



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](#)

이학 석사학위 논문

C2C12 근육세포에서 MS-275에 의한
지방독성 회복 효능 및 기전연구



아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

이 한 별

C2C12 근육세포에서 MS-275에 의한
지방독성 회복 효능 및 기전연구

지도교수 이 관 우

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2021년 2월

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

이 한 별

이한별의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 관 우 인

심 사 위 원 강 엽 인

심 사 위 원 최 성 이 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2020년 12월 17일

C2C12 근육세포에서 MS-275에 의한

지방독성 회복 효능 및 기전연구

비만은 지방이 체내에 과도한 지방축적에 의해 나타나는 현상이며, 비만은 내당능이상, 고지혈증, 고혈압 등의 다른 심혈관계 위험인자를 동반하며, 지방과다증, 이상지질증, 인슐린저항성 및 지방간과 같은 대사증후군과 밀접한 관련성이 있다. 히스톤디아세틸라제 억제제는 히스톤과 비 히스톤 단백질의 탈 아세틸 화를 억제하여 유전자 발현을 조절함으로써 다양한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 여기에는 항암, 항 비만 및 항 당뇨 효과는 물론 심혈관 보호 활동이 포함되는데 MS-275는 HDAC3 억제제에 속하는 약물이며, 갈색지방 조직 인자를 증가시켜 활성화시킨다고 알려져 있다. 그러나, MS-275가 C2C12 근육세포 및 골격근 조직의 지방독성에 미치는 영향은 아직 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 지방독성 조건인 즉, 팔미트산 처리된 C2C12 근육세포에서 MS-275의 지방산 독성 억제 효과를 조사했다. C2C12 근육세포에 팔미트산 처리는 HDAC3 단백질 발현을 증가시키고, 염증성 사이토카인 발현과 인슐린 저항성도 증가시켰다. 대조적으로, MS-275를 처리한 C2C12 근육세포는 팔미트산의 독성으로 유발되는 인슐린 저항성과 염증성 사이토카인 발현 증가를 억제하였다. 또한, C2C12 근육세포에서 MS-275 약물을 단독으로 농도별 처리했을 때 미토콘드리아의 바이오제네시스를 조절하는 PGC1- α 와 포도당 수송체인 GLUT4의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들로 MS-275가 지방독성에 의한 C2C12 근육세포의

보호작용이 있음을 확인하였다. 그러므로 MS-275는 근육세포에서 염증 완화 및 인슐린 저항성 치료에 효과적 일 수 있음을 시사한다.

핵심단어: C2C12, 인슐린저항성, HDAC3, 근육세포, MS-275, 염증



차 례

국문요약.....	i
차 례	iii
도표 차례.....	v
그림 차례.....	vi
약어.....	ix
I. 서론.....	1
II 연구 재료 및 방법.....	5
A. 연구 재료.....	5
B. 연구 방법.....	5
1. 세포주 및 세포배양.....	5
2. preparation of PA.....	5
3. Uptake of 2-NBDG.....	6
4. Western blot analysis	6
5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)	7
III. 결과.....	8
A. 근아세포인 C2C12 의 분화.....	8
B. 팔미트산이 인슐린 저항성과 염증에 미치는 영향.....	10
C. 팔미트산에 의한 HDAC3 의 단백질 발현조사.....	14
D. MS-275 에 의한 팔미트산 유도 인슐린 저항성과 염증 감소 효과.....	16
E. MS-275 약물 단독에 의한 효과 조사.....	20
IV 고찰.....	22
V 결론.....	25
참고문헌	26



도표 차례

도표 1. Quantitative real time-PCR 에 사용한 Primer 서열과 목록.....	7
도표 2. Immunoblotting 에서 사용한 항체 목록	8



그림 차례

그림 1. C2C12 근아세포를 분화배지로 배양하여 분화유도.....	18
그림 2. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 포도당 흡수율과 염증 신호 조사.....	20
그림 3. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 염증관련 유전자 발현 증가 확인.....	21
그림 4. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 인슐린 신호 조사.....	22
그림 5. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 HDAC3의 단백질 발현 조사.....	24
그림 6. C2C12 근육세포에서 MS-275 약물에 의한 염증 신호 조사.....	26
그림 7. C2C12 근육세포에서 MS-275 약물에 의한 염증 관련 유전자 조사.....	27
그림 8. C2C12 근육세포에서 MS-275를 통한 인슐린 신호 조사.....	28
그림 9. C2C12 근육세포에서 MS-275 농도별 처리시 PGC1- α 와 GLUT4의 변화 확인.....	30

도표

도표 1. Quantitative real time-PCR에 사용한 Primer 서열과 목록

유전자		Forward (5'-3')
		Reverse (5'-3')
TNF- α	F	TCC AGG CGG TGC CTA TGT CT
	R	AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG
IL1 β	F	TCT CGC AGC AGC ACA TCA ACA
	R	CCT GGA AGG TCC ACG GGA AA
IL6	F	ATG CTG GTG ACA ACC ACG GC
	R	AGG AGA GCA TTG GAA ATT GG
(PGC)-1 α	F	CAA GGC TGG AAG AAG ACT GG
	R	GCA AAG AGG CTG GTC TTC AC
GLUT4	F	GAT GCC GTC CCA GCA
	R	TGA GGG TGC CTT GTG GGA TGG
Actin	F	CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG
	R	TAG CTC TTC TCC AGG GAG G

도표 2. Immunoblotting에서 사용한 항체 목록

항체	회사명	카탈로그 번호
HDAC3(D201K)	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)	85057
phospho-AKT(Ser473)		9271
total AKT		9272
phospho-GSK3 α/β (Ser21/9)		9331
total GSK3 β		9315
phospho-JNK (Thr183/Tyr185)		9251
total JNK		9252
Phospho-NF- κ B(Ser536) (93H1)		3033
Total NF- κ B		3034
actin		Bethyl laboratories (Montgomery, TX, USA)
α -tubulin(B-7)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	5286

약어

PA	Palmitic acid
FFA	Free Fatty acid
HDAC3	Histone deacetylase 3
HDACi	histone deacetylase inhibitor
P-AKT	phospho-AKT
T-AKT	Total AKT
P-GSK3 α/β	Phospho-GSK3 α/β
T-GSK3 β	Total GSK3 β
P-JNK	Phospho-JNK
T-JNK	Total JNK
P-NF- κ B	Phospho-NF- κ B
T-NF- κ B	Total NF- κ B
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
DMEM	Dulbecco' s modified Eagle' s medium
BSA	Bovine serum albumin
FBS	fetal bovine serum
cDNA	complementary DNA
mRNA	messenger RNA
mRNA	Glucose Transporter Type 4
(PGC)-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator

I. 서론

최근 전 세계적으로 신체적 활동은 급격히 감소하고, 높은 칼로리 및 지방 섭취로 인한 과체중 및 비만 인구는 급속도로 증가하고 있다고 보고되었다 (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2010). 비만은 지방이 체내에 과도한 지방축적에 의해 나타나는 현상을 말하며, 내당능이상, 고지혈증, 고혈압 등의 다른 심혈관계 위험인자를 동반하며 지방과다증, 이상지질증, 인슐린저항성 및 지방간과 같은 대사증후군과 밀접한 관련성이 있다 (Houstis et al., 2006). 또한 당뇨병 및 당뇨병 관련 질환의 발병과 진행은 간, 지방 조직 및 골격근과 같은 인슐린 민감성 조직에서 인슐린 작용이 손상된 것이 특징인 인슐린 저항성과 연관되어 있다.

