을 진행하였으며, QuantSeq은 3'UTR 부분만을 sequencing을 진행하는 방식으로 적은 양의 RNA를 통해 빠른 속도로 전사체 발현을 알 수 있는 장점이 있다. High-throughput sequencing은 NextSeq 500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 single-end 75 방식으로 수행되었다 (Illumina Inc.).

### 3. 데이터 분석 과정

QuantSeq 3' mRNA-Seq 판독은 Bowtie2에 따라 시행되었다 [47]. Bowtie2 index는 genome 서열 조립 또는 genome 및 전사체를 정렬하기 위한 대표적인 전사 서열로부터 생성되었다. 정렬된 파일은 전사체 조립, 차등 발현 유전자 검출에 사용하였고, 차등 발현 유전자는 Bedtools의 적용 범위를 사용하여 고유 및 다중 정렬의 계수를 기반으로 결정되었다 [48]. Read Count data는 bioconductor를 이용하여 edgeR (R development Core Team, 2016)을 이용한 quantile normalization 방법으로 처리되었다 [49].

유전자의 분류는 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 및 Medline databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 수행한 검색을 기반으로 진행하였다.

### 4. Differential expression of genes (DEGs) 분석

유의미한 DEGs 선별을 위해 cut off :  $FC \geq 1.3$  and  $FC \leq -1.3$  와  $p\text{-values} < 0.05$ 의 기준을 적용하여 샘플들을 filtering하여 진행하였다.

Table 2. Total RNA concentration and purity.

NO.	Sample	Concentration (ng/ $\mu$ l)	OD 260/280	RIN
1	CON_PBS 1	382.6	1.85	8.3
2	CON_PBS 2	1060	2.04	8.2
3	CON_PBS 3	821.1	1.97	8.2
4	CON_PBS 4	360.1	1.88	8.1
5	CON_CH 1	1135.2	2.04	8.4
6	CON_CH 2	1276.7	2.08	8.4
7	CON_CH 3	1110.8	2.06	8.5
8	CON_CH 4	1705.7	2.06	8.8
9	<i>db/db</i> _PBS 1	740.9	1.96	8.3
10	<i>db/db</i> _PBS 2	453.5	1.87	7.3
11	<i>db/db</i> _PBS 3	921.3	2.03	8.1
12	<i>db/db</i> _PBS 4	400.3	1.93	8.1
13	<i>db/db</i> _CH 1	962.3	1.99	8.1
14	<i>db/db</i> _CH 2	1119.3	2.03	8.1
15	<i>db/db</i> _CH 3	698.5	2.02	8
16	<i>db/db</i> _CH 4	1058.9	2.02	8.1

CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide.

OD, optical density; RIN, RNA integrity number.

## 제3장 실험 결과

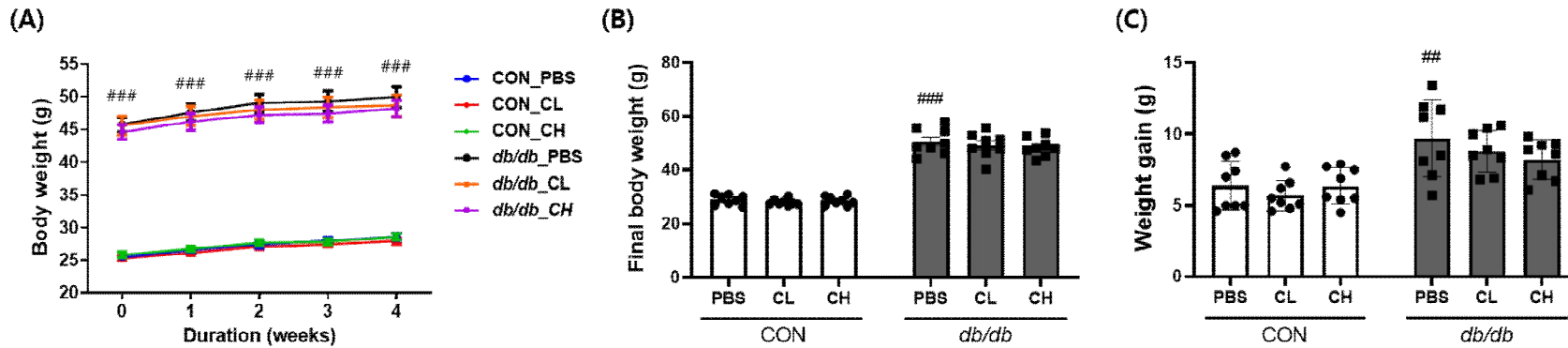
### 제1절 C-peptide 처리에 의한 근육량 및 근육 기능 개선 효과 조사

#### 1. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 *db/db* mice의 체중 변화

각 그룹 마우스의 체중을 적응 1주일 후부터 매주 측정하였다. *db/db*\_PBS 그룹의 체중은 CON\_PBS 그룹에 비해 실험 시작 전부터 실험 종료 시까지 유의적으로 높게 나타났다. 그리고 각 그룹의 체중을 비교하였을 때, *db/db* 마우스 및 정상 마우스 두 그룹 모두 C-peptide 처리에 의한 그룹 간 체중의 변화는 없었다 (Figure 3A). 최종 체중 또한 *db/db*\_PBS 그룹의 최종 체중은 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 높았고, control mice 그룹과 *db/db* mice 그룹 모두 C-peptide 처리에 의한 그룹 간의 차이를 관찰할 수 없었다 (Figure 3B).

실험 시작 전과 실험 종료 후의 체중 증가를 비교해 보았을 때 *db/db*\_PBS 그룹의 체중 증가는 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. 반면, *db/db* 마우스 및 정상 마우스 두 그룹 모두 C-peptide 처리에 의한 그룹 간 체중 증가의 변화는 없었다 (Figure 3C).





**Figure 3. Changes in the body weight with C-peptide treatment for 4 weeks.**

(A) Body weight and (B) Final body weight, (C) Weight gain; Data are Mean  $\pm$  S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*; ## $P < .01$ , ### $P < .001$ ; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *CON\_CL*, Control mice + Low dose of C-peptide; *CON\_CH*, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CL*, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide.

## 2. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 *db/db* mice의 공복 혈당 수준 변화

모든 마우스의 공복 혈당을 2주 간격으로 측정하였다. 그 결과 *db/db*\_PBS 그룹의 공복 혈당 수준은 CON\_PBS 그룹에 비해 실험 시작 전부터 실험 종료 시까지 유의적으로 높게 나타났다. Control mice 그룹의 경우 C-peptide 처리에 의한 공복 혈당 수준의 변화는 없었다. 또한 *db/db* mice 그룹의 경우에도 C-peptide 처리에 의한 공복 혈당 수준의 변화는 없었다 (Figure 4).

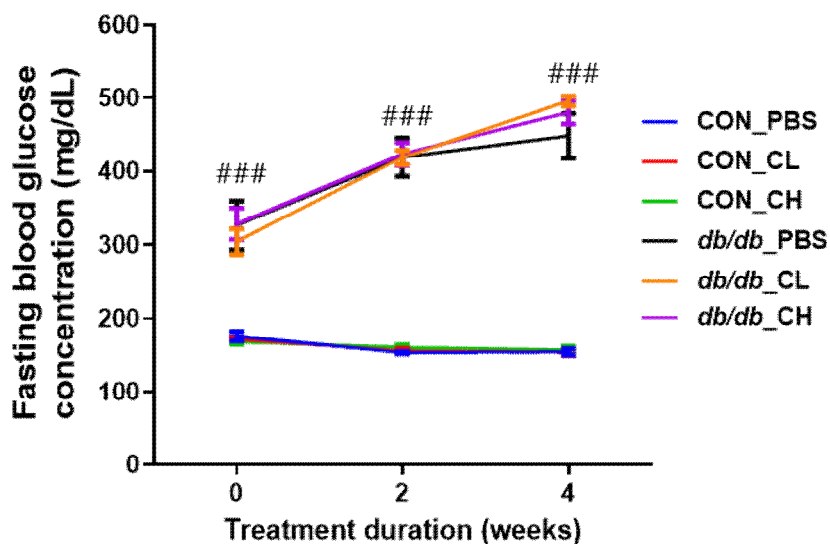


Figure 4. Changes in the fasting blood glucose concentration with C-peptide treatment for 4 weeks.

Data are Mean  $\pm$  S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db*\_PBS vs. CON\_PBS; ### $P < .001$ ; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide.

### 3. Control mice 및 *db/db* mice의 혈청 C-peptide 농도

모든 실험이 종료 후 수집한 혈액의 혈청 C-peptide 농도를 측정하였다. 그 결과 *db/db*\_PBS 그룹의 C-peptide 농도는 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 그리고 각 그룹의 그룹 간 혈청 C-peptide 농도를 비교한 결과, 두 그룹 모두 C-peptide 처리에 의한 그룹 간 혈청 C-peptide 농도의 차이는 없었다 (Figure 5).

