

Effects of Insulin-Like Growth Factor-I on Expression of Suppressor of Cytokine Signaling-3 in C2C12 Myotube

Hye Jin Kim and Won Jun Lee*

Department of Exercise Science, College of Health Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Received May 31, 2011 / Revised September 22, 2011 / Accepted September 23, 2011

It is well known that both insulin-like growth factor-I and suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) are known to modulate various aspects of physiology in skeletal muscle cells. Furthermore, although SOCS-3 expression is related to insulin resistance in non-skeletal muscle cells and is known to interact with insulin-like growth factor-I receptor, the effect of IGF-I on SOCS-3 gene expression in skeletal muscle cells is presently unknown. C2C12 myotubes were treated with different concentrations (0-200 ng/ml) of IGF-I or for various periods of time (3-72 hr). Immunofluorescent staining image revealed that IGF-I induced SOCS-3 protein expression in a dose-dependent manner. Western blot data also showed that SOCS-3 proteins were induced by IGF-I (200 ng/ml) in C2C12 myotubes in a time-dependent manner. The level of SOCS-3 mRNA was also significantly increased after 3hr of IGF-I (10-100 ng/ml) treatment. However, the levels of SOCS-3 mRNA were significantly decreased after 24 and 48 hr of IGF-I (10-100 ng/ml) treatment compared to the control. In conclusion, SOCS-3 protein is induced by IGF-I treatment in C2C12 skeletal muscle cells and this induction is regulated pretranslationally. The modulating effect of IGF-I on SOCS-3 expression may be an important regulator of gene expression in skeletal muscle cells.

Key words : Insulin-like growth factor-I, suppressor of cytokine signaling-3, C2C12 myotube

서론

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) family는 사이토카인(cytokine)이나 성장인자(growth factor)들의 세포내 신호전달을 조절하는데 있어 부적 반응고리(feedback loop)로 작용하는 유전자로 알려져 있다[1,2]. SOCS family는 8개 (*cis* and SOCS-1-7)로 구성되어 있으며, 이들은 각각의 SH2-domain을 가지고, 이 영역을 통해 SOCS 단백질들이 다양한 신호전달 단백질 또는 세포막에 인접한 수용체(receptor)들의 주요 tyrosine 인산화 영역과 상호작용 하도록 하는 역할을 한다[1,5]. 이러한 SOCS 유전자들은 여러 조직에서 사이토카인[9], 성장인자[30], 그리고 호르몬[8,14,30] 등에 의해 발현이 증가한다.

최근 근육조직 및 근육 세포의 형성과정에 있어 suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) 유전자가 중요한 매개체로서의 역할을 한다는 사실이 증명되었다[7,30]. 근육 세포의 분화 과정에서 SOCS-3 유전자의 mRNA 발현이 증가되었으며, SOCS-3를 과발현 시키자 근육관련 전사인자인 SRF (serum response factor)의 전사활성화가 급격히 증가하였음을 보고하였다[30]. 나아가 성장호르몬에 의한 근육에서의 SOCS-3 유전자의 발현에 관한 연구들도 보고되었는데[14], 사람의 근육 조

직에 성장 호르몬을 주입하자 SOCS-3 mRNA가 유의하게 증가하였으며[24], 쥐의 간, 근육, 지방 조직에서도 성장호르몬에 의해 SOCS-3의 mRNA 발현이 증가하였다는 연구 결과가 보고된 바 있다[34].