인슐린은 당질, 지질 및 단백질 등 에너지대사를 조절하는 가장 중요한 생체호르몬이다. 또한 인슐린은 근육에서 단백질 분해를 억제하고, 간과 지방 조직에서는 지방산 분해를 억제하여, 섭취된 포도당을 지방으로 저장한다 (Van Greevenbroek et al., 2013). 인슐린 저항성이란 주어진 인슐린 농도에서 인슐린에 대한 반응이 정상보다 감소되어 있는 상태를 말한다 (최철수, 2009). 그리고 지질대사의 이상을 일으켜 중성지방을 상승시키며, 고혈압으로의 진행을 촉진하고 혈류의 흐름을 방해하는 체내 대사의 전체적인 원인이 된다 (Shulman, 2000) 인슐린 저항성이 유발되면 간에서는 포도당 신생성의 억제를 못하게 되며, 골격근에서는 인슐린 신호전달, 포도당 흡수, 포도당 대사 등의 장애가 나타난다. 또한, 췌장 β -세포에서 분비된 인슐린이 제대로 작동하지 않아 지속적인 인슐린 분비가 유도되므로 베타세포의 기능장애가 유발되기도 한다 (Pendergrass et al., 2007) 최근의 보고에 의하면, 비만상태에서 혈중에 많이 존재하는 유리지방산, 염증성 사이토카인 등 인슐린 신호를 저해하여 인슐린 저항성을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Funaki, 2009). 고농도의 유리지방산, 특히

팔미트산은 골격근 세포에서 인슐린 신호를 직접적으로 손상시킬 수 있으며, 높은 혈장 유리지방산(FFA) 수치는 골격근 인슐린 저항성의 유도에 기여하는 잘 알려진 위험 요인이다 (Griffin et al., 1999). 팔미트산은 골격근 세포에서 TNF- α , IL-6 와 같은 사이토카인의 생성을 촉진해 염증을 유발하고 인슐린 저항성을 유도한다. IL-6 역시 다양한 염증성 사이토카인의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 골격근에서 NF- κ b 의 경로를 통해 TNF- α 와 IL-6 와 같은 친염증 사이토카인의 발현을 유도한다고 보고되었다 (Gao et al., 2002). 골격근은 인슐린 저항성이 일어나는 핵심 조직이며, 동시에 에너지 생산, 열생산의 작용을 통한 생체에너지 조절을 한다고 밝혀졌다. 최근 비만 및 제 2 형 당뇨 연구에서 골격근을 치료 타겟으로 한 연구들이 활발하게 이뤄지고 있지만, FFA 로 유도된 골격근 인슐린 저항성의 기초가 되는 연구는 여전이 필요하다.

최근 비만 및 제 2 형 당뇨병 관련 질환의 연구에 있어서 골격근이 중요하게 다뤄지고 있다. 제 2 형 당뇨에서 인슐린 저항성은 인슐린 자극에 의한 골격근에서의 포도당 흡수 및 대사 감소를 초래하여 혈당을 증가시키는 중요한 원인이 된다. 비만 및 당뇨병 환자인 경우 지방을 저장하는 기능이 증가되어 근육 내 지방이 축적되고 지방의 분해 산물인 diacylglycerol (DAG)가 증가하게 되어 근육 내에서의 인슐린 저항성을 초래하게 된다. 정상적인 사람인 경우에는 근육이 지방을 분해하기 위해 미토콘드리아의 기능이 증가되고, 저장 지방의 분해 산물인 DAG 가 분해되어 근육 내 낮은 농도로 존재하게 되는 차이가 있다 (Dubé et al., 2008).

후생유전적 조절 이상은 심혈관 질환, 비만, 제 2 형 당뇨병과 같은 여러 대사 장애와 관련이 있다고 보고되었다. 히스톤 디아세틸라아제는 히스톤의 아세틸기를 제거함으로써 전사를 억제하고 있다. 히스톤 디아세틸라아제는(HDACs)는 class-I (HDAC1, 2, 3, 8), class-IIa (HDAC4, 5, 7, 9), class-IIb (HDAC6, 10), class-IV (HDAC 11)로 나뉘며, Class III HDAC 들은

sirtuin 들이며, 다른 HDAC 들과 다소 기능이 중복된다. 히스톤 디아세틸라아제 억제제(histone deacetylase inhibitor; HDACi)는 히스톤의 라이신 잔기를 탈아세틸화시키는 효소를 저해함으로써 DNA 와 히스톤 단백질로 이루어진 nucleosome 을 풀어 유전자가 발현될 수 있도록 하는 약제이다. Histone deacetylase inhibitor(HDACi)는 다양한 암종에 대한 항암제로 개발되었지만 뇌질환, 감염, 염증에도 효능이 있다고 보고되었다 (Qiu et al., 2013). 히스톤디아세틸라제 3 (HDAC3)는 Class 1 의 주요 HDAC 으로, HDAC3 억제제는 지방대사 및 미토콘드리아를 활성화시켜 지방 산화 대사 및 간 지질 대사 조절에 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다 (Hur, 2015). 히스톤디아세틸라제는 에너지 대사와 밀접한 관련이 있다고 보고되었다 (Ferrari et al., 2017). MS-275 처치는 포도당 내성 및 대사 산화를 촉진하여 고지방식이 유도 비만 마우스의 백색지방 조직이 감소되고 베이지 지방과 갈색지방을 활성화하여 신진 대사를 개선하였고 체중감량을 유도하였다 (Galmozzi et al., 2013). 골격근은 인슐린 저항성 조절을 위한 주요 조직이지만 팔미트산에 의한 골격근 인슐린 저항성에서의 HDAC3 억제제인 MS-275 의 효과는 아직 보고된 바 없다.

HDAC 억제제의 주요 타겟으로 알려진 PGC1- α 는 다른 조직과 비교해서 갈색 지방, 심장, 신장, 골격근에 높은 농도로 존재하여 에너지 항상성, 체온조절, 당대사에 관련된 여러 가지 생리적인 반응들에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Kelly and Scarpulla, 2004) 또한, PPAR β/δ 에 의한 PGC-1 α 단백질 증가는 미토콘드리아 생합성 증가를 유도한다고 알려져 있다 (정수련 et al., 2015). PGC-1 α 의 대사조절 장애는 인슐린 저항성 및 당뇨병의 발병 요인이 될 수 있으며 (Lin et al., 2005). 근 기능 감소에 직접적인 영향을 미칠 수 있다 (Suetta et al., 2012). PGC1- α 는 골격근 세포에서 미토콘드리아 생성과 활성을 조절하는데 영향을 줄 뿐만 아니라 인슐린에 민감한 포도당 수송체 (GLUT-4)의 유전자 발현을 증가시켜 포도당 흡수를 증가시킨다. GLUT-4 유전자 발현에 대한 PGC1- α 의 이런

효과는 근육 전사 조절 인자인 MEF2 와 결합, 보조 활성인자 활성화를 통해 일어난다고 보고되었다 (Lee, 2004).