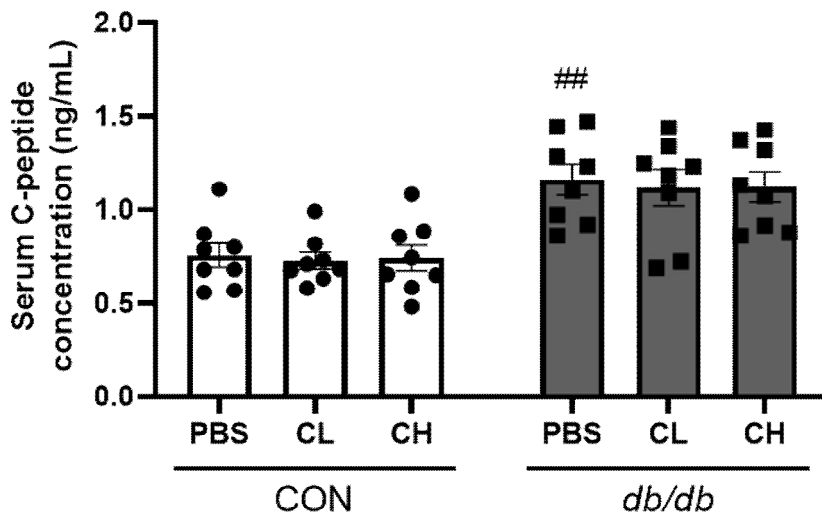
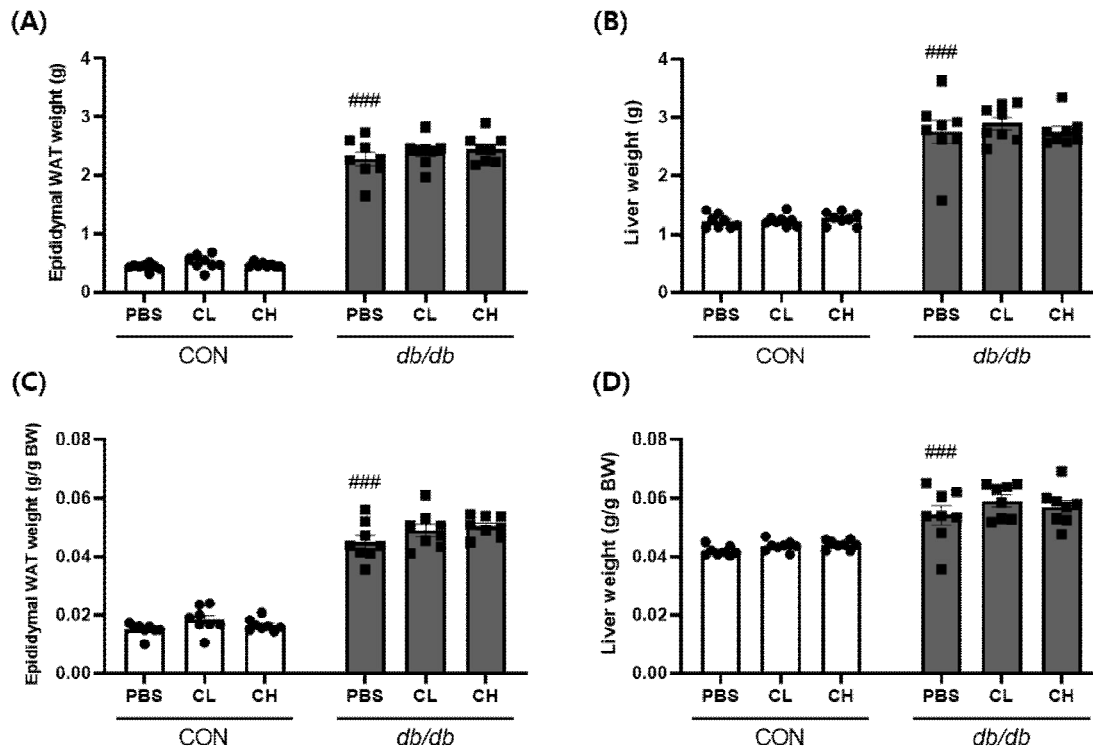


Figure 5. Serum C-peptide concentration in control mice and *db/db* mice.

Data are Mean  $\pm$  S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db*\_PBS vs. CON\_PBS; <sup>##</sup>*P* < .01; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide.

#### 4. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 *db/db* mice의 부고환 지방 조직 및 간 조직 무게 변화

모든 실험이 종료된 후 모든 그룹 마우스의 부고환 지방 조직 및 간 조직의 무게를 칭량하였다. 그 결과 *db/db*\_PBS 그룹의 부고환 지방 조직 및 간 조직 무게는 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 높은 것을 확인하였고, 두 그룹 모두 C-peptide에 의한 무게의 변화는 보이지 않았다 (Figure 6A-6B). 또한 단위 체중당 부고환 지방 조직 및 간 조직의 무게는 *db/db*\_PBS 그룹이 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었고, control mice 그룹과 *db/db* mice 그룹 모두 C-peptide 처리에 의한 유의적인 차이가 없었다 (Figure 6C-6D).

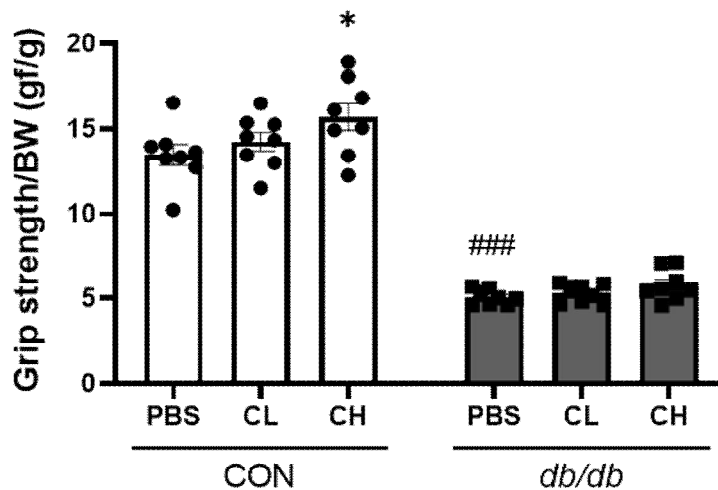


**Figure 6.** The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on organ weight in control mice and *db/db* mice.

(A-B) The weight of epididymal white adipose tissue and liver, (C-D) Epididymal white adipose tissue and liver were normalized to the final body weight (g); Data are Mean  $\pm$  S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*; ### $P < .001$ .; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *CON\_CL*, Control mice + Low dose of C-peptide; *CON\_CH*, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CL*, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide; BW, Body Weight.

## 5. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 *db/db* mice의 grip strength 변화

각 그룹 마우스의 grip strength는 실험 종료 직전에 측정 및 평가되었다. Grip strength는 당뇨 상태인 *db/db*\_PBS 그룹이 정상 마우스인 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 낮게 평가되었다. Control mice 그룹의 경우 정상 mice에 고용량 C-peptide를 처리한 CON\_CH 그룹에서 CON\_PBS 그룹 대비 grip strength가 유의적으로 증가하여 정상 mice에서의 근육 기능이 증가함을 나타냈다. *db/db* mice 그룹의 경우 C-peptide 처리에 의한 grip strength의 유의적인 변화를 보이지 않았다 (Figure 7).

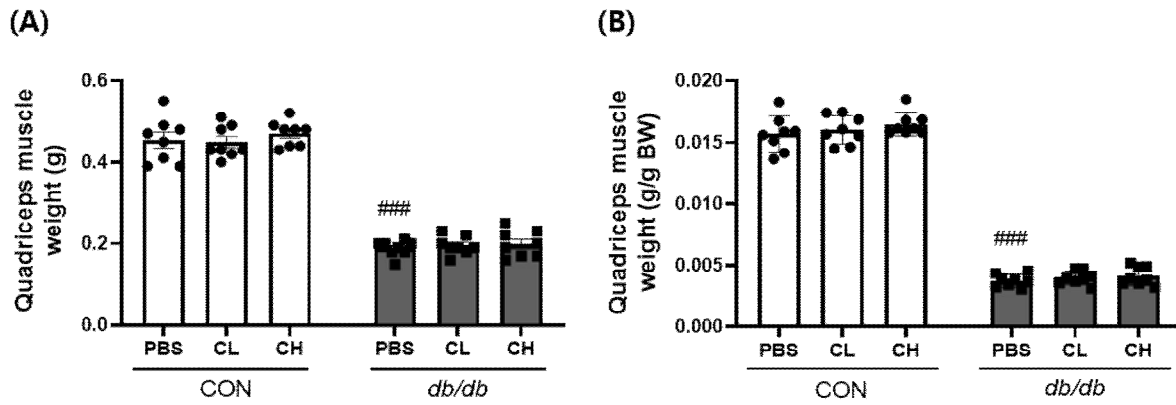


**Figure 7.** The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on grip strength in control mice and *db/db* mice.

Data are Mean ± S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db*\_PBS vs. CON\_PBS; ###*P*<.001. C-peptide vs. CON\_PBS; \**P*<.05; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; BW, Body weight.

## 6. C-peptide 처리에 의한 control mice 및 *db/db* mice의 주요 근육량 변화

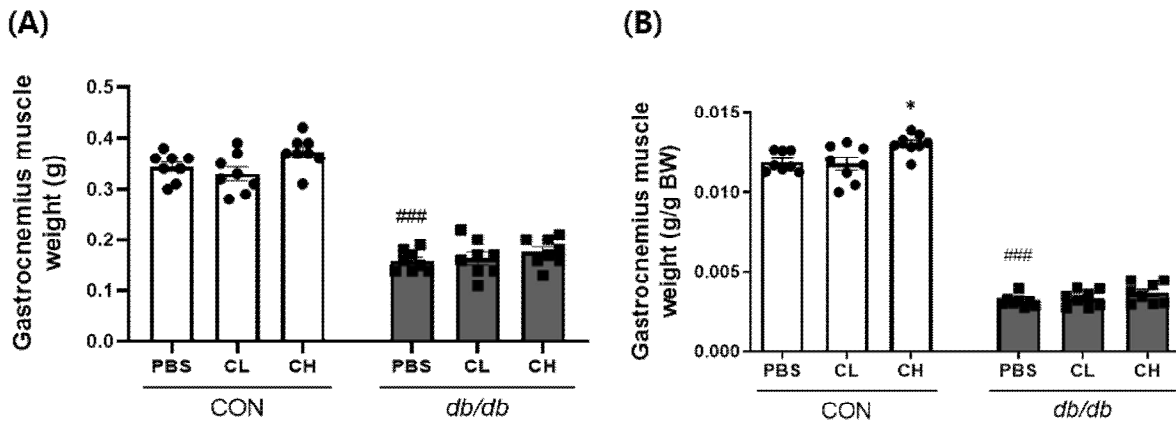
C-peptide를 처리하지 않은 *db/db*\_PBS 그룹의 모든 근육 조직의 무게는 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 낮게 측정되었다 (Figure 8-10). 우선, quadriceps muscle의 무게는 control mice 그룹과 *db/db* mice 그룹 모두 C-peptide 처리에 의한 근육의 무게 변화는 관찰할 수 없었고 단위 체중 당 근육의 무게에도 C-peptide 처리에 따른 변화가 없었다 (Figure 8). Gastrocnemius muscle의 무게는 control mice 그룹과 *db/db* mice 그룹 모두 C-peptide 처리에 의한 근육의 무게 변화는 관찰할 수 없었다. 단위 체중 당 gastrocnemius muscle의 무게를 평가하였을 때 CON\_CH 그룹에서 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, *db/db* mice 그룹은 C-peptide 처리에 의한 단위 체중 당 근육의 무게 변화는 관찰할 수 없었다 (Figure 9). Tibialis anterior muscle의 무게는 control mice 그룹의 경우 C-peptide 처리에 의해 근육의 무게가 CON\_PBS 그룹에 비해 농도 의존적으로 CON\_CL 그룹과 CON\_CH 그룹에서 유의적으로 증가하였다. 단위 체중 당 무게를 평가하였을 때도 같은 결과를 보였다. *db/db* mice 그룹의 경우 C-peptide 처리에 의한 근육의 무게 변화는 관찰할 수 없었다. 단위 체중 당 근육의 무게 역시 유의적으로 변화하지 않았다 (Figure 10).



**Figure 8. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on quadriceps muscle weight in control mice and *db/db* mice.**

(A) The weight of quadriceps muscle weight, (B) Quadriceps muscle were normalized to the final body weight (g); Data are Mean  $\pm$  S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*; ### $P < .001$ ; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CL*, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide; BW, Body weight.