한편, SOCS-3 유전자 발현 증가는 다양한 조직에서 인슐린 저항성(insulin resistance)을 증가시키고, 반대로 SOCS-3 발현의 감소는 인슐린 민감성(insulin sensitivity)을 높여주어, SOCS-3가 인슐린 조절 기전에 중요한 역할을 한다고 보고되었다[8,28,29]. Ueki 등[36]에 따르면 간(liver) 세포에서 SOCS-3 유전자의 과발현이 인슐린 저항성을 유도하였으며, SOCS-3가 지방세포(adipocyte) [29]와 COS-7 세포[9]에서도 인슐린 신호전달을 조절하는 능력을 가지고 있다고 보고하였다. 이와 같은 연구 결과들을 바탕으로 골격근에서 SOCS-3와 인슐린의 관계에 대한 연구들이 진행되었다. 한 연구에 따르면 C2C12 근육 세포에 인슐린을 처리하자 SOCS-3의 mRNA가 유의하게 증가하였음을 보고하였다[28]. 골격근은 대표적인 인슐린 민감성 조직으로 알려져 있을 뿐만 아니라 규칙적인 신체활동은 인슐린 저항성을 낮춰주고, 인슐린 민감성을 증진시킨다고 보고되어 있다[16]. 따라서 많은 연구자들은 운동이 SOCS-3의 발현을 억제할 것이라는 가설을 바탕으로 운동과 SOCS-3의 관계를 밝히고자 하였으나, 12주간의 규칙적인 트레드밀 운동은 쥐의 족저근과 가자미근에서 SOCS-3 유전자의 mRNA 발현을 오히려 증가시켰으며[31], 고강도의 저항성 운동 후 사람의 대퇴부 외측광근에서도 SOCS-3 유전자의 mRNA가 오히려 60배 가량 증가하였다는 연구 결과가 보

*Corresponding author

Tel : +82-2-3277-2563, Fax : +82-2-3277-2846

E-mail : jun@ewha.ac.kr

고되었다[35]. Lebrun [22] 등은 SOCS-3 유전자의 발현 증가가 세포 내의 인슐린과 IGF-I 신호전달의 중요 개시자인 insulin receptor substrate (IRS)의 활성화를 억제시킴으로써 인슐린 저항성을 증가시킨다고 보고하였다[22,27,32].

최근 인슐린과 insulin-like growth factor-I (IGF-I)이 구조적 유사성이 높을 뿐만 아니라, 세포 내 신호전달 경로 체계를 상당부분 공유하기 때문에 SOCS-3가 IGF-I의 작용에도 관여할 수 있을 것이라는 가능성이 제기되었다[6]. IGF-I은 근육 세포의 증식 및 분화 과정에 있어 중심적인 역할을 할 뿐만 아니라[10,11], 근육 관련 유전자들의 발현 및 전사 활성화를 증가시키고, 근단백질의 합성을 증가시킨다[10,11,18,23]. 또한 염증 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-1, 6 (IL-1,6) 등으로 인해 활성화되는 ubiquitin 합성 효소들의 발현을 억제함으로써 근위축의 진행을 억제하는 기능을 한다[12]. 이와 같이 IGF-I은 동화작용 촉진 및 이화작용 억제를 통해 골격근의 성장, 발달, 부피 유지에 필수적인 역할을 한다.

이렇듯 SOCS-3 유전자는 근육세포의 분화 및 형성과정이나, 인슐린 신호전달체계에 있어 주요 조절자로서의 역할을 하며, IGF-I은 근비대 기전에 있어 동화작용을 함으로써 근육 관련 유전자 발현에 중심적인 역할을 한다. SOCS-3의 하부 target 인 Signal transducers and activators of transcription-3 (STAT-3)는 IGF-I을 비롯한 다양한 성장인자들과 호르몬의 신호를 통해 활성화되는 전사 조절인자이며[25,33], 근육에서는 IGF-I에 의해 활성이 억제되는 IL-6에 의해 활성화 되는 것으로 보고되어있다[3,13]. 이와 같이 근육 관련 유전자 발현의 조절자로서 SOCS-3와 IGF-I의 관련성과 상호작용에 대한 가능성이 직 간접적으로 제기되고 있지만 분화된 근육 세포에서 IGF-I이 SOCS-3 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 C2C12 myotube에 IGF-I을 다양한 농도와, 시간 별로 처리하여 IGF-I에 의한 SOCS-3 유전자 발현의 변화를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약 처리