골격근 세포주로 널리 알려진 C1C12 myoblast 는 근육으로 분화되기 전 단계의 세포로서, 여러가지 호르몬이나 외부자극에 의해 다핵의 myotube 로의 형태적인 분화되는 특징이 있다. C2C12 근육세포에 지방산 처리는 인슐린 저항성 및 염증반응이 생성시켜 생체에서 유발되는 현상을 재현시켜준다고 보고된 바 있다. 최근에 골격근을 치료 타겟으로한 연구들에서 C2C12 근육세포를 이용한 연구가 활발하게 이뤄지고 있다. 그러나 C2C12 근육세포에서 HDAC3 억제제인 MS-275 의 역할이나 효과는 잘 안 알려져 있다. 본 연구에서는 C2C12 근육세포에서 MS-275 를 사용하여 팔미트산에 의해 유도되는 인슐린 저항성과 염증을 억제하는지 확인하고자 조사하였다.

II. 연구 재료 및 방법

A. 연구 재료

이 연구에서 사용된 Entinostat (MS-275)는 MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)에서 구입하였다. bovine serum albumin (BSA; 2207008), PA (P5585), 및 insulin (I9278)을 포함한 시약은 Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA)에서 구입하였다. 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG; N13195), 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY™493/503; D3922) Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

B. 연구 방법

1. 세포주 및 세포배양

근육세포인 C2C12는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-low)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제 (10 µg/mL streptomycin and 100 IU/mL penicillin)를 첨가하여 37 °C의 온도와 5% CO₂의 배양조건에서 배양되었다. 배양 이틀 후, C2C12는 2% 말 혈청이 첨가된 DMEM에서 분화되었으며, 3~5일동안 매일 배지를 교환하였다.

2. preparation of PA

PBS 20 ml에 PA를 20 mM의 농도로 70 °C에 녹인 후 1 M NaOH를 200 µl 넣어 비누화과정을 30분간 진행하였다. 비누화과정을 끝낸 PA에 Bovine serum albumin(BSA)를 PA와 3:1의 비율로 합성해 사용하였다.

3. Uptake of 2-NBDG

근육세포인 C2C12 는 300 또는 400 μM PA 를 사용하거나 사용하지 않고 16 시간 동안 전 처리한 후, 4 시간 동안 혈청이 없는 배지로 교환하였다. 그런 다음 세포를 37 ° C 에서 2 % BSA 를 포함하는 Krebs-Ringer 중탄산염 완충액 (pH 7.4)에서 30 분 동안 배양한 다음, 100 nM 인슐린 유무에 관계없이 500 μM 2-NBDG 로 37 ° C 에서 2 시간 동안 처리하였다. 수집된 세포를 lysis buffer 로 용해하고 12,000rpm 에서 30 분간 원심분리하여 분리된 상층액을 2-NBDG 의 형광강도 Spectra Max iD3 마이크로 플레이트 리더를 (Molecular Devices, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 사용하여 측정하였다. (excitation: 475 nM; emission: 550 nM)

4. Western blot analysis

근육세포인 C2C12 및 마우스 비복근을 프로테아제 억제제 칩테일이 보충된 RIPA 완충액으로 용해시켰다. [150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 50 mM Tris-HCl (pH7.5)] 동일한 농도의 단백질을 8-12 % 폴리아크릴아미드로 분리된 SDS 샘플버퍼에 50mM Tris-Cl at pH 6.8, 2% SDS, 100 mM DL-dithiothreitol (DTT), 10% glycerol), 8-12 % 폴리아크릴아미드에서 분리하여 폴리 (vinylidene fluoride) (PVDF) 멤브레인 시트로 옮겼다. 5 % 탈지분유에서 30 분동안 멤브레인을 코팅한 후, 실온에서 2 시간 동안 1 차항체와 반응시켰다. 이어서 멤브레인을 실온에서 1 시간 동안 2 차항체와 (항 토끼 IgG 항체) 함께 반응시킨 후, ECL (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo, Rockford, IL, USA)의 luminol 을 산화시켜 방출되는 빛을 사용하여 면역반응 밴드를 검출하였다. 밴드강도는 Quantity

One 1D 이미지분석 소프트웨어 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정되었다.

5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNAiso Plus 시약 (Takara Bio, Shiga, Japan)을 사용하여 세포 및 마우스 비복근에서 총 RNA 를 추출하였다. cDNA 는 TaKaRa RNA PCR Kit (버전 3.0; TaKaRa Bio, Shiga, Japan)와 함께 제공된 AMV 역전사 효소 및 무작위 9-mer 를 사용하여 합성되었다. PCR 증폭을 위한 프라이머 세트는 Table 1 에 나열되어 있다. TaKaRa TP-815 기기를 사용하여 SYBR Green (TaKaRa Bio)으로 정량 실시간 PCR 을 수행하였다. 증폭된 DNA 의 상대적인 양은 TP-815 기기와 함께 번들로 제공되는 소프트웨어를 사용하여 분석되었고 마우스 36B4 mRNA 수준으로 정량되었다.

Ⅲ. 결과

A. 근아세포인 C2C12의 분화.

골격근 세포는 근육 분화과정을 통해 myoblast에서 myotube로 자라면서 세포의 형태가 변화된다. 처음에는 단핵상태인 원형에서 크기가 커지다가 방추형으로 변하며, 분화되는 시점부터 세포들이 길어지면서 관 형태인 myotube로 분화가 된다 (Song, 2015) 본 연구에 사용한 C2C12는 미분화 근아세포로 12 well plate로 분주 후 분화배지로 교환하여 5일 동안 배양하였다. 근육세포의 분화정도를 알아보기 위해서 Phalloidin 염색과 분화마커를 qPCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 근관이 붉은색으로 염색된 미세섬유를 볼 수 있으며, 세포의 형태가 근육세포와 유사하게 길쭉한 형태의 근세포로 성장하였음을 확인할 수 있었다 (그림 1-A). 근육분화의 표지인자들인 MYH2, MYOG, MYOD, Mef2C mRNA 발현량을 확인한 결과 대조군에 비해서 MYH2, MYOG, MYOD, Mef2C 모두 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (그림 1-B).

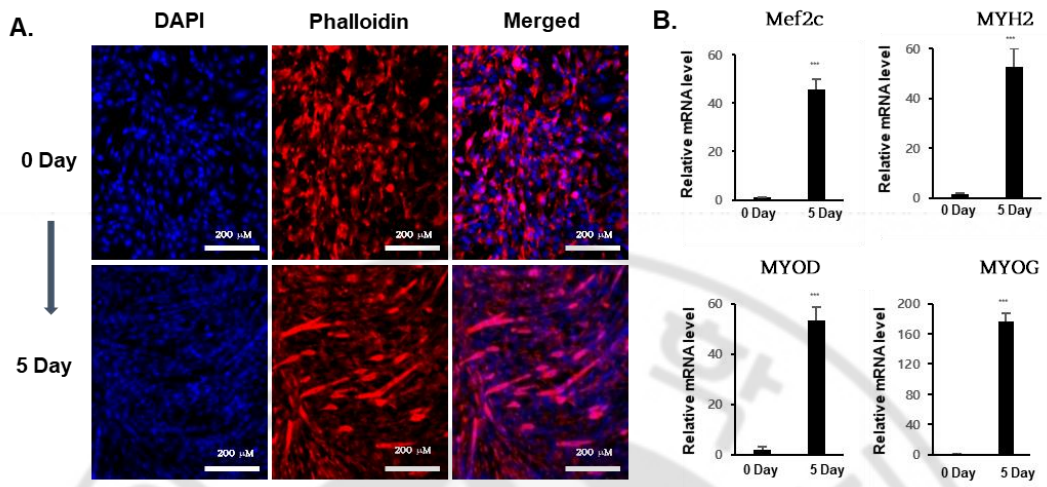


그림 1. C2C12 근아세포를 분화배지로 배양하여 분화유도. C2C12를 분주하고 배양 이틀째부터 2% 말의 혈청이 포함된 분화용 배지로 교환한 후, 24 시간 간격으로 배지를 교환하면서 5 일동안 분화시켰다. (A) 근관을 Rhodamine-phalloidin으로 염색하여 현광현미경을 통해 형태학적 변화를 확인하였다. (B) MYH2, MYOG, MYOD, Mef2C의 mRNA 발현량을 qPCR 방법으로 확인하였다. *** $P < 0.01$ vs. 분화배지로 배양하지 않은 세포.