**Figure 9. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on gastrocnemius muscle weight in control mice and *db/db* mice.**

(A) The weight of gastrocnemius muscle weight, (B) Gastrocnemius muscle were normalized to the final body weight (g); Data are Mean  $\pm$  S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db*\_PBS vs. *CON*\_PBS; ### $P$ <.001. C-peptide vs. *CON*\_PBS; \* $P$ <.05; *CON*\_PBS, Control mice + Saline; *CON*\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; *CON*\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; BW, Body weight.

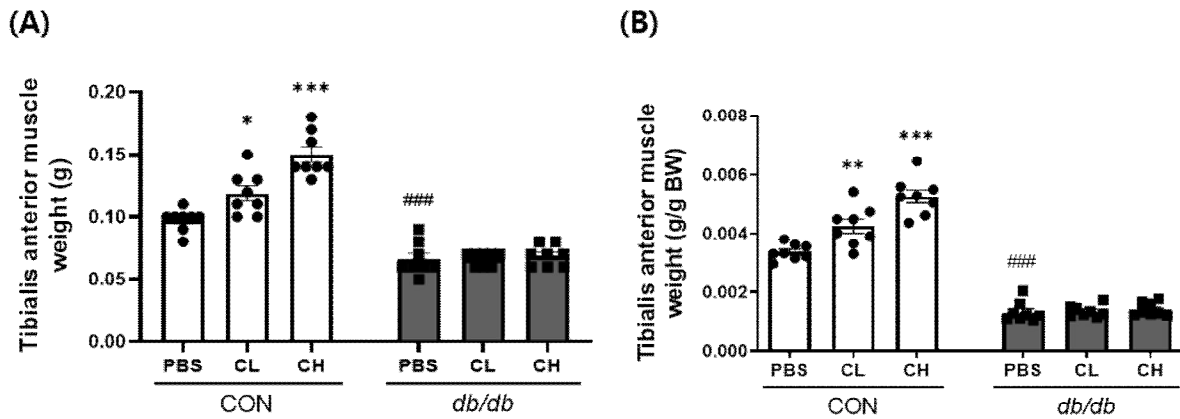


Figure 10. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on tibialis anterior muscle weight in control mice and *db/db* mice.

(A) The weight of tibialis anterior muscle weight, (B) Tibialis anterior muscle were normalized to the final body weight (g); Data are Mean  $\pm$  S.E.M (n = 8); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*; ### $P$ <.001. C-peptide vs. *CON\_PBS*; \* $P$ <.05, \*\* $P$ <.01, \*\*\* $P$ <.001; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *CON\_CL*, Control mice + Low dose of C-peptide; *CON\_CH*, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CL*, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide; BW, Body weight.

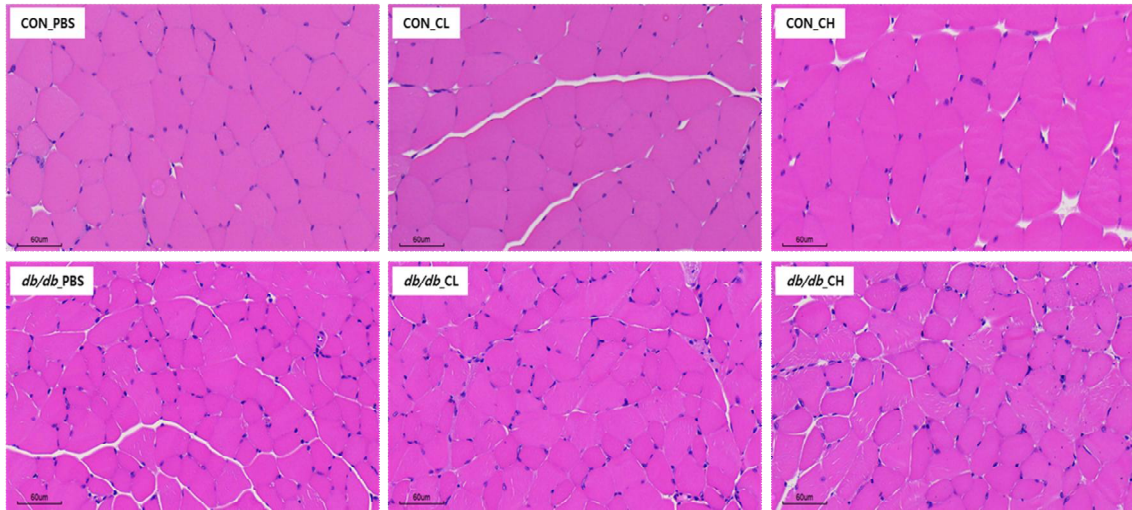
## 7. C-peptide 처리에 따른 control mice 및 *db/db* mice의 근섬유 크기 변화 (H&E staining analysis)

### 가. Gastrocnemius muscle의 횡단 면적 분포

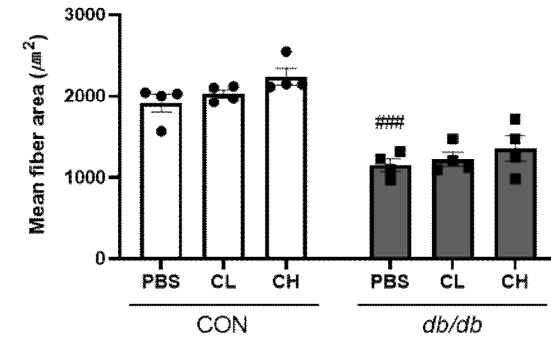
Gastrocnemius muscle 조직에 대한 H&E 염색을 진행하여 근섬유 크기를 분석하였다. 염색된 조직은 현미경을 사용하여 200배 확대 후 분석하였다 (Figure 11A). *db/db*\_PBS 그룹의 평균 근섬유 크기는 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 작게 평가되었다. 두 그룹 모두 C-peptide에 의한 평균 근섬유 크기 변화는 없었다 (Figure 11B).

CON\_PBS 그룹의  $500\sim 1500\mu\text{m}^2$  범위와  $1500\sim 3000\mu\text{m}^2$  범위의 근섬유 크기 분포는 각각 약 32%와 59%였으나 제2형 당뇨병 상태인 *db/db*\_PBS 그룹의 비율은 약 78%와 17%로 나타났다 (Figure 12A). *db/db* mice 그룹의 근섬유 크기 분포는 Control mice 그룹에 비해 왼쪽으로 shift 되어 당뇨시 근위축으로 인해 근섬유의 크기가 작아진 것을 확인할 수 있다. C-peptide의 처리로  $500\sim 1500\mu\text{m}^2$  범위와  $1500\sim 3000\mu\text{m}^2$  범위의 근섬유 크기 분포는 *db/db* mice 그룹은 *db/db*\_PBS 그룹과 유사하게 나타났으며, CON\_CH 그룹은 위 범위의 근섬유 크기가 약 12%와 75%로 변화하였다. (Figure 12B-12C).

**(A) Gastrocnemius muscle (200×)**



**(B)**



**Figure 11. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on gastrocnemius muscle histological analysis in control mice and *db/db* mice.**

(A) Image of gastrocnemius muscle stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) and examined under a microscope (magnification 200), (B) The mean CSA of gastrocnemius muscle from each mouse; Data are Mean ± S.E.M (n = 4); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*;  $###P < .001$ ; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *CON\_CL*, Control mice + Low dose of C-peptide; *CON\_CH*, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CL*, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide; CSA, Cross sectional area.

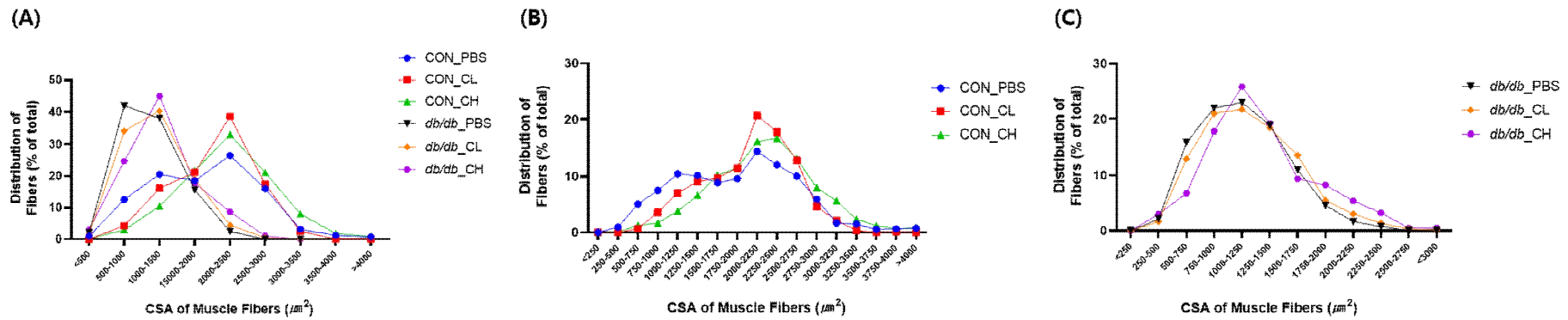


Figure 12. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on gastrocnemius muscle fiber distribution in control mice and *db/db* mice.

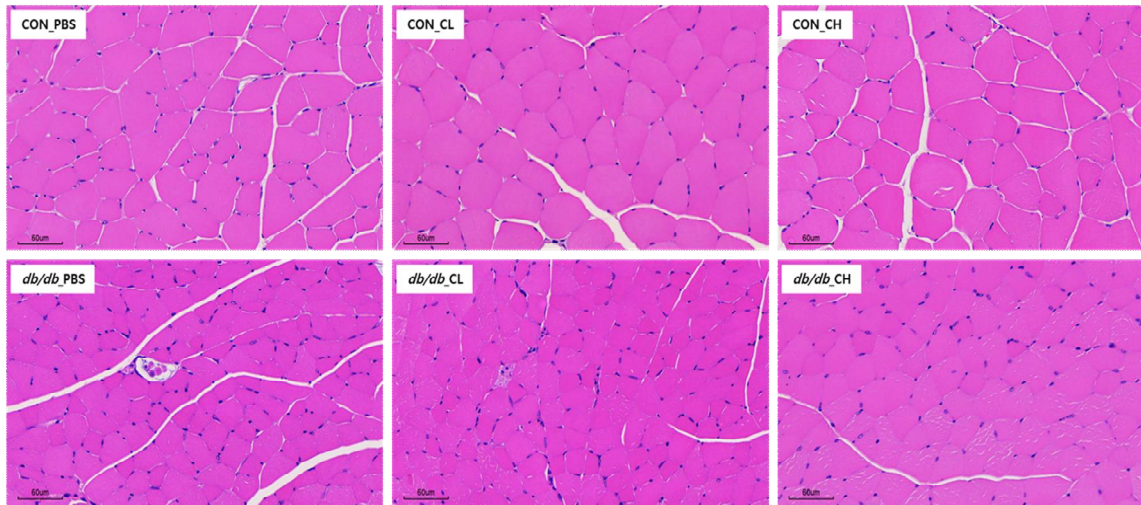
(A) Muscle fiber size distribution of total mice, (B) Muscle fiber size distribution of control mice group, (C) Muscle fiber size distribution of *db/db* mice group; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; CSA, Cross sectional area.