본 연구에서 사용한 C2C12 골격근 세포는 American Type of Culture Collection (ATCC, USA)으로부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml의 penicillin G, 그리고 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate (Welgene, KOREA)를 함유하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, KOREA) 으로 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였다. 세포는 35 mm plate에 2.5 \times 10⁵ 개씩 분주하고 90% 이상 자라면, 성장배지를 제거하고 2% horse serum (HS) (Hyclone, Logan, UT)이 함유된 분화 배지로 교체한 뒤 96 시간 동안 분화를 유도하여 myotube를

형성시켰다. IGF-I 처리 농도 및 시간 경과에 따른 SOCS-3 유전자의 단백질 및 mRNA 발현의 변화를 알아보기 위하여 농도(10-100 ng/ml) 및 시간(3, 24, 48, 72 시간)에 따라 IGF-I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)을 처리하였다.

Immunofluorescent staining

C2C12 세포를 PBS로 한번 씻어낸 뒤, plate에 고정시키기 위하여 1 ml의 4% formaldehyde를 상온에서 20 분간 처리한 뒤 TBS로 2번 씻어내고, 0.2% triton X-100을 함유한 TBS (0.2% TBST)로 5 분간 상온에서 permeabilizing하였다. 그 다음 0.1% TBST로 5 분간 3번 씻어낸 후 5% BSA를 함유한 0.1% TBST로 상온에서 1 시간 동안 blocking 하였다. 이후 TBS로 한번 씻어낸 뒤 3% BSA를 함유한 TBS에 SOCS-3 polyclonal rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 1:500으로 희석하여 4°C에서 12 시간 동안 반응시켰다. 그 후, 0.1% TBST로 5 분간 3번 씻어낸 뒤 alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)를 3% BSA에 1:250으로 희석하여 상온에서 20 분간 반응시킨 후 0.1% TBST로 5 분간 3번 씻어내었다. 사진은 digital imaging system이 갖춰진 Axiovert 200 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 촬영하였다.

Western blot

단백질을 추출하기 위하여 cell lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and complete protease inhibitor cocktail)를 처리하여 세포를 얻어낸 후 4°C에서 13,000 rpm으로 15 분간 원심분리 하였다. 분리된 단백질을 얻어낸 뒤 Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 정량 된 60 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 150 V로 1 시간 동안 전기영동 한 뒤, PVDF membrane으로 옮겨주었다(12 V, 1 시간). 그 후, Ponceau S로 모든 lane의 동량의 단백질을 확인한 후 각각의 membrane을 5% skim milk로 1 시간 blocking 한 뒤 0.1% TBST로 5 분씩 3번 씻어내었다. 다음으로 SOCS-3 (polyclonal rabbit antibody, 1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 그리고 α -tubulin (monoclonal mouse antibody, 1:2,500) (Calbiochem, Gibbstown, NJ) 1차 항체를 5% bovine serum albumin(BSA)에 희석하여 4°C에서 12 시간 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 뒤, 0.1% TBST로 5 분씩 3번 씻어낸 뒤 2차 항체 (anti-rabbit or mouse IgG horse-radish peroxidase-linked secondary antibody, 1:5,000) (Cell signaling, Beverley, MA)를 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 위와 동일한 방법으로 씻어낸 뒤, enhanced chemiluminescent (ECL) (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) 용액을

1:1 비율로 섞어 1 분 동안 반응 시켜 LAS-3000 imaging system (Fuji Film, Tokyo, Japan)으로 단백질 발현양을 확인하였다. SOCS-3 단백질 발현양은 α -tubulin의 단백질 양으로 보정하여 densitometry (Scion image)로 수치화 하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA추출은 TRIzol 용액(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 이용한 phenol-chloroform 기법을 사용하였다. TRIzol 용액을 well당 각각 1 ml 씩 넣고, 200 μ l의 chloroform을 처리하여 섞어준 뒤 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리를 하였다. 상층액을 분리하여 isopropanol과 1:1 비율로 섞어준 뒤, 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 생성된 pellet을 DEPC로 희석한 75% ETOH에 씻어내고, 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 최종 추출된 pellet을 상온에서 10분간 건조시킨 뒤 ultra pure water 30 μ l에 녹인 후, UV 흡광도 260 nm에서 농도를 측정하였다. 1 μ g/ μ l의 RNA를 5 \times buffer 4 μ l, random primer 2 μ l, 2.5 mM dNTP 2 μ l, Rnase inhibitor 0.5 μ l, 그리고 reverse transcriptase 0.25 μ l (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)와 혼합하여 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 그리고 95°C에서 5분간 PCR을 이용해 cDNA를 합성하였다.