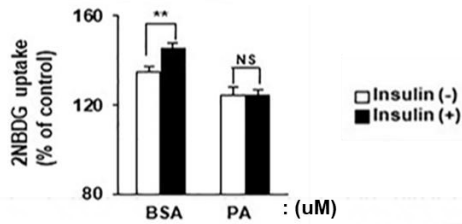
B. 팔미트산이 인슐린 저항성과 염증에 미치는 영향.

분화된 C2C12 근육세포에 지방산이 인슐린 저항성이 유도하는지 알아보기 위해 배양세포에 팔미트산을 농도별로 (300, 400 μ M) 10 시간 동안 처리한 후 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수율을 2-NBDG uptake 방법을 통해 조사하였고, 염증 신호와 인슐린 신호는 단백질 면역 블랏을 통해 확인하였다. 그리고 염증성 사이토카인의 발현은 qPCR 법으로 조사하였다.

그 결과 인슐린 자극을 하지 않은 세포에 비해 인슐린이 자극되었을 때 포도당 흡수가 증가하는 반면, 팔미트산을 처리하면 인슐린에 의한 포도당 흡수가 증가하지 않았다. 즉 인슐린 저항성이 유발되었음을 확인하였다 (그림 2-A). 팔미트산에 의해서 대표적인 염증성 신호인 p-JNK 및 p-NF- κ B 활성을 단백질 면역 블랏 방법으로 조사한 결과 팔미트산은 C2C12 에서 p-JNK 및 p-NF- κ B 증가시켰다. 즉 팔미트산에 의해서 p-JNK 및 p-NF- κ B 경로를 통해 염증성 신호가 활성화됨을 확인하였다 (그림 2-B). 염증성 사이토카인 인자인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 발현도 팔미트산 처리에 의해 증가하였다 (그림 3). 즉 염증과 관련된 유전자도 팔미트산 처리에 의해 발현이 증가함을 확인하였다.

인슐린을 세포에 처리했을 때 인슐린 신호인 AKT, p-AKT, GSK3 β , p-GSK3 β 의 활성도 단백질 면역 블랏으로 확인하였다. 그러나 팔미트산을 처리한 세포에서는 인슐린을 처리해도 인슐린 신호가 활성화되지 않음을 확인하였다 (그림 4). 이와 같은 결과를 토대로 본 실험에서는 팔미트산이 C2C12 근육세포에서 지방독성을 유도하여 인슐린 저항성과 염증의 유도에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다.

A.



B.

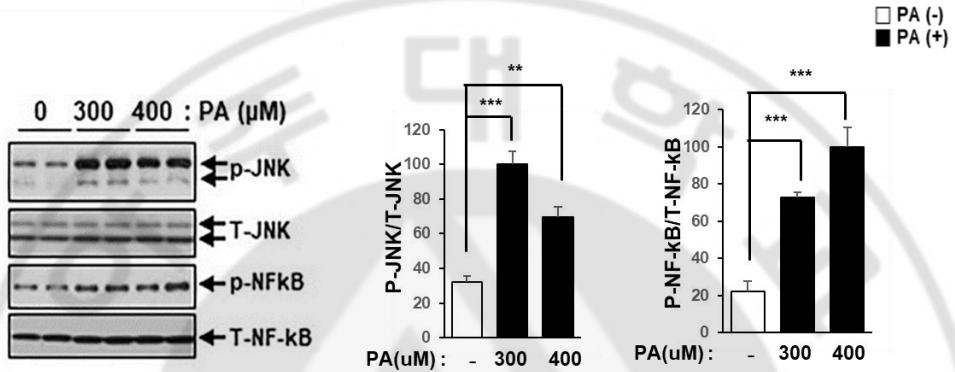


그림 2. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 포도당 흡수율과 염증 신호 조사 (A) C2C12 근육세포에 팔미트산 400 μM 을 12 시간 동안 처리한 후, 100 nM 인슐린으로 3 시간 동안 자극하였다. 2-NBDG 흡수는 SpectraMax iD3 microplate reader (excitation: 475 nM; emission: 550 nM) 사용하여 측정하였다. ** $p < 0.001$ vs. insulin처리하지 않은 세포. (B) C2C12 근육세포에 팔미트산 300 μM , 400 μM 을 10 시간동안 처리하여 phospho-JNK, total-JNK, Phospho-NF-kB, total-NF-kB의 수준을 단백질 면역 블랏 방법으로 분석하였다. *** $p < 0.001$ vs. PA처리하지 않은 세포.

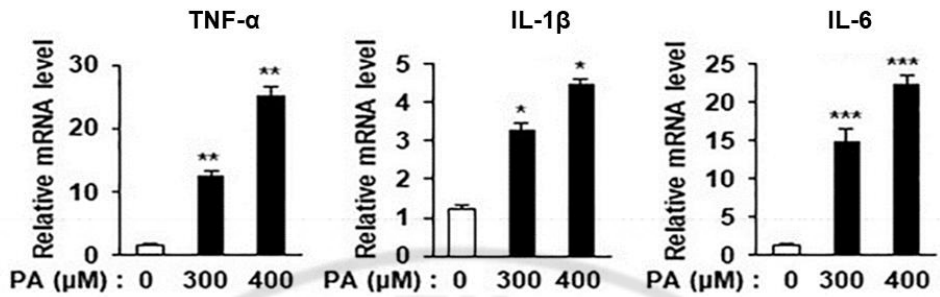


그림 3. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 염증관련 유전자 발현 증가 확인. C2C12 근육세포에 팔미트산 300 μ M, 400 μ M을 10 시간 동안 처리한 후 세포추출액에 존재하는 염증과 관련된 유전자 발현을 실시간 qPCR 법에 의해 확인하였다. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$ vs. PA처리하지 않은 세포.