## 나. Tibialis anterior muscle의 횡단 면적 분포

Tibialis anterior muscle의 조직에 대해 H&E 염색을 진행하여 근섬유 크기를 분석하였다. 염색된 조직은 현미경을 사용하여 200배 확대 후 분석하였다 (Figure 13A). *db/db*\_PBS 그룹의 평균 근섬유 크기는 CON\_PBS 그룹에 비해 유의적으로 작게 평가되었다. Control mice 그룹의 평균 근섬유의 크기는 근육량과 동일하게 CON\_CL 그룹과 CON\_CH 그룹에서 CON\_PBS 그룹에 비해 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 13B). *db/db* mice 그룹의 경우 C-peptide에 의한 평균 근섬유 크기 변화는 없었다 (Figure 13B).

Control mice 그룹과 *db/db* mice 그룹의 근섬유 분포는 CON\_PBS 그룹의 500~1500 $\mu\text{m}^2$  범위와 1500~3000 $\mu\text{m}^2$  범위의 근섬유 크기는 각각 약 49%와 46%였으며 제2형 당뇨병 상태인 *db/db*\_PBS 그룹의 비율은 약 77%와 1%로 나타났다 (Figure 14A). *db/db* mice 그룹의 근섬유 크기 분포는 Control mice 그룹에 비해 왼쪽으로 shift 되어 shift 되어 당뇨시 근위축으로 인해 근섬유의 크기가 작아진 것을 확인할 수 있다. C-peptide의 처리로 해당 범위의 근섬유 크기가 CON\_CL 그룹은 약 20%와 75%로 변화하였고 CON\_CH 그룹은 약 20%와 58%로 변화하였다. 특히, CON\_CH 그룹의 경우에는 3000 $\mu\text{m}^2$  초과 범위의 근섬유 크기가 전체 근섬유 크기의 약 18% 정도를 차지하였다. *db/db* mice 그룹은 500~1500 $\mu\text{m}^2$  범위와 1500~3000 $\mu\text{m}^2$  범위의 근섬유 크기가 *db/db*\_CL 그룹은 *db/db*\_PBS 그룹과 유사하게 나타났으며, *db/db*\_CH 그룹은 약 81%와 8%로 변화하였다 (Figure 14B-14C).

(A) Tibialis anterior muscle (200×)



(B)

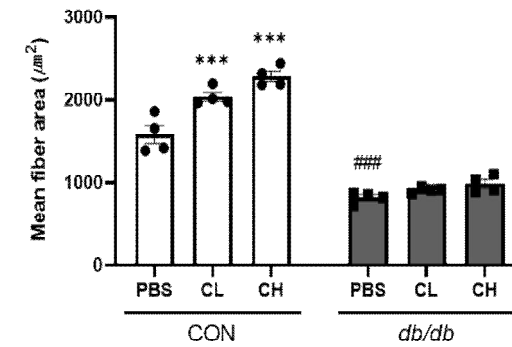


Figure 13. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on tibialis anterior muscle histological analysis in control mice and *db/db* mice.

(A) Image of tibialis anterior muscle stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) and examined under a microscope (magnification 200), (B) The mean CSA of tibialis anterior muscle from each mouse; Data are Mean ± S.E.M (n = 4); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*; ###*P*<.001 C-peptide vs. *CON\_PBS*; \*\*\**P*<.001; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *CON\_CL*, Control mice + Low dose of C-peptide; *CON\_CH*, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CL*, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide; CSA, Cross sectional area.



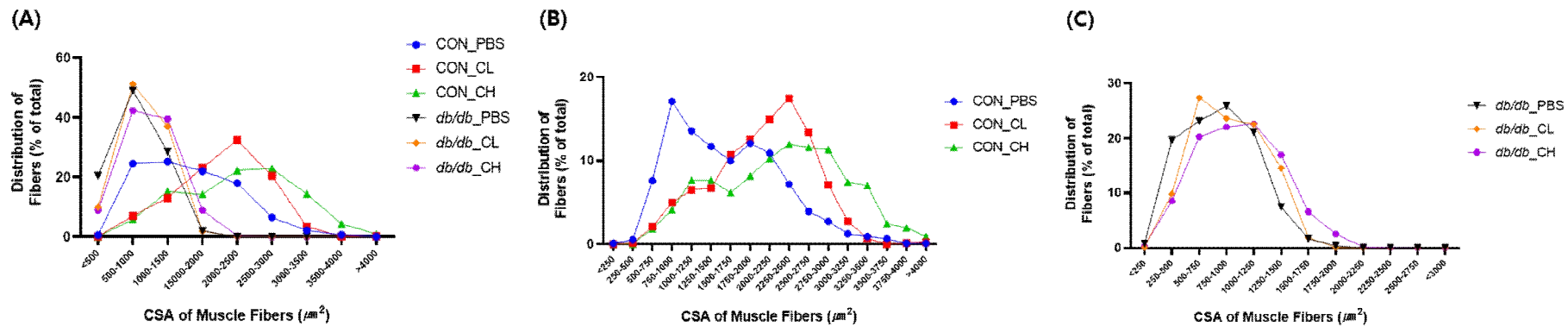


Figure 14. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on tibialis anterior muscle fiber distribution in control mice and *db/db* mice.

(A) Muscle fiber size distribution of total mice, (B) Muscle fiber size distribution of control group, (C) Muscle fiber size distribution of *db/db* group; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CL, Control mice + Low dose of C-peptide; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CL, *db/db* mice + Low dose of C-peptide; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; CSA, Cross sectional area.



## 8. C-peptide 처리에 따른 control mice 및 *db/db* mice의 근육 분해 관련 단백질 발현

C-peptide가 정상 상태와 제2형 당뇨병 상태에서 근육 분해 관련 인자의 발현을 긍정적으로 조절할 수 있을지 확인하기 위해 tibialis anterior muscle의 Akt, FoxO3a, Atrogin-1 및 MuRF1 단백질의 발현 수준을 western blotting을 통해 분석하였다. 우선, 단백질 대사와 관련된 신호전달 경로의 주요 인자인 Akt와 ubiquitin E3 ligase의 활성제인 FoxO3a의 발현 수준을 분석하였다. 정상 상태인 CON\_PBS 그룹에 비해 당뇨 상태인 *db/db*\_PBS 그룹에서 Akt의 인산화는 유의적인 차이가 나지 않았다. 하지만 정상 mice에 C-peptide를 처리한 CON\_CH 그룹의 경우 CON\_PBS 그룹에 비해 Akt의 인산화가 유의적으로 증가하였다. FoxO3a의 인산화는 정상 상태인 CON\_PBS 그룹에 비해 당뇨 상태인 *db/db*\_PBS 그룹에서 유의적으로 낮아졌다. *db/db* mice 그룹의 경우 C-peptide에 의한 변화를 보이지 않았고, control mice 그룹의 경우 C-peptide 처리에 의해 FoxO3a의 인산화가 유의적으로 증가하였다. 근육 단백질 분해의 주요 마커인 MuRF1과 Atrogin-1의 단백질 발현 수준은 정상 상태인 CON\_PBS 그룹 대비 당뇨병 상태인 *db/db*\_PBS 그룹에서 유의적으로 증가하였으며, C-peptide의 처리에 의해 유의적으로 감소하였다. 또한, 정상 mice에 C-peptide를 처리한 CON\_CH 그룹의 경우에도 CON\_PBS 그룹에 비해 Atrogin-1과 MuRF1의 단백질 발현 수준이 유의적으로 감소하였다 (Figure 15).

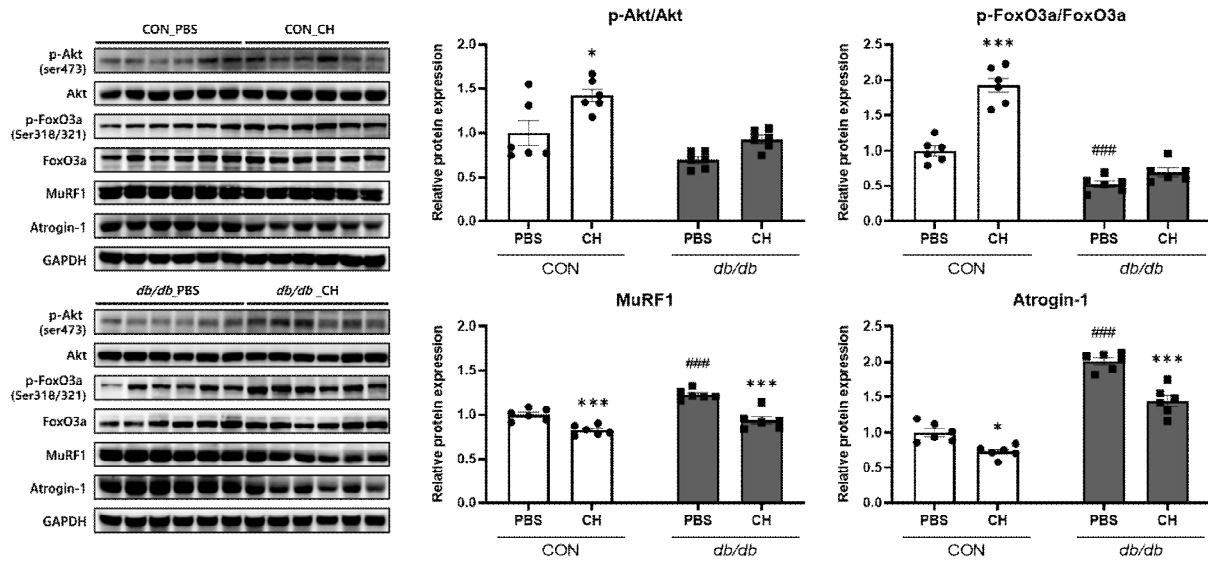


Figure 15. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on protein expression level related to protein degradation in tibialis anterior muscle of control mice and *db/db* mice.

The protein levels were evaluated using western blot analysis with GAPDH as a loading control; Data are Mean ± S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*; ###  $P < .001$ . C-peptide vs. PBS (*CON\_PBS* or *db/db\_PBS*); \*  $P < .05$ , \*\*\*  $P < .001$ ; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *CON\_CH*, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide.