Real-time quantitative PCR

SOCS-3의 mRNA 발현을 측정하기 위하여 double-stranded DNA dye인 SYBR Green PCR master mix (Finnzyme, Espoo, Finland)를 이용하여 real-time PCR (ABI PRISM 7700 system) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)을 실시하였다. 사용한 primer sequence는 Table 1에 제시하였으며, 모든 Primer는 코스모사(Cosmo Genetech, Korea)에서 제작 및 구입하여 사용하였다. 모든 샘플은 3회 반복 실험하여 합성시킨 cDNA를 2회 이상 반복 측정하였다. 95°C 15 초, 60°C 30 초간 40 cycle을 측정하여 CT 값을 얻어내고, 용해 곡선 확인을 위해 40 cycle 이후 dissociation stage를 추가하여 95°C 15 초, 60°C 1 분의 조건을 2번 반복하여 현광 신호의 크기를 측정하였다. 반응이 완료된 후 증폭곡선의 S 커브가 급격히 올라가는 지점과 CT 값의 추출 지점이 일치하였음을 확인하고, 용해 곡선 그래프의 단일 증폭 곡선을 확인한 뒤 최종적으로 CT 값을 데이터 처리 하였다. 결과는 단순 CT 값 비교 분석 방법을 사용하였으며, mRNA 발현양은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 CT값으

로 상대 정량하여 보정하였다.

자료처리

IGF-I 처리에 따른 C2C12 세포에서의 SOCS-3 유전자의 단백질 발현과 mRNA 발현의 유의성 검증을 위하여 SPSS 12.0 for window를 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 농도 및 시간 별로 유의한 차이가 있는지를 검증하기 위하여 Tukey's 사후검정을 실시하였다($p < 0.05$).

결 과

C2C12 myotube에서 IGF-I이 SOCS-3 유전자의 단백질 발현에 미치는 영향을 형태적으로 살펴보기 위하여 10, 50, 100 ng/ml의 IGF-I을 각각 24 시간 동안 처리하여 immunofluorescent staining을 통한 형광현미경 관찰을 실시하였다. 그 결과 Fig. 1에 제시된 바와 같이 IGF-I을 처리하지 않은 myotube (Fig. 1A)와 비교하였을 때, 24 시간 동안 다양한 농도 별로 IGF-I을 처리한 Fig. 1B (10 ng/ml), 1C (50 ng/ml), 1D (100 ng/ml) myotube에서는 IGF-I 농도 의존적으로 SOCS-3 단백질 발현이 현저하게 증가되었음을 관찰 할 수 있었다.

IGF-I이 SOCS-3 유전자의 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96 시간 동안 분화시킨 C2C12 myotube에 200 ng/ml의 IGF-I을 각각 24, 48, 72 시간 동안 처리하여 Western blot 분석을 실시하였다. 그 결과 Fig. 2A에 제시된 바와 같이 IGF-I을 24 시간 동안 처리하자 통제군에 비해 SOCS-3 단백질 발현이 약 66% 유의하게 증가하였으며, Fig. 2B에 나타난 바와 같이 48 시간 동안 IGF-I을 처리하자 통제군과 비교하였을 때 SOCS-3의 단백질 발현이 약 82% 유의하게 증가하였다. 또한 IGF-I을 72 시간 동안 처리하자 SOCS-3 단백질 발현이 통제군과 비교하였을 때 약 127% 유의하게 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 2C).