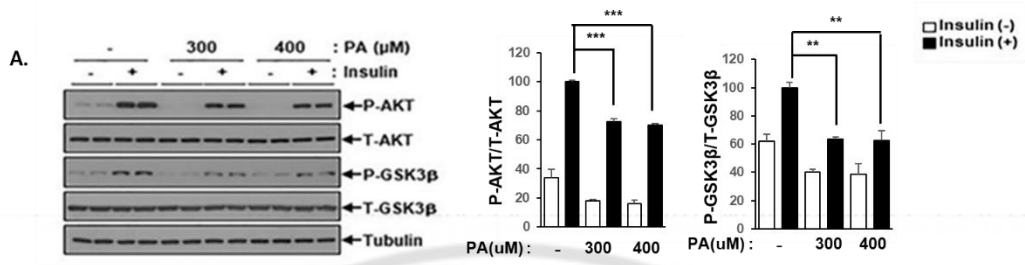
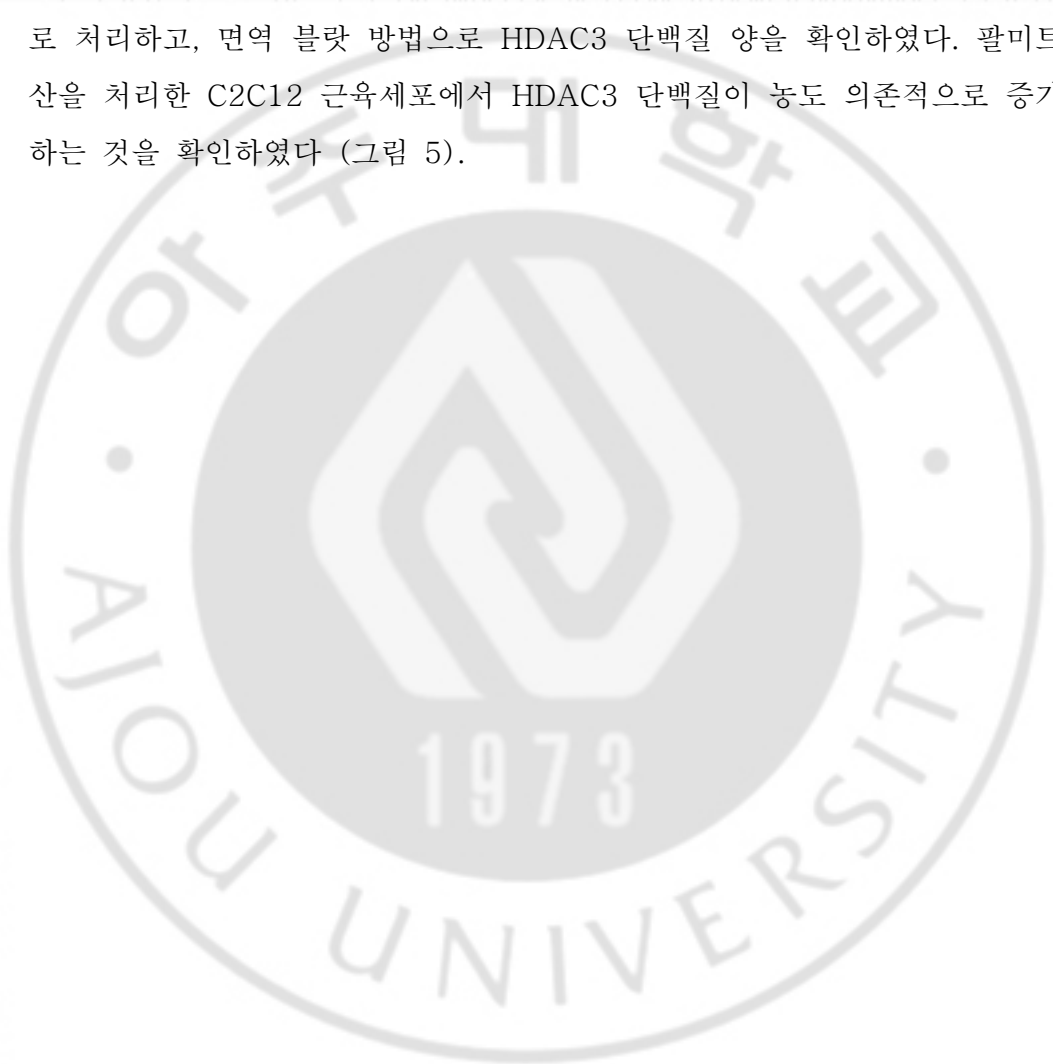


그림 4. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 인슐린 신호 조사. (A) 팔미트산 300 μ M, 400 μ M을 10 시간 처리한 후, 100 nM 인슐린으로 20 분 자극하였다. 세포에서 단백질을 추출 후 phospho-AKT(ser473), total-AKT, Phospho-GSK, total-GSK의 단백질을 면역 블랏 방법으로 분석하였다. ** $p < 0.01$ vs. PA처리하지 않은 세포.

C. 팔미트산에 의한 HDAC3의 단백질 발현조사.

팔미트산을 처리하였을 때 염증 신호와 염증성 사이토카인이 증가하고 인슐린 저항성이 유발하는 것을 확인하였다. 이 때 HDAC3 발현에는 어떤 변화가 있는지 알아보기 위해 분화된 C2C12 근육세포에 팔미트산을 농도별로 처리하고, 면역 블랏 방법으로 HDAC3 단백질 양을 확인하였다. 팔미트산을 처리한 C2C12 근육세포에서 HDAC3 단백질이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (그림 5).



A.

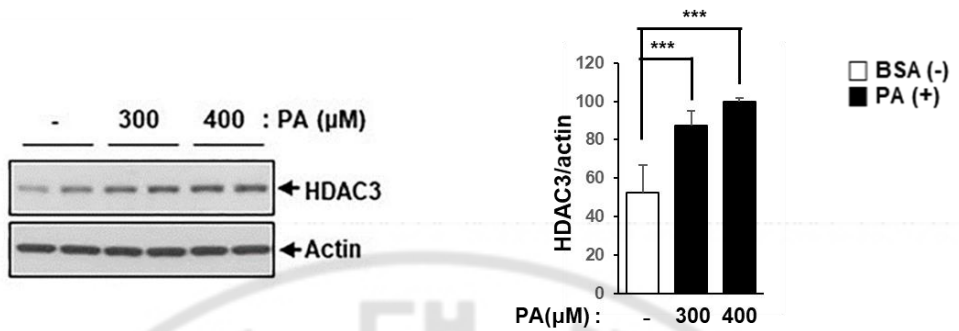


그림 5. C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의한 HDAC3의 단백질 발현 조사.
(A) C2C12 근육세포에 팔미트산 300 μM, 400 μM을 10 시간동안 처리하여 HDAC3의 단백질 수준을 면역 블랏 방법으로 분석하였다. ***p<0.001 vs. PA처리하지 않은 세포.

D. MS-275 에 의한 팔미트산 유도 인슐린 저항성과 염증 감소 효과.

근육세포에서 팔미트산 처리에 의해 염증반응과 인슐린 저항성 등의 지방독성 발생시에 HDAC3 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 지방독성과 HDAC3 의 연관성을 조사하기 위해서 HDAC3 의 억제제인 MS-275 처리 후 팔미트산에 의해 유도된 인슐린 저항성과 염증을 감소시키는지 확인하였다.

C2C12 근육세포에서 MS-275 처리 하였을때, 팔미트산에 의해 증가된 P-JNK, P-NF- κ B 와 같은 염증 신호가 감소되는 것을 관찰하였다 (그림 6). 또한, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 와 같은 유전자 발현도 MS-275 처리에 의해 감소되는 것을 확인하였다 (그림 7). 팔미트산에 의해 감소된 인슐린 신호인 AKT 와 GSK β 의 인산화 활성이 MS-275 처리에 의해 회복되는 것을 관찰하였다 (그림 8). 이와 같은 결과를 토대로 이 MS-275 의 처리는 C2C12 근육세포에서 팔미트산에 의해 유도된 인슐린 저항성과 염증을 예방하는 지방독성에 대한 보호효과를 가지고 있다는 것을 확인하였다.