## 9. C-peptide 처리에 따른 control mice 및 *db/db* mice의 근육 합성 관련 단백질 발현

C-peptide가 정상 상태와 제2형 당뇨병 상태에서 근육 단백질 합성 관련 인자의 발현을 조절할 수 있을지 확인하기 위해 tibialis anterior muscle의 PI3K/Akt 및 mTOR pathway의 downstream factor인 P70S6K1과 4E-BP1에 대한 발현 수준을 western blotting을 통해 분석하였다. 정상 상태인 CON\_PBS 그룹에 비해 당뇨 상태인 *db/db*\_PBS 그룹에서 P70S6K1과 4E-BP1의 인산화가 유의적으로 감소하였다. 하지만 C-peptide 처리에 의해 당뇨병 상태에서 감소한 P70S6K1의 인산화가 *db/db*\_CH 그룹에서 유의적으로 증가하였다. 또한, 정상 mice에 C-peptide를 처리한 CON\_CH 그룹의 경우에도 CON\_PBS 그룹에 비해 CON\_CH 그룹에서 P70S6K1과 4E-BP1의 인산화가 유의적으로 증가하였다 (Figure 16).

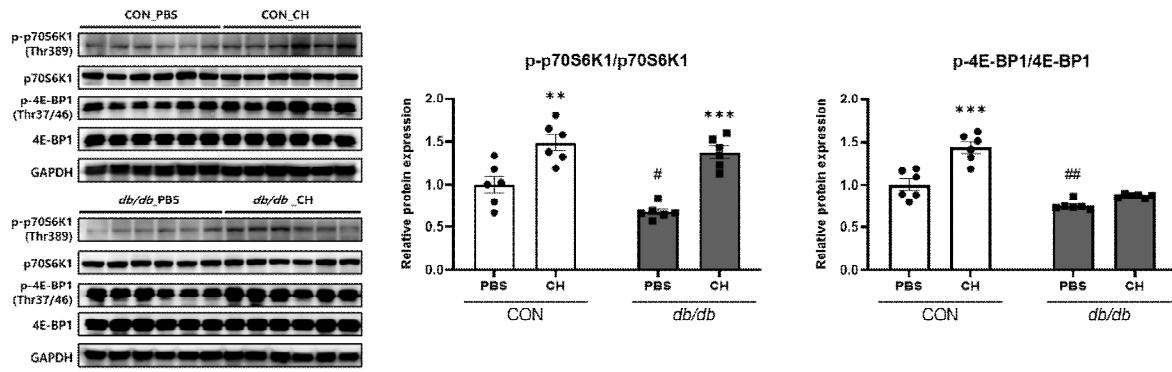


Figure 16. The effect of C-peptide treatment for 4 weeks on protein expression level related to protein synthesis in tibialis anterior muscle of control mice and *db/db* mice.

The protein levels were evaluated using western blot analysis with GAPDH as a loading control; Data are Mean ± S.E.M (n = 6); Statistical analysis was conducted using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple range test; *db/db\_PBS* vs. *CON\_PBS*; #*P*<.05, ##*P*<.01. C-peptide vs. PBS (*CON\_PBS* or *db/db\_PBS*); \*\**P*<.01, \*\*\**P*<.001; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *CON\_CH*, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide.

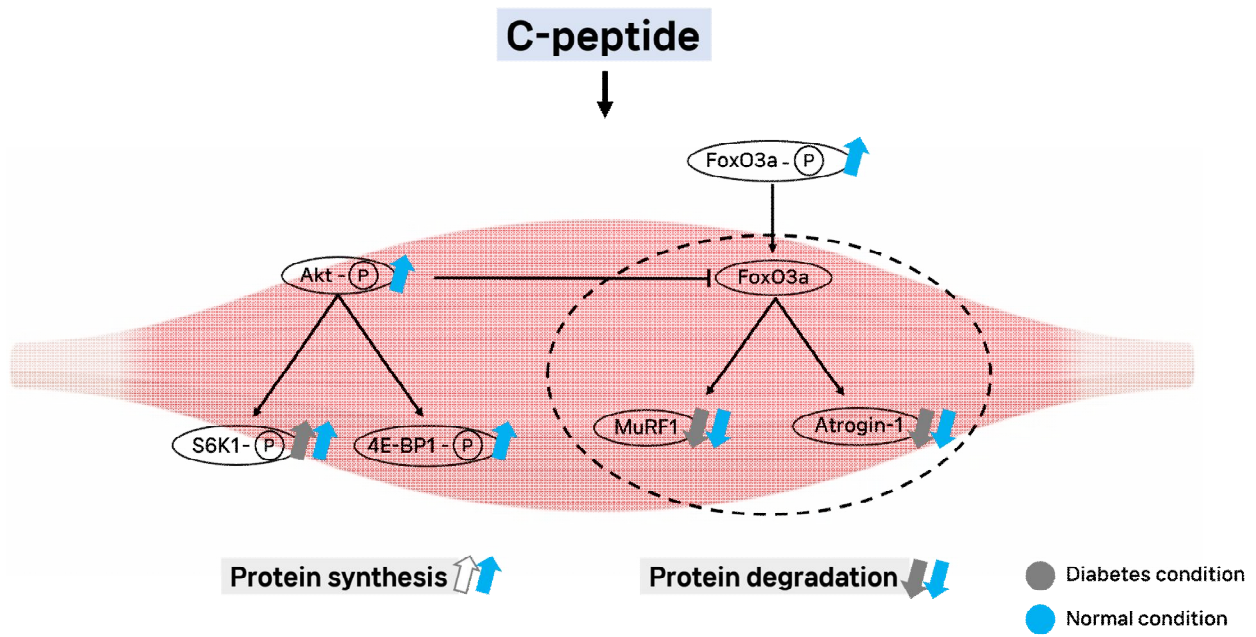


Figure 17. Summarized molecular action of C-peptide in the muscle of control mice and *db/db* mice.

## 제2절 C-peptide 처리에 의한 전사체 발현 변화 조사

### 1. CON\_CH vs CON\_PBS 와 *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS 사이 전사체 발현 변화

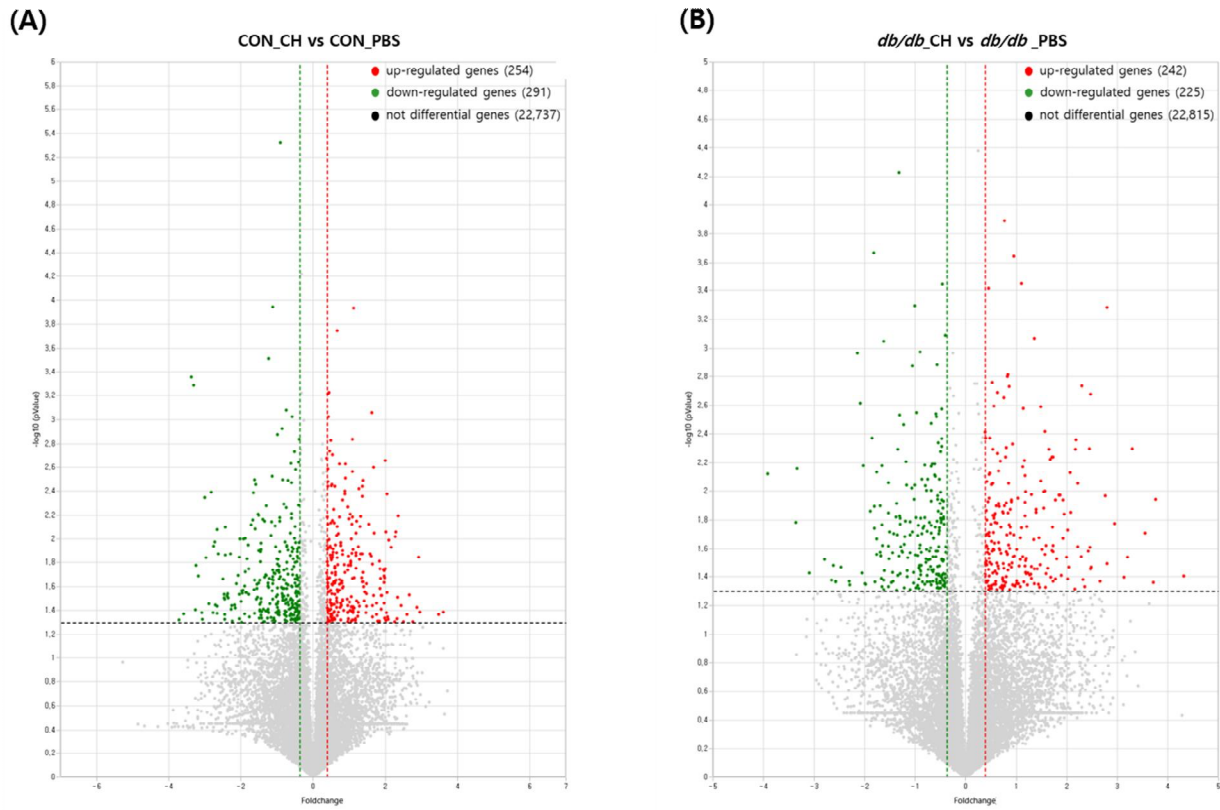
#### 가. 유전자 발현 비교 분석

정상 mice와 당뇨 mice에서 C-peptide에 의한 전사체 발현을 조사하기 위해 CON\_PBS 그룹과 *db/db*\_PBS 그룹을 C-peptide를 처리한 CON\_CH 그룹과 *db/db*\_CH 그룹으로 각각 비교하였다. 총 23,282개의 gene들 중 DEG를 선별하기 위해 volcano plot을 구성하였고, CON\_PBS 그룹 대비 CON\_CH 그룹에서 up-regulation 된 gene은 254개, down-regulation 된 gene은 291개로 나타났다. 또한, *db/db*\_PBS 그룹 대비 *db/db*\_CH 그룹에서 up-regulation 된 gene은 254개, down-regulation 된 gene은 291개였다 (Table 3, Figure 18).

Table 3. The number of DEGs identified in different comparisons among the groups of CON\_PBS, CON\_CH, *db/db*\_PBS, and *db/db*\_CH.

Comparison	Number of DEGs		
	Total	Up-Regulation	Down-Regulation
CON_CH vs CON_PBS	545	254	291
<i>db/db</i> _CH vs <i>db/db</i> _PBS	467	242	225

DEGs screening criteria, the  $p$ -values  $< 0.05$  and  $|FC| \geq 1.3$ ; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; DEGs, Differential expression of genes; FC, Fold change



**Figure 18. Volcano plots visualization of the DEGs in different groups.**

The volcano plot graph on (A) CON\_CH vs CON\_PBS; (B) *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS.; Red dots and green dots represent genes expressed with up-regulated and represent genes with down-regulated, respectively. Black dots represent genes with no significant difference. Y-axis denotes  $-\log_{10} P$  values while X-axis shows fold change 1.3 values. DEGs screening criteria, the  $p$ -values  $< 0.05$  and  $|FC| \geq 1.3$ ; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; DEGs, Differential expression of genes.