IGF-I이 SOCS-3 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 C2C12 myotube에 10, 50, 100 ng/ml의 IGF-I을 시간 별로 처리하여 real-time PCR 분석을 실시하였다(Fig. 3). 그 결과 IGF-I을 3 시간 동안 처리하자 가장 낮은 농도인 10 ng/ml에서 약 120%, 50 ng/ml에서 162% 정도로 SOCS-3 mRNA 발현이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 그러나 가장 높은 농도인 100 ng/ml에서는 약 74% 정도로 발현이 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았으며, 상대적으로 낮은 농도인 10, 50 ng/ml에서의 결과와 비교하였을 때 SOCS-3 mRNA 발현의 증가 정도가 보다 적었음을 알 수 있었

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primers	Reverse primers
SOCS-3	GGACCAGCGCCACTTCTTCAC	TACTGATCCAGGAACTCCCGA
GAPDH	ATGACAATGAATACGGCTACAGCAA	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT

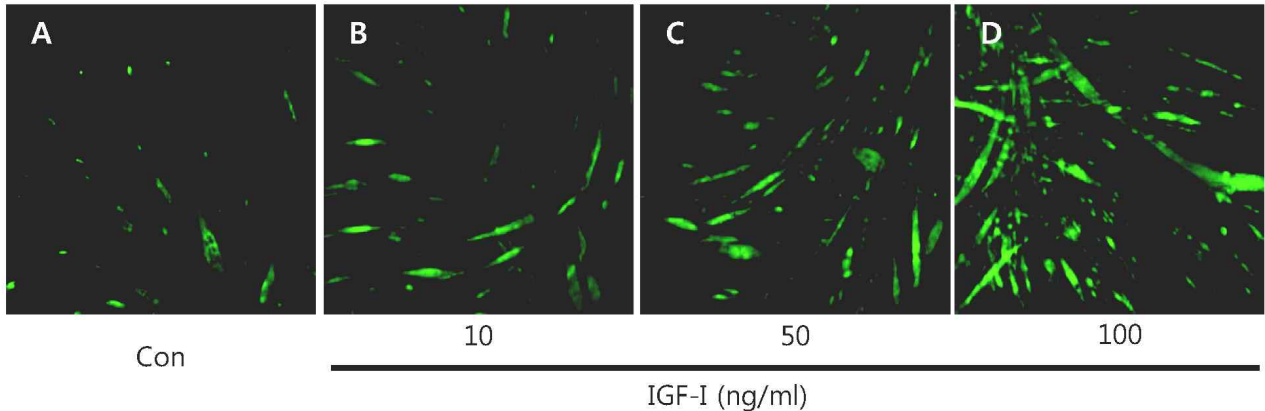


Fig. 1. Immunofluorescent staining images showing IGF-I-induced SOCS-3 protein expression in C2C12 myotubes. All images were acquired at 24 hr after treatment. (A) C2C12 myotubes in IGF-I free medium. (B) C2C12 myotubes in medium containing 10 ng/ml of IGF-I. (C) C2C12 myotubes in medium containing 50 ng/ml of IGF-I. (D) C2C12 myotubes in medium containing 100 ng/ml of IGF-I. SOCS-3 is stained fluorescent green.

다(Fig. 3A). 반면에 Fig. 3B에 제시된 바와 같이 50, 100 ng/ml의 IGF-I을 24 시간 동안 처리하자 C2C12 myotube에서의 SOCS-3 mRNA 발현은 50 ng/ml에서 29%, 100 ng/ml에서 44% 유의하게 감소하였다. 더 나아가 IGF-I을 48 시간 동안 처리하자 SOCS-3 mRNA 발현이 각각 10 ng/ml에서 39%, 50 ng/ml에서 47%, 100 ng/ml에서 52% 정도로 현저히 감소하였음을 확인 할 수 있었다(Fig. 3C). 종합하여 보면 IGF-I 처리에 따른 시간별 SOCS-3 mRNA 발현의 변화 양상은 3 시간에서 농도 의존적으로 증가하였고, 24, 48 시간 동안 IGF-I을 처리한 그룹에서는 SOCS-3 mRNA 발현이 감소하였음을 알 수 있었다.