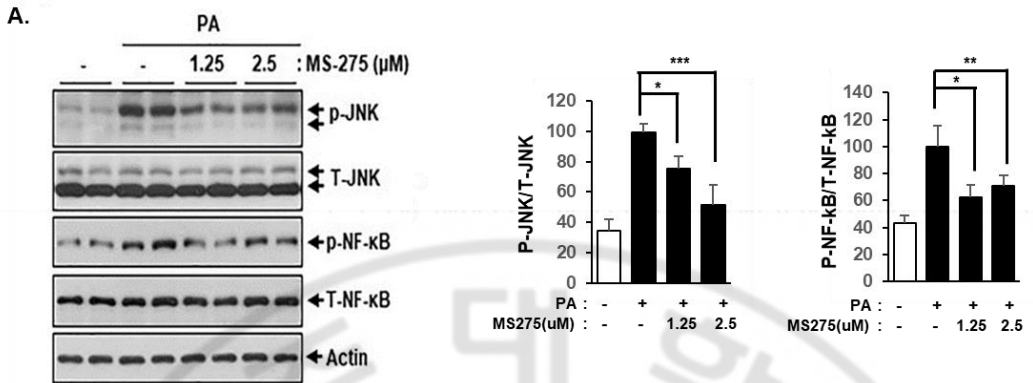


그림 6. C2C12 근육세포에서 MS-275 약물에 의한 염증 신호 조사. (A) C2C12 근육세포에 MS-275를 1.25와 2.5 μM 로 1 시간 전처리 한 후, 팔미트산을 300 μM 로 10 시간 처리하였다. 세포 추출물에서 단백질 면역블랏 방법을 통해 phospho-JNK, total-JNK, Phospho-NF-kB, total-NF-kB의 활성을 분석하였다. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$.

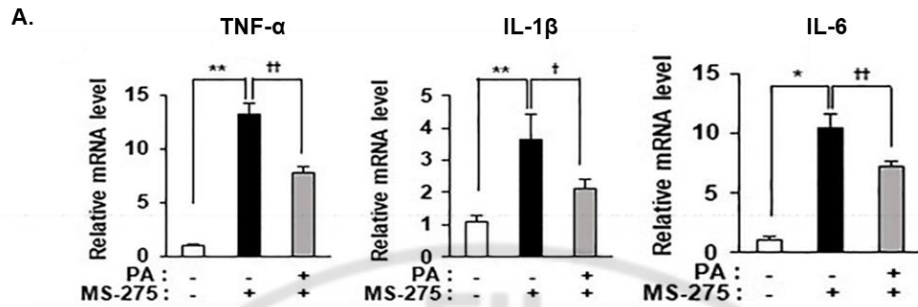


그림 7. C2C12 근육세포에서 MS-275 약물에 의한 염증 관련 유전자 조사.
 (A) C2C12 근육세포에 MS-275를 2.5 μ M로 1 시간 전처리 한 후, 팔미트산을 300 μ M 10 시간 처리하였다. 염증과 관련된 유전자인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 발현을 실시간 qPCR에 의해 확인하였다. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$ vs. PA처리하지 않은 세포.

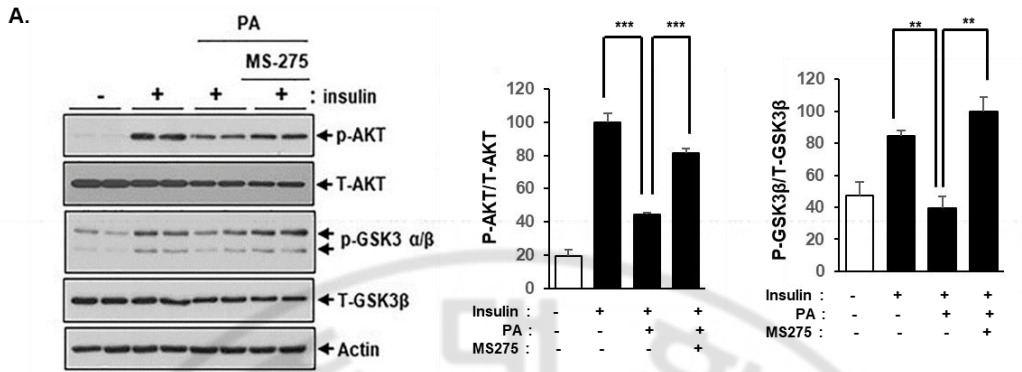


그림 8. C2C12 근육세포에서 MS-275를 통한 인슐린 신호 조사. (A) C2C12 근육세포에 MS-275를 2.5 μ M로 1 시간 전처리 한 후, 팔미트산을 300 μ M 10 시간 처리하였다. 세포를 수거하기 전 100 nM 인슐린으로 20분 자극한 후, 세포 추출물을 단백질 면역 블랏 방법을 통해 phospho-AKT(ser473), total-AKT, Phospho-GSK, total-GSK의 발현을 분석하였다. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$ vs. PA처리하지 않은 세포.

E. MS-275 약물 단독에 의한 효과 조사.

분화된 C2C12 에서 팔미트산을 유도하였을 때 HDAC3 의 단백질 발현이 증가하였고, 이때 HDAC3 의 억제제인 MS-275 를 처리하면 염증 신호와 염증성 사이토카인이 감소되고 인슐린 저항성이 회복되는 것을 알 수 있었다.

Ferrari et al 보고에 의하면 MS-275 는 미토콘드리아 생성 조절자인 PGC1- α 와 에너지 대사 조절자인 UCP1 을 증가시켜서 지방세포의 산화를 조절한다고 보고하였다 (Ferrari et al., 2020). 또한 PGC1- α 는 골격근 세포에서 미토콘드리아 생성과 활성을 조절할 뿐만 아니라 인슐린에 자극받은 민감한 포도당 수송체(GLUT-4)의 유전자 표현을 증가시켜 당 섭취를 증가한다고 보고되었다 (Kim et al., 2011). 이를 바탕으로 HDAC3 의 억제제인 MS-275 를 단독으로 농도별 처리하였을 때 PGC1- α 와 GLUT-4 의 발현 변화가 있는지 조사하였다. 그 결과, PGC1- α 와 포도당 수송체 GLUT4 의 발현은 각각 10 배 5 배 증가하는 것을 볼 수 있었다 (그림 9). 그러나 MS-275 의 지방독성 완화 효능이 PGC1- α 나 GLUT4 를 매개로 하는지는 좀 더 조사가 필요할 것으로 생각된다.

A.

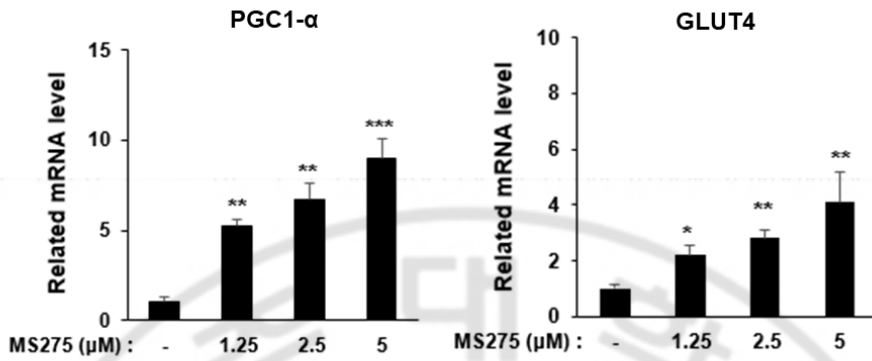


그림 9. C2C12 에서 MS-275 농도별 처리시 PGC1- α 와 GLUT4 의 변화 확인. (A) C2C12 근육세포에 MS-275 를 농도별로 처리하고 24 시간 후에 전사조절인자 PGC1- α 와 포도당 수송체 GLUT4 를 실시간 qPCR 에 의해 확인하였다.