## 나. Gene ontology (GO) 분석

선별된 DEG들의 Gene Ontology (GO)분석을 진행하여 표로 나타내었다. CON\_PBS 그룹 대비 CON\_CH 그룹에서 up-regulation 되는 상위 10개의 biological process는 protein ubiquitination, positive regulation of mucus secretion, regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway, regulation of cell proliferation, protein K48-linked ubiquitination, response to interferon-beta, epidermal growth factor receptor signaling pathway, protein transport, S-adenosylhomocysteine catabolic process, peptidyl-tyrosine autophosphorylation으로 확인되었다 (Table 4). 반면 CON\_PBS 그룹 대비 CON\_CH 그룹에서 down-regulation 되는 상위 10개의 biological process는 positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading, metabolic process, tetrahydrofolate interconversion, positive regulation of phosphorylation, wound healing, spreading of cells, angiogenesis, 10-formyltetrahydrofolate biosynthetic process, heart development, negative regulation of myeloid leukocyte differentiation, positive regulation of Ras protein signal transduction으로 확인되었다 (Table 5).

*db/db\_PBS* 그룹 대비 *db/db\_CH* 그룹에서 up-regulation 되는 상위 10개의 biological process는 positive regulation of MAP kinase activity, intracellular protein transport, defense response to virus, lipid transport, activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process, response to interferon-beta, heart development, hemopoiesis, regulation of protein stability, organic hydroxy compound transport로 확인되었고 (Table 6), down-regulation 되는 상위 10개의 biological process는 transcription, DNA-templated, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, regulation of growth, DNA repair, double-strand break repair via homologous recombination, chromatin organization, positive regulation of transcription, DNA-templated, mRNA processing으로 확인되었다 (Table 7).

CON\_PBS 그룹 대비 CON\_CH 그룹에서와 *db/db\_PBS* 그룹 대비 *db/db\_CH* 그룹에서 공통적으로 up-regulated 되는 biological process는 총 3가지로 protein ubiquitination, response to interferon-beta, defense response to virus였으며, 공통적으로 down-regulated 되는 biological process는 확인할 수 없었다.

**Table 4. List of biological process categories of up-regulated genes in CON\_CH vs CON\_PBS.**

	GO Categories	Count	%	<i>p</i> -value	Fold Enrichment
1	GO:0016567~protein ubiquitination	13	5.284553	0.002136	2.849096
2	GO:0070257~positive regulation of mucus secretion	3	1.219512	0.005248	26.89706
3	GO:0042058~regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway	3	1.219512	0.005248	26.89706
4	GO:0042127~regulation of cell proliferation	8	3.252033	0.005695	3.739244
5	GO:0070936~protein K48-linked ubiquitination	5	2.03252	0.005773	6.94525
6	GO:0035456~response to interferon-beta	3	1.219512	0.008512	21.1334
7	GO:0007173~epidermal growth factor receptor signaling pathway	4	1.626016	0.011173	8.575874
8	GO:0015031~protein transport	14	5.691057	0.013652	2.150647
9	GO:0019510~S-adenosylhomocysteine catabolic process	2	0.813008	0.020079	98.62255
10	GO:0038083~peptidyl-tyrosine autophosphorylation	3	1.219512	0.022301	12.86381
	⋮				
16	GO:0051607~defense response to virus	7	2.845528	0.039629	2.794971

DAVID functional annotation of differentially expressed genes in CON\_CH vs CON\_PBS.; GO categories on BP (Biological process) up-regulated in CON\_CH vs CON\_PBS.; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; GO, Gene ontology

**Table 5. List of biological process categories of down-regulated genes in CON\_CH vs CON\_PBS.**

	GO Categories	Count	%	<i>p</i> -value	Fold Enrichment
1	GO:1900026~positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	5	1.798561	0.001542	9.954973
2	GO:0008152~metabolic process	8	2.877698	0.006183	3.68227
3	GO:0035999~tetrahydrofolate interconversion	3	1.079137	0.011179	18.34559
4	GO:0042327~positive regulation of phosphorylation	4	1.438849	0.012773	8.153597
5	GO:0044319~wound healing, spreading of cells	3	1.079137	0.016329	15.10814
6	GO:0001525~angiogenesis	9	3.23741	0.020201	2.666142
7	GO:0009257~10-formyltetrahydrofolate biosynthetic process	2	0.719424	0.023127	85.61277
8	GO:0007507~heart development	9	3.23741	0.024538	2.568383
9	GO:0002762~negative regulation of myeloid leukocyte differentiation	2	0.719424	0.03449	57.07518
10	GO:0046579~positive regulation of Ras protein signal transduction	3	1.079137	0.03645	9.878396

DAVID functional annotation of differentially expressed genes in CON\_CH vs CON\_PBS.; GO categories on BP (Biological process) down-regulated in CON\_CH vs CON\_PBS.; CON\_PBS, Control mice + Saline; CON\_CH, Control mice + High dose of C-peptide; GO, Gene ontology

Table 6. List of biological process categories of up-regulated genes in *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS.

	GO Categories	Count	%	<i>p</i> -value	Fold Enrichment
1	GO:0043406 ~positive regulation of MAP kinase activity	6	2.620087	0.001131	7.627575
2	GO:0006886 ~intracellular protein transport	10	4.366812	0.002597	3.44038
3	GO:0051607 ~defense response to virus	9	3.930131	0.002632	3.798347
4	GO:0006869 ~lipid transport	7	3.056769	0.00712	4.122625
5	GO:0006919 ~activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	5	2.183406	0.007233	6.51522
6	GO:0035456 ~response to interferon-beta	3	1.310044	0.007645	22.3379
7	GO:0007507 ~heart development	9	3.930131	0.008338	3.127306
8	GO:0030097 ~hemopoiesis	5	2.183406	0.01214	5.604491
9	GO:0031647 ~regulation of protein stability	5	2.183406	0.013992	5.373377
10	GO:0015850 ~organic hydroxy compound transport	2	0.873362	0.018996	104.2435
	⋮				
44	GO:0016567 ~protein ubiquitination	9	3.930131	0.067471	2.08487

DAVID functional annotation of differentially expressed genes in *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS.; GO categories on BP (Biological process) up-regulated in *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS.; *db/db*\_ PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; GO, Gene ontology

Table 7. List of biological process categories of down-regulated genes in *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS.

	GO Categories	Count	%	<i>p</i> -value	Fold Enrichment
1	GO:0006351 ~transcription, DNA-templated	9	4.205607	0.0001	6.112308
2	GO:0045944 ~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	23	10.74766	0.00206	2.028125
3	GO:0006357 ~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	26	12.14953	0.006127	1.761402
4	GO:0000122 ~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	19	8.878505	0.00623	2.013087
5	GO:0040008 ~regulation of growth	5	2.336449	0.006395	6.74953
6	GO:0006281 ~DNA repair	10	4.672897	0.009454	2.810858
7	GO:0000724 ~double-strand break repair via homologous recombination	5	2.336449	0.00958	6.007824
8	GO:0006325 ~chromatin organization	9	4.205607	0.013231	2.877431
9	GO:0045893 ~positive regulation of transcription, DNA-templated	14	6.542056	0.017659	2.074246
10	GO:0006397 ~mRNA processing	9	4.205607	0.019332	2.681421

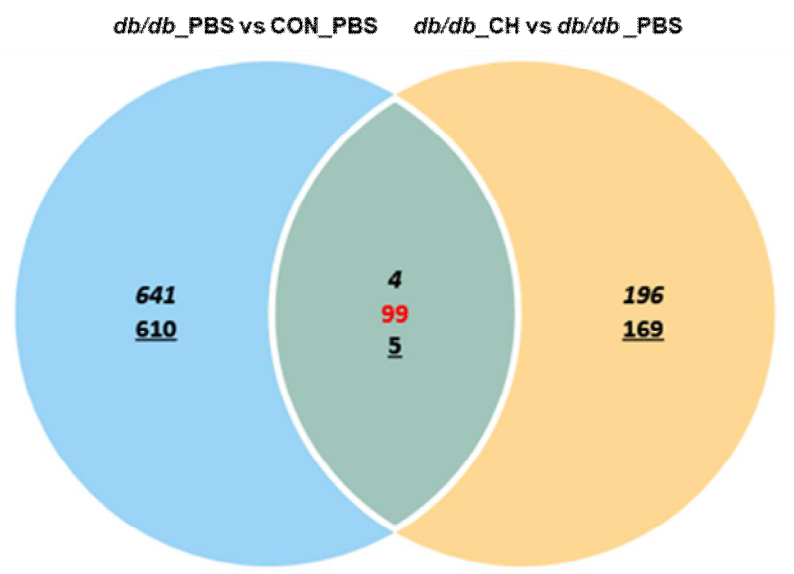
DAVID functional annotation of differentially expressed genes in *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS.; GO categories on BP (Biological process) down-regulated in *db/db*\_CH vs *db/db*\_PBS.; *db/db*\_PBS, *db/db* mice + Saline; *db/db*\_CH, *db/db* mice + High dose of C-peptide; GO, Gene ontology

## 2. 제2형 당뇨병과 C-peptide 처리 사이 전사체 발현 변화

### 가. 유전자 발현 비교 분석

당뇨 mice와 C-peptide를 처리한 당뇨 mice의 전사체 발현을 조사하기 위해 총 23,282개의 gene들 중 DEG를 선별하기 위해 venn diagram을 구성하였다. CON\_PBS 그룹 대비 *db/db*\_PBS 그룹에서만 up-regulation 된 gene은 641개, down-regulation 된 gene은 610개였고, *db/db*\_PBS 그룹 대비 *db/db*\_CH 그룹에서 up-regulation 된 gene은 196개, down-regulation 된 gene은 169개였다.

두 비교 집단인 CON\_PBS 그룹 대비 *db/db*\_PBS 그룹과 *db/db*\_PBS 그룹 대비 *db/db*\_CH 그룹에서 공통적으로 발현되는 전사체 수는 108개였고, 그 중 contra-regulation 되는 gene은 99개가 확인되었다 (Figure 19).



**Figure 19. Venn diagram visualization of the DEGs in different groups.**  
 DEGs screening criteria, the  $p$ -values  $< 0.05$  and  $|FC| \geq 1.3$ ; *CON\_PBS*, Control mice + Saline; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide; DEGs, Differential expression of genes.