고 찰

근육에서의 SOCS-3 유전자에 관한 연구들을 살펴보면, 쥐의 근육 세포의 분화과정에서 SOCS-3 mRNA가 증가하였으며 SOCS-3를 과발현 시키자 근육관련 전사인자인 SRF의 전사활성화가 급격히 증가하여 skeletal α -actin, myogenin 등과 같은 근육 관련 유전자의 mRNA 발현을 증가시켰다고 보고하였다[30]. 또한 지구성 운동 및 고강도 저항성 트레이닝은 근육 조직에서의 SOCS-3 발현을 유의하게 증가시켰다고 보고되었다[31,35]. 그러나, SOCS-3 유전자의 발현은 인슐린 저항성을 유의하게 높인다고 알려져 있다[8,9,29]. 관련 연구들에 따르면, 인슐린 저항성을 보이는 비만이 유도된 쥐의 뒷다리 근육에서 SOCS-3 단백질 발현이 유의하게 증가하였으며[41], 쥐의 간 세포에 SOCS-3 유전자를 과발현 시키자 인슐린 저항성이 유도 되었음을 보고하였다[9,36]. 반대로 당뇨병이 유발된 쥐에서 SOCS-3 발현을 억제시키자 인슐린 저항성이 부분적으로 개선되었음을 보고하였다[37].

운동은 인슐린 저항성을 낮춰주는 동시에 인슐린 민감성을

개선시켜 효과적인 글루코스 연소 작용을 이끌어냄으로써 정상적인 대사활동이 이루어지도록 한다[15]. 따라서 당뇨병 환자에게 있어 규칙적인 운동은 필수적인 치료 요법으로 알려져 있다. 특히, 비만 상태로 유도된 동물 모델에 있어 운동이 인슐린 저항성을 효과적이게 낮추어 주었다고 보고하였다[20,21]. 이렇듯 운동과 비만, 운동과 인슐린 저항성 감소의 관계는 지금까지 매우 잘 연구 되어진 주제이다. 그러나 이와 같은 선행 연구들을 종합해보면 운동은 인슐린 저항성을 낮춰주지만, 운동은 인슐린 저항성을 유도하는 SOCS-3 유전자 발현을 증가시킨다는 역설적인 결론이 도출된다. 선행 연구들에서는 이러한 현상을 다음과 같이 설명하였다. 운동으로 증가하는 염증성 사이토카인이자 골격근에서 직간접적으로 이화작용을 하는 IL-6의 증가는 성장호르몬, IGF-I, 인슐린 작용에 의존하는 것으로 알려진 Janus kinase (JAK)/STAT 신호전달 경로의 부적 조절자(negative regulator)인 SOCS-3 발현을 증가시키고, SOCS-3 유전자 발현의 증가는 STAT-3에 의존적인 성장인자들의 민감성을 억제시키기 때문에 이것이 인슐린 저항성으로 연결될 것이라고 설명하였다[1,4,13,29,31]. 그러나 IL-6와 인슐린 저항성에 관련된 다른 연구들에 의하면, IL-6가 골격근에서 인슐린 민감성을 높여줄 수 있으며[39], 쥐에서 IL-6 유전자를 knock out하여 9개월간 사육하자 제 2형 당뇨병이 유발되었음을 보고하였다[38]. 나아가 위와 같은 선행 연구의 결과들과 상반되게 Rieussert [26] 등은 비만이지만 당뇨병이 없는 사람들에게서 골격근에서의 SOCS-3 유전자의 발현과 인슐린 저항성은 유의한 상관 없이 있다고 보고하였다. 이러한 결과들에 미루어봤을 때, 인슐린 저항성에 있어 SOCS-3와 IL-6와의 상관 관계에 대한 연구는 보다 상세한 추가 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서의 결과를 살펴보면 앞선 관련 연구들과 비슷한 경향을 관찰 할 수 있었다. 운동으로 인해 체내 분비가 증가하