IV. 고찰

비만은 인슐린 저항성과 관계가 있다고 알려져 있다 (Samuel and Shulman, 2016). 골격근은 인슐린의 주요한 타겟이며, 인슐린 저항성 형성에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있다 (Samuel and Shulman, 2016). 특히 골격근에 과도한 지방이 축적되면 미토콘드리아 기능 장애 및 염증이 발생하고 인슐린 저항성이 유도된다(Hoeks and Schrauwen, 2012) (Meex et al., 2019).

히스톤디아세틸라제의 이상은 에너지 대사 조절에 영향을 준다고 보고되어 있다 (Ferrari et al., 2017). Chriett et al., 연구에 의하면 L6 myotubes 에 pan-HDAC 억제제인 Trichostatin A(TSA)와 Sodium butyrate 를 처리해서 인슐린 신호 전달을 개선했다고 보고하였다 (Chriett et al., 2019). 이것을 바탕으로 본 연구에서는 고지방산을 처리시 인슐린 저항성을 유발하는 골격근에서 인슐린 저항성과 염증 신호에 대해 HDAC 억제제인 MS-275 의 효과를 조사하였다.

본 연구에서 사용한 팔미트산은 지방독성을 유발하는 인자로 알려져 있으며 근육세포에 지속적으로 자극을 하면 TNF- α , IL-6 와 같은 염증성 사이토 카인의 발현이 증가하고 이는 인슐린 저항성의 원인이 된다 (Gao et al., 2002). 또한, 염증성 사이토카인인 TNF- α 는 인슐린 저항성의 매개인자로 보고되었는데 TNF- α 는 인슐린 수용체 또는 인슐린 수용체 기질(IRS-1)의 인산화를 저하시키고, 포도당 수송체인 GLUT4 의 발현을 억제하여 포도당 흡수를 감소시킨다고 알려져 있다 (Navarro-Gonzalez and Mora-Fernandez, 2008).

분화된 근육세포인 C2C12 에서 HDAC3 의 억제제인 MS-275 를 처리하여 팔미트산에 의해 유도된 염증을 감소시키는지 조사한 결과 MS-275 가 팔미트산에 의해 증가된 P-JNK, P-NF- κ B 와 같은 염증 신호가 감소시키는 것을 관찰하였고, 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-

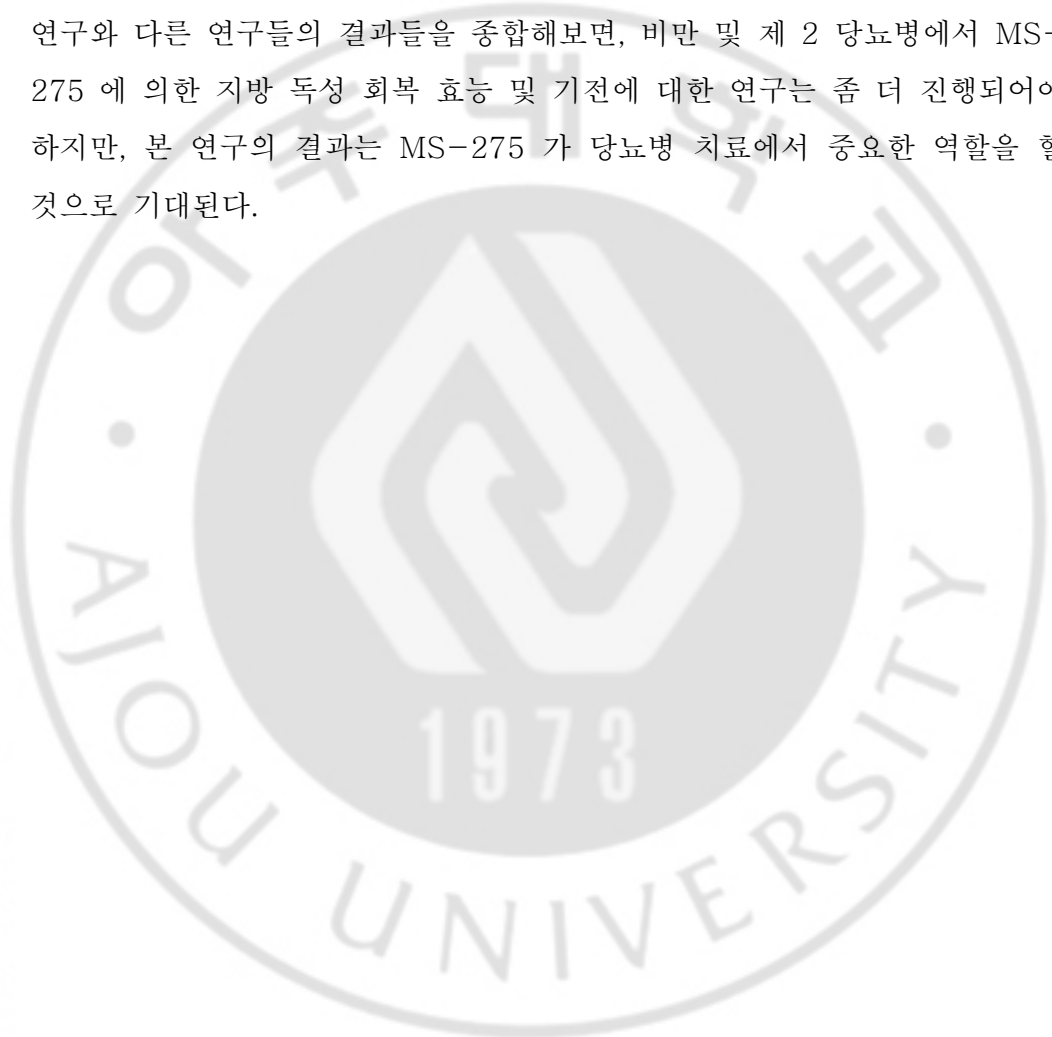
6 와 같은 유전자 발현도 MS-275 처리에 의해 감소시키는 것을 확인하였다. Lee et al., 의 보고에 의하면, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 과 같은 염증성 사이토카인 유전자의 발현이 팔미트산 처리에 의해 증가되었으나 HDAC3 siRNA 처리에 의해 감소되었다. 또한, 팔미트산에 의해 증가한 p-JNK 및 p-NF- κ B 와 같은 염증성 마커도 감소시키는 것으로 나타났다 (Lee et al., 2020). MS-275 를 사용한 HF/HFr-마우스의 생체 내 치료는 비복근에서 인슐린 저항성, 스트레스 신호 및 종양 괴사 인자 TNF- α 발현을 개선시켰다고 보고되었다 (Lee et al., 2020). 이런 연구를 종합해보면, HDAC3 억제제인 MS-275 가 C2C12 근육세포에서 팔미트산을 유도하는 염증을 예방하고 지방독성에 대한 보호효과를 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

MS-275 치료는 골격근과 지방 조직에서 미토콘드리아 활성화 및 산화 대사를 향상시키고 db/db 마우스에서 비만 및 당뇨병을 개선하는 것으로 나타났다 (Galmozzi et al., 2013). Hdac3/Osx1+ 넥아웃 마우스 모델에서도 인슐린 민감도 향상, 골격근에서의 산화 대사 향상, 장의 상피세포에서 고지방식이 비만유도 생쥐를 예방하였다 (Whitt et al., 2018). Hur 역시, HDAC3 억제제는 지방 대사 및 미토콘드리아를 활성화시켜 지방 산화 대사 및 간 지질 대사 조절에 중추적인 역할을 한다고 보고되었다 (Hur, 2015).