## 나. Gene ontology (GO) 분석

CON\_PBS 그룹 대비 *db/db*\_PBS 그룹과 *db/db*\_PBS 그룹 대비 *db/db*\_CH 그룹에서 공통적으로 발현되는 전사체 중 contra-regulation 되는 gene들의 GO 분석을 진행하였다. 그 결과 확인된 상위 10개의 biological process는 oncogene-induced cell senescence, metanephric mesenchymal cell differentiation, transcription, DNA-templated, cell migration, sensory perception of pain, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, negative regulation of transcription, DNA-templated, regulation of bicellular tight junction assembly, peptidyl-tyrosine phosphorylation, negative regulation of protein localization to cell surface로 확인되었고 (Table 8), 해당 유전자들의 heat map을 통해 발현도를 확인하였다 (Figure 20).



Table 8. List of biological process categories of contra-regulated genes in *db/db\_PBS* vs CON\_PBS and *db/db\_CH* vs *db/db\_PBS*.

	GO Categories	Count	%	<i>p</i> -value	Fold Enrichment
1	GO:0090402~oncogene-induced cell senescence	2	2.197802	0.018502	105.8895
2	GO:0072162~metanephric mesenchymal cell differentiation	2	2.197802	0.018502	105.8895
3	GO:0006351~transcription, DNA-templated	4	4.395604	0.022322	6.576986
4	GO:0016477~cell migration	5	5.494505	0.030403	4.188666
5	GO:0019233~sensory perception of pain	3	3.296703	0.034318	10.18168
6	GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	10	10.98901	0.040527	2.134868
7	GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	7	7.692308	0.042413	2.705206
8	GO:2000810~regulation of bicellular tight junction assembly	2	2.197802	0.04384	44.12061
9	GO:0018108~peptidyl-tyrosine phosphorylation	3	3.296703	0.044487	8.824123
10	GO:2000009~negative regulation of protein localization to cell surface	2	2.197802	0.047406	40.72672

DAVID functional annotation of differentially expressed genes in *db/db\_PBS* vs CON\_PBS and *db/db\_CH* vs *db/db\_PBS*.; GO categories on BP (Biological process) contra-regulated in *db/db\_PBS* vs CON\_PBS and *db/db\_CH* vs *db/db\_PBS*.; CON\_PBS, Control mice + Saline; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide; GO, Gene ontology



Figure 20. The heat map of contra-regulated genes in *db/db\_PBS* vs *CON\_PBS* and *db/db\_CH* vs *db/db\_PBS*.

*CON\_PBS*, Control mice + Saline; *db/db\_PBS*, *db/db* mice + Saline; *db/db\_CH*, *db/db* mice + High dose of C-peptide

## 제4장 고찰

본 연구는 제2형 당뇨병 마우스의 골격근 위축에 대한 C-peptide의 생리활성 효과를 확인하기 위해 정상 마우스인 C57BL/6J 마우스와 제2형 당뇨병 마우스인 *db/db* 마우스를 대상으로 실험을 진행하였다.

제2형 당뇨병 (T2DM)은 유전적 요인과 환경적 요인의 복합적인 원인으로 인슐린 분비 장애와 인슐린 저항성으로 발병하며 고혈당증을 특징으로 만성질환 중 하나이다 [1]. 건강한 사람의 경우 췌장의 베타 세포에서 분비하는 인슐린이 골격근, 지방 조직 등에서 세포를 자극해 포도당 흡수를 활성화하여 포도당의 처리를 촉진하지만 당뇨 환자의 경우 인슐린 저항성으로 포도당 생성이 조절되지 못하여 혈당이 증가하게 된다 [50]. 당뇨병의 합병증에는 신장병증, 망막병증, 신경병증, 근위축증 등이 있다 [6, 7]. 당뇨병의 합병증 중 하나인 근위축증은 근육 단백질의 분해가 근육 단백질 합성을 초과할 때 근육량의 손실이 일어나면서 발생한다 [8, 9]. 당뇨병 상태에서는 정상 상태에 비해 근육 손실과 근육 기능의 저하가 가속화되며, 특히 고령의 제2형 당뇨병 환자의 경우 근위축이 정상인에 비해 더 빠르게 발생한다 [14]. 현재까지 운동요법이 근위축증의 유일한 치료 방법이며 근위축증을 예방 및 치료하기 위한 유효한 약이나 치료 등에 관한 연구는 거의 전무하다 [51].

C-peptide는 인슐린의 전구물질인 proinsulin의 알파 사슬과 베타 사슬을 연결하는 connecting peptide로 인슐린과 등몰량으로 분비된다. C-peptide의 생체 내 반감기는 20-30분으로 반감기가 3-5분인 인슐린에 비해 길기 때문에 지금까지 췌장의 베타 세포 기능을 평가하는 지표로만 활용되고 있었다 [52]. 하지만 최근 보고에 따르면 C-peptide의 생체 내 다양한 생리활성 효과가 보고되고 있다 [33, 34]. 또한 지금까지 연구된 당뇨병과 관련된 C-peptide의 효과로는 신경변증, 신장질환, 심혈관질환 등의 고혈당과 관련한 질병 개선 등의 효과가 있다 [36, 37]. 하지만 근육에 관한 C-peptide의 영향에 관한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구는 정상 마우스인 C57BL/6J 마우스와 제2형 당뇨병 마우스인 *db/db* 마우스를 통해 당뇨 상태와 정상적인 상태에서 C-peptide가 근육 내 신호전달에 미치는 영향을 분석하였다. 체중과 근육량, grip strength, 공복혈당 수치 등을 평가하였고, sampling을 한 근육 조직을 분자생물학적 분석을 통해 근육의 단백질 발현 수준을 평가하였다. 또한, C-peptide에 의한 유전자 전사체 profiling을 위해 tibialis anterior muscle을 이용하여

QuantSeq 3' mRNA-Seq을 진행하였다.

본 연구의 실험 결과, C-peptide는 정상 상태와 제2형 당뇨 상태 모두에서 체중과 장기 조직 무게에서는 유의적인 변화를 나타내진 않았다 (Figure 3, 6). 또한, 모든 마우스의 공복혈당 수치와 혈중 C-peptide 농도에서도 그룹 간의 유의적인 차이는 없었다 (Figure 4, 5). 이는 C-peptide의 생체 내 반감기가 20~30분으로 복강 내 주사만으로 지속적으로 생체 내 C-peptide 농도를 유지하는데 어려움이 있었다 [52]. 골격근은 전체 체중의 약 40%를 차지하며 단백질의 저장고이다. 그러나 근위축이 발생하면 근육량과 힘의 손실을 유발한다 [53]. 그에 따라 근육 기능 평가를 진행하였고 grip strength는 정상 상태에서 유의적으로 증가하였지만 당뇨 상태에서는 유의적인 변화를 나타내지 않았다 (Figure 7).

본 연구에서 당뇨 마우스에서 근육량과 근육 기능에서의 개선 효과는 보이지 않았다. 하지만 근육의 소모를 방지하기 위해서는 단백질 분해와 합성의 균형을 맞추는 것이 중요하다 [20]. 비인산화 상태의 FoxO 전사인자의 핵으로의 translocation은 근위축과 관련해 protein degradation을 촉진하는 atrogenes의 발현을 증가시킨다 [54]. C-peptide의 처리는 *db/db* 마우스에서 MuRF1과 Atrogin-1의 발현을 유의적으로 감소시켰다 (Figure 15). 이는 최근 연구에서 밝혀진 근육 분해 조절 기전과 동일한 결과를 나타낸다 [55]. 또한, 이전 연구에서 P70S6K1과 4E-BP1의 인산화의 감소는 근육 단백질의 합성을 저해했다 [56]. 하지만 C-peptide의 처리에 의해 당뇨 상태에서 감소한 P70S6K1의 인산화를 증가시켰다 (Figure 16). 이는 C-peptide가 제2형 당뇨 마우스의 단백질 분해 억제 및 단백질 합성의 증가에 긍정적인 영향을 주었다고 시사할 수 있다. 따라서 본 연구의 실험 기간인 4주보다 장기간의 C-peptide 처리나 생체 내에서 C-peptide를 일정하게 유지시킬 수 있다면 본 연구보다 명확한 C-peptide의 당뇨병성 근위축증 개선 효과가 관찰될 것이라고 판단된다.

또한 C-peptide를 정상 상태의 마우스인 C57BL/6J 마우스에 투여한 결과, tibialis anterior muscle의 중량이 C-peptide의 농도 의존적으로 증가하였고, 근섬유의 크기를 증가시켰으며, gastrocnemius muscle의 중량도 유의적으로 증가하였다 (Figure 9, 10). 또한 고농도의 C-peptide 그룹 (CON\_CH)은 grip strength도 유의적으로 증가하여 C-peptide에 의한 muscle mass와 muscle function의 개선을 확인할 수 있었다 (Figure 7). 게다가 C57BL/6J 마우스에 C-peptide를 투여하였을 때 대조군 마우스에 비해 Akt와 FoxO3a의 인산화에 의한 MuRF1과 Atrogin-1의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다 (Figure 15). 이를 통해 근위축시 증가하는 단백질 분해 인자들의 발현이 억제되는 것

을 확인하였다 [57]. 단백질 대사를 조절하는 다양한 경로 중 PI3K/Akt signaling pathway는 중요한 경로 중 하나이며 Akt는 mTOR를 통해 S6K1을 활성화하여 protein synthesis를 증가시킨다 [58, 59]. 본 연구에서는 C-peptide를 정상 상태의 마우스인 C57BL/6J 마우스에 투여하였을 때 단백질 합성에 관여하는 PI3K/Akt 및 mTOR signaling의 하위 인자인 P70S6K1과 4E-BP1의 인산화를 증가시켰다 (Figure 16). 이를 통해 근육 단백질 합성에도 긍정적인 역할을 하는 것을 확인하였다.

추가로 전사체들의 생물학적 의미를 이해하고 C-peptide에 의한 전사체 발현을 확인하기 위해 GO 분석을 진행하였다. GO 분석은 DAVID 분석 tool을 이용하였고, DAVID는 다양한 data base를 기반으로 유전자들의 상관관계를 통계적으로 분석하여 해당 유전자의 주요 기능을 분석하는 tool이다 [60]. 본격적인 분석에 앞서 이전 연구에서 밝혀진 당뇨 상태에서의 근육 관련 유전자 발현 비교를 진행하였고, 이전 연구와 동일하게 정상 마우스 대비 당뇨 마우스에서 AMPK signaling, insulin signaling에 관련한 *Pik3r1* 및 *Foxo1*의 수준은 상향 조절되었고, *Srebf1*, *Pfkfb3*, *Prkab2* 및 *8430426J06Rik*, *Foxo6os*의 수준은 하향 조절되었다 [61]. 본 연구에서는 C-peptide에 의한 정상 마우스와 당뇨 마우스의 공통적인 전사체 반응으로 protein ubiquitination과 염증 관련 반응을 발견하였다 (Table 4, 6). 하지만 당뇨병성 근위축증에서 C-peptide의 생리활성 효과에 대한 bio-marker 분석을 위해서는 추가적인 분석이 필요하다고 판단된다.