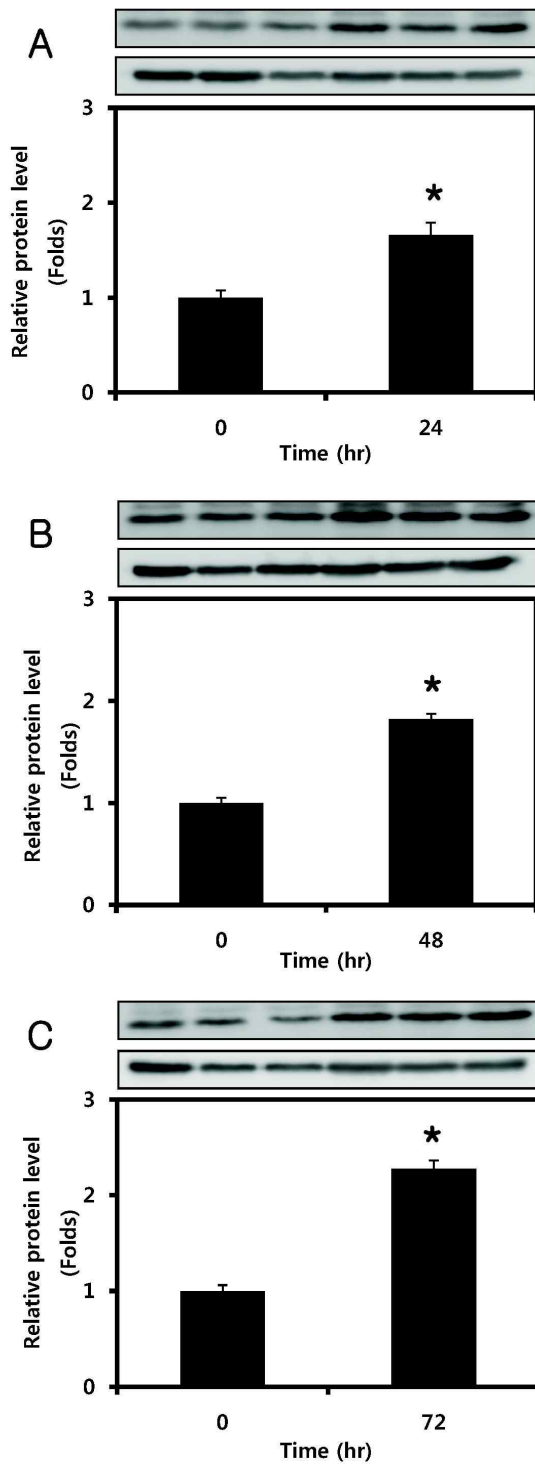


Fig. 2. Effect of different lengths of time on SOCS-3 protein expression in C2C12 myotubes. (A) C2C12 myotubes were treated with 200 ng/ml of IGF-I for 24 hr. (B) C2C12 myotubes were treated with 200 ng/ml of IGF-I for 48 hr. (C) C2C12 myotubes were treated with 200 ng/ml of IGF-I for 72 h. Values are means \pm SE with n=3 for each condition. * $p < 0.05$ vs. control.