본 연구에서도 HDAC3 의 억제제인 MS-275 가 대사를 조절하는지 알아보기 위해서 MS-275 단독으로 농도별 처리한 후, PGC1- α 와 GLUT-4 의 발현 변화가 있는지 조사하였다. 그 결과 전사조절인자 PGC1- α 와 포도당 수송체 GLUT4 의 발현이 모두 증가되는 것을 확인하였다. Lee et al. 의 보고에서도 HDAC3 넥아웃에 의해 같은 효과가 나타나는 것으로 보고하였다. 또한 이 연구에 의하면 MS-275 처리 및 HDAC3 넥다운이 지방 산화 관련 유전자의 발현을 증가시키고, 미토콘드리아 ROS 생산을 감소시키며, 미토콘드리아 기능을 회복시켰다는

것을 보여준다. 따라서, MS-275 및 HDAC3 녹다운은 미토콘드리아 대사 및 생성을 개선하여 지방산 산화를 촉진한다 (Lee et al., 2020).

본 연구에서는 팔미트산 처리된 C2C12 근육세포에서 MS-275 처리가 JNK 및 $\text{NK-}\kappa\text{B}$ 의 억제를 통해 스트레스 신호 및 염증성 사이토카인 발현을 감소시키고, 인슐린 저항성을 개선시키는 것을 확인하였다. 본 연구와 다른 연구들의 결과들을 종합해보면, 비만 및 제 2 당뇨병에서 MS-275 에 의한 지방 독성 회복 효능 및 기전에 대한 연구는 좀 더 진행되어야 하지만, 본 연구의 결과는 MS-275 가 당뇨병 치료에서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.



V. 결론

본 연구는 근육세포에서 팔미트산에 의해 염증반응과 인슐린 저항성이 유발됨을 확인하였고, 이 과정에서 HDAC3 의 발현 증가를 확인하였다. HDAC3 의 억제제인 MS-275 를 근육세포에 처리한 결과, 팔미트산에 의해 유도된 인슐린 저항성 및 염증반응이 완화되는 것을 확인하였다. 즉, HDAC 이 인슐린 저항성과 관련된 다양한 대사질환에 대한 유망한 치료 표적임을 보여주었다.



VI. 참고문헌

1. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA: Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 2010
2. Dubé JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Sauers SE, Goodpaster BH: Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 294: E882-E888, 2008
3. Ferrari A, Fiorino E, Longo R, Barilla S, Mitro N, Cermenati G, Giudici M, Caruso D, Mai A, Guerrini U: Attenuation of diet-induced obesity and induction of white fat browning with a chemical inhibitor of histone deacetylases. *International journal of obesity* 41: 289-298, 2017
4. Ferrari A, Longo R, Peri C, Coppi L, Caruso D, Mai A, Mitro N, De Fabiani E, Crestani M: Inhibition of class I HDACs imprints adipogenesis toward oxidative and brown-like phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865: 158594, 2020
5. Funaki M: Saturated fatty acids and insulin resistance. *The journal of medical investigation* 56: 88-92, 2009
6. Galmozzi A, Mitro N, Ferrari A, Gers E, Gilardi F, Godio C, Cermenati G, Gualerzi A, Donetti E, Rotili D: Inhibition of class I histone deacetylases unveils a mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue. *diabetes* 62: 732-742, 2013
7. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry* 277: 48115-48121, 2002
8. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI: Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274, 1999

9. Houstis N, Rosen ED, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440: 944–948, 2006
10. Kelly DP, Scarpulla RC: Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* 18: 357–368, 2004
11. Kim Y–H, Lee S–H, Kim J–O, Seo T–b, Kim Y–P, Back K–A, Yoon J–H: Effects of Resistance Training on Skeletal Muscle GLUT–4 Protein and LDH Isozyme Expression in Rats. *Journal of Life Science* 21: 1532–1540, 2011
12. Lee IK: Role of PGC–1alpha in Metabolism. *Journal of Korean Endocrine Society* 19: 231–239, 2004
13. Lee SJ, Choi S–E, Lee HB, Song M–W, Kim YH, Jeong JY, Kang Y, Kim HJ, Kim TH, Jeon JY, Lee KW: A Class I Histone Deacetylase Inhibitor Attenuates Insulin Resistance and Inflammation in Palmitate–Treated C2C12 Myotubes and Muscle of HF/HFr Diet Mice. *Frontiers in Pharmacology* 11, 2020
14. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM: Metabolic control through the PGC–1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism* 1: 361–370, 2005
15. Pendergrass M, Bertoldo A, Bonadonna R, Nucci G, Mandarino L, Cobelli C, DeFronzo RA: Muscle glucose transport and phosphorylation in type 2 diabetic, obese nondiabetic, and genetically predisposed individuals. *American Journal of Physiology–Endocrinology and Metabolism* 292: E92–E100, 2007
16. Qiu T, Zhou L, Zhu W, Wang T, Wang J, Shu Y, Liu P: Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid tumors: a review based on 30 clinical trials. *Future oncology* 9: 255–269, 2013
17. Shulman GI: Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 106: 171–176, 2000
18. Suetta C, Frandsen U, Jensen L, Jensen MM, Jespersen JG, Hvid LG, Bayer M, Petersson SJ, Schrøder HD, Andersen JL: Aging affects the transcriptional regulation of human skeletal muscle disuse atrophy. *PLoS one* 7: e51238, 2012

19. Van Greevenbroek M, Schalkwijk C, Stehouwer C: Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med* 71: 174-187, 2013
20. 정수련, 김기진, 고진호: 운동 중 골격근 내 PGC-1 α 농도는 PPAR β/δ 를 통한 후전사 기전에 의하여 조절된다: PPAR β/δ silence 가 ubiquitin 을 통한 PGC-1 α 안정성에 미치는 영향. *운동과학* 24: 289-295, 2015
21. 최철수: 인슐린저항성의 발생기전. *대한내과학회지* 77: 171-177, 2009



- ABSTRACT -

**Protective effects and mechanisms of MS-275
on lipotoxicity in C2C12 myocyte**

Han Byeol Lee

Department of BioMedical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by professor Kwan Woo Lee)

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors, which regulate gene expression by inhibiting the deacetylation of histones and nonhistone proteins, have been shown to exert a wide array of biological effects; these include anti-cancer, anti-obesity, and anti-diabetes effects, as well as cardiovascular-protective activity. However, the effects of class I HDAC inhibition on lipotoxicity in C2C12 myotubes and skeletal muscle tissue remain poorly understood. In this study, we investigated the molecular mechanisms underlying the protective effects of class

I HDAC inhibition under lipotoxic conditions, i.e., in palmitate (PA)-treated C2C12 myotubes. Palmitate treatment of C2C12 muscle cells increased HDAC3 protein expressions, increased inflammatory cytokine expressions, and insulin resistance. In contrast MS-275, a class I HDAC inhibitor, dramatically attenuated lipotoxicity, preventing PA-induced insulin resistance and inflammatory cytokine expressions. In addition, MS-275 increased mRNA expressions of PGC1- α and glucose transporter GLUT4, which act as transcriptional co-activators in the context of mitochondrial metabolism and bioproduction. In vitro, MS-275 improved insulin resistance, stress signal and TNF- α expressions. Taken together, these results suggest HDAC3 inhibition by MS-275 protect against lipotoxicity in C2C12 myotubes and skeletal muscle and may be effective for the treatment of obesity and insulin resistance.

Keyword: C2C12, insulin resistance, MS-275, Inflammation, HDAC3