본 연구의 한계점으로는 C-peptide의 생체 내 반감기가 20~30분으로 단기간의 복강 내 주사만으로 마우스의 생체 내 일정한 C-peptide 농도를 유지하는데 어려움이 있다는 것이다 [52]. 하지만 짧은 반감기에도 불구하고 C-peptide는 제2형 당뇨병 마우스뿐만 아니라 정상 마우스의 근육 기능 개선 및 근육 내 신호전달에 긍정적인 역할을 하였다.

따라서 본 연구를 통해 C-peptide는 제2형 당뇨병성 근위축증의 예방 혹은 치료의 잠재적인 가능성을 제시한다. 또한 C-peptide가 정상 상태에서 근육량 및 근육 기능 개선에 유용할 수 있음을 시사한다.

## 제5장 결 론

본 연구에서는 C57BL/6J 마우스와 제2형 당뇨병 마우스인 *db/db* 마우스를 이용하여 제2형 당뇨병성 근위축증에 대한 C-peptide의 효과를 검증하였다. 4주간의 C-peptide의 처리는 *db/db* mice에서 근육량 및 근육 기능 개선 효과를 기대하였으나 본 연구에서 뚜렷한 결과를 확인할 수는 없었다. 하지만 *db/db* mice의 tibialis anterior muscle의 생체 내 분자생물학적 분석을 진행한 결과, 골격근 위축의 주요 마커인 MuRF1과 Atrogin-1의 단백질 발현 수준이 *db/db* mice에 비해 유의하게 감소하였다. 또한 단백질 분해에 관련된 인자들의 발현을 억제시키면서 단백질 합성에 관련한 P70S6K1의 인산화 역시 *db/db* mice에 비해 유의적인 증가를 보였다. 이는 C-peptide가 제2형 당뇨병 상태에서 근육 단백질 분해를 억제하고 근육 단백질 합성을 증가시켜 당뇨병성 근위축증 개선에 기여할 수 있음을 나타낸다.

한편 정상 mice에 C-peptide를 처리했을 때도 control 그룹에 비해 단위 체중 당 gastrocnemius muscle과 tibialis anterior muscle의 중량 및 근육 기능 (grip strength)이 유의적으로 증가하였다. 또한, 정상 mice에 C-peptide를 처리하였을 때 근섬유 크기의 향상도 확인할 수 있었다. C-peptide에 의한 근육조절 메커니즘 분석에서 C-peptide는 골격근 위축의 주요 마커인 MuRF1과 Atrogin-1의 발현을 유의적으로 감소시켰으며, 그 상위 인자인 FoxO3a와 Akt의 인산화도 control 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다. 더불어 단백질 합성에 관련하여 PI3K/Akt 및 mTOR pathway의 downstream factor인 P70S6K1과 4E-BP1의 인산화 역시 C-peptide의 처리로 control 그룹에 비해 유의적으로 증가하였다.

이는 C-peptide가 질병 상태뿐만 아니라 정상적인 상태에서도 근육량과 근육의 기능을 증가시키며 근육 단백질의 분해를 억제하고 근육 단백질 합성에 도움이 되어 향후 근위축증의 예방에 긍정적으로 작용할 수 있음을 시사한다.

## 제6장 참고문헌

1. OZOUGWU, J. C., et al. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol*, 2013, 4.4: 46-57.
2. ZHENG, Yan; LEY, Sylvia H.; HU, Frank B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature reviews endocrinology*, 2018, 14.2: 88-98.
3. JUNG, Chan-Hee, et al. Diabetes fact sheets in Korea, 2020: an appraisal of current status. *Diabetes & metabolism journal*, 2021, 45.1: 1-10.
4. ZHOU, Bin, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4· 4 million participants. *The lancet*, 2016, 387.10027: 1513-1530.
5. CHO, Nam H., et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 2018, 138: 271-281.
6. BROWNLEE, Michael. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001, 414.6865: 813-820.
7. DEFRONZO, Ralph A., et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 2015, 1.1: 1-22.
8. GUERRERO, N., et al. Premature loss of muscle mass and function in type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 2016, 117: 32-38.
9. 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.



10. LECKER, Stewart H., et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *The FASEB Journal*, 2004, 18.1: 39-51.
11. BODINE, Sue C. Disuse-induced muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2013, 45.10: 2200-2208.
12. PETERSON, Jonathan M.; BRYNER, Randall W.; ALWAY, Stephen E. Satellite cell proliferation is reduced in muscles of obese Zucker rats but restored with loading. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2008, 295.2: C521-C528.
13. KATTA, Anjaiah, et al. Impaired overload-induced hypertrophy is associated with diminished mTOR signaling in insulin-resistant skeletal muscle of the obese Zucker rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2010, 299.6: R1666-R1675.
14. WANG, Xiaonan, et al. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*, 2006, 147.9: 4160-4168.
15. LEENDERS, Marika, et al. Patients with type 2 diabetes show a greater decline in muscle mass, muscle strength, and functional capacity with aging. *Journal of the American Medical Directors Association*, 2013, 14.8: 585-592.
16. KROOK, Anna, et al. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes*, 1998, 47.8: 1281-1286.
17. GLASS, David J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature cell biology*, 2003, 5.2: 87-90.
18. GOMES, Marcelo D., et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98.25: 14440-14445.



19. KALYANI, Rita Rastogi; CORRIERE, Mark; FERRUCCI, Luigi. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 2014, 2.10: 819-829..
  
20. SANDRI, Marco. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2013, 45.10: 2121-2129.
  
21. BODINE, Sue C., et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 2001, 294.5547: 1704-1708.
  
22. SCHEFFNER, Martin; NUBER, Ulrike; HUIBREGTSE, Jon M. Protein ubiquitination involving an E1 - E2 - E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 1995, 373.6509: 81-83.
  
23. HRIBAL, Marta L., et al. Regulation of insulin-like growth factor - dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *The Journal of cell biology*, 2003, 162.4: 535-541.
  
24. MCFARLANE, Craig, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF  $\kappa$ B independent, FoxO1 dependent mechanism. *Journal of cellular physiology*, 2006, 209.2: 501-514.
  
25. SANDRI, Marco, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 2004, 117.3: 399-412.
  
26. EDGHILL, Emma L., et al. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes*, 2008, 57.4: 1034-1042.
  
27. WAHREN, John; KALLAS, Åsa; SIMA, Anders AF. The clinical potential of

- C-peptide replacement in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2012, 61.4: 761-772.
28. RUBENSTEIN, Arthur H., et al. Secretion of proinsulin C-peptide by pancreatic  $\beta$  cells and its circulation in blood. *Nature*, 1969, 224.5220: 697-699.
  29. JONES, A. G.; HATTERSLEY, A. T. The clinical utility of C peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetic medicine*, 2013, 30.7: 803-817.
  30. WAHREN, John, et al. Role of C-peptide in human physiology. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 2000, 278.5: E759-E768.
  31. YOSTEN, Gina LC, et al. Physiological effects and therapeutic potential of proinsulin C-peptide. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2014, 307.11: E955-E968.
  32. HILLS, Claire E.; BRUNSKILL, Nigel J. Intracellular signalling by C-peptide. *Experimental diabetes research*, 2008, 2008.
  33. GRUNBERGER, G., et al. Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-peptide. *Diabetologia*, 2001, 44: 1247-1257.
  34. OHTOMO, Y., et al. C-peptide stimulates rat renal tubular  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in synergism with neuro peptide Y. *Diabetologia*, 1996, 39: 199-205.
  35. WAHREN, John, et al. Molecular and cellular effects of C-peptide—new perspectives on an old peptide. *Experimental diabetesity research*, 2004, 5.1: 15-23.
  36. JOHANSSON, B. L., et al. Beneficial effects of C peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with Type 1 diabetes mellitus. *Diabetic medicine*, 2000, 17.3: 181-189.
  37. HILLS, Claire E.; BRUNSKILL, Nigel J.; SQUIRES, Paul E. C-peptide as a therapeutic tool in diabetic nephropathy. *American journal of nephrology*, 2010,

31.5: 389-397.

38. JEON, Hye-Yoon, et al. C-peptide attenuates hyperglycemia-induced pulmonary fibrosis by inhibiting transglutaminase 2. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2022, 68.4: 209-223.
39. IDO, Y., et al. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science*, 1997, 277.5325: 563-566.
40. LIM, Young-Cheol, et al. Proinsulin C-peptide prevents impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135.1: 269-278.
41. WAHREN, J.; EKBERG, K.; JÖRNVALL, H. C-peptide is a bioactive peptide. *Diabetologia*, 2007, 50: 503-509.
42. BHATT, Mahendra Prasad, et al. C-peptide prevents hyperglycemia-induced endothelial apoptosis through inhibition of reactive oxygen species - mediated transglutaminase 2 activation. *Diabetes*, 2013, 62.1: 243-253.
43. THOMA, Anastasia; LIGHTFOOT, Adam P. NF-κB and inflammatory cytokine signalling: role in skeletal muscle atrophy. *Muscle Atrophy*, 2018, 267-279.
44. 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.
45. KANG, Seol-Hee, et al. Forkhead box O3 plays a role in skeletal muscle atrophy through expression of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogen-1 in Cushing's syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2017, 312.6: E495-E507.
46. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Analytical biochemistry, 1976, 72.1-2: 248-254.

47. LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 2012, 9.4: 357-359.
48. QUINLAN, Aaron R.; HALL, Ira M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 2010, 26.6: 841-842.
49. GENTLEMAN, Robert C., et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology*, 2004, 5.10: 1-16.
50. FERRANNINI, Ele. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocrine Reviews*, 1998, 19.4: 477-490.
51. IOLASCON, Giovanni, et al. Physical exercise and sarcopenia in older people: position paper of the Italian Society of Orthopaedics and Medicine (OrtoMed). *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2014, 11.3: 215.
52. 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.
53. YIN, Lin, et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacological research*, 2021, 172: 105807.
54. O'NEILL, Brian T., et al. FoxO transcription factors are critical regulators of diabetes-related muscle atrophy. *Diabetes*, 2019, 68.3: 556-570.
55. DUTT, Vikas, et al. Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 2015, 99: 86-100.
56. YOON, Mee-Sup. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass. *Frontiers in physiology*, 2017, 8: 788.

57. 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.
58. FANZANI, Alessandro, et al. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2012, 3: 163-179.
59. BODINE, Sue C., et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology*, 2001, 3.11: 1014-1019.
60. HUANG, Da Wei, et al. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome biology*, 2007, 8.9: 1-16.
61. KESHARWANI, Devesh, et al. RNA sequencing reveals potential interacting networks between the altered transcriptome and ncRNome in the skeletal muscle of diabetic mice. *Bioscience Reports*, 2021, 41.7.