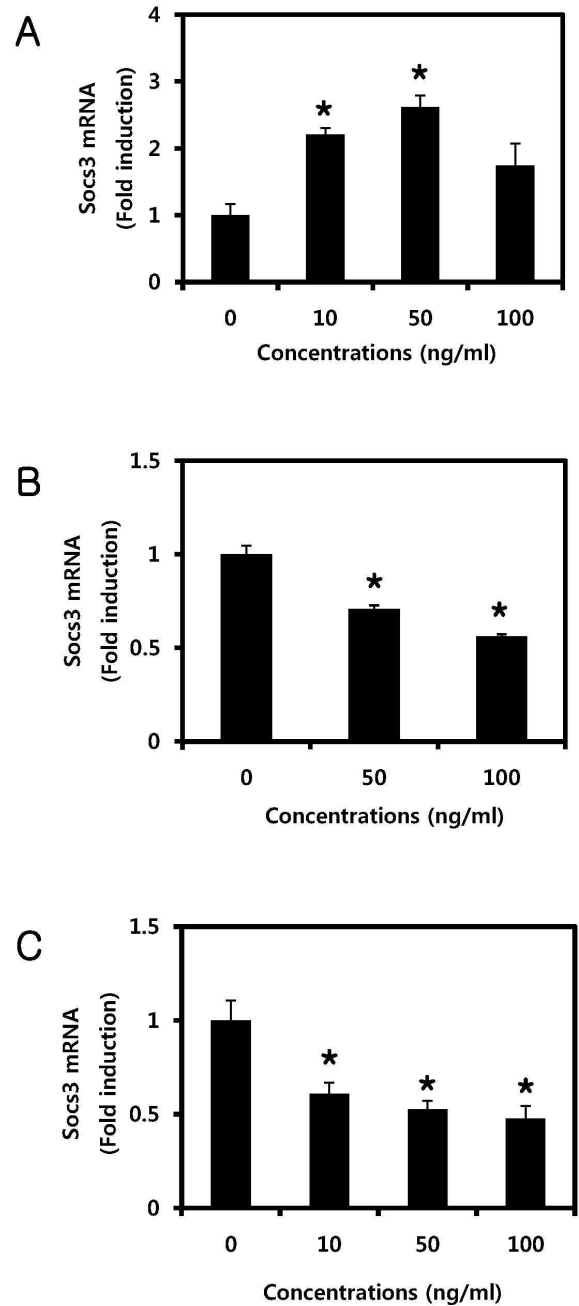


Fig. 3. Real-time PCR analysis of SOCS-3 mRNA after treatment with IGF-I (A). C2C12 myotubes were treated with 0, 10, 50, or 100 ng/ml of IGF-I for 3 hr. (B) C2C12 myotubes were treated with 0, 50, or 100 ng/ml of IGF-I for 24 hr. (C) C2C12 myotubes were treated with 0, 10, 50, or 100 ng/ml of IGF-I for 48 hr. Data are normalized to control, and values are means \pm SE with n=3 for each condition. * $p < 0.05$ vs. control.

는 IGF-I을 생리적 농도(physiological concentration)로 간주되는 ~200 ng/ml의 범위 내의 농도인 10-100 ng/ml를[17] myotube에 처리하였을 때, 50 ng/ml에서 SOCS-3의 mRNA

발현을 3 시간에서 최고 162% 가량 증가시켰으며 시간이 지남에 따라 발현이 감소되었다. 또한 IGF-I은 SOCS-3의 단백질 발현을 시간 의존적으로 유의하게 증가시켰음을 알 수 있었다. 이러한 결과들과 선행 연구들을 종합하여, IGF-I과 관련된 신호전달 경로 중 하나인 JAK/STAT 경로와 SOCS-3의 관계를 살펴 볼 필요가 있다. SOCS-3가 부적반응 작용을 하는 것으로 알려진 STAT-3는 IL-6, IL-10 등의 사이토카인 뿐만 아니라 IGF-I, hepatocyte growth factor, epidermal growth factor, PDGF, basic fibroblast growth factor, RhoA 등과 같은 다양한 성장인자들 및 호르몬의 신호를 통해서도 활성화되는 전사조절인자이다[19,25,33,40]. STAT-3를 활성화 시키는 IL-6는 성장호르몬 및 IGF-I의 신호전달 경로에 간섭할 수 있다는 가능성이 제기되었으며[3], 최근 보고에 따르면 IL-6를 주입한 쥐의 근육조직에서 SOCS-3 유전자의 mRNA와 IGF-I의 mRNA가 유의하게 증가하였으며, STAT-3의 인산화가 유의하게 증가하였다고 보고하였으나[13], 아직까지 자세한 기전은 밝혀지지 않았다.

기존의 연구에서 근육 세포의 증식과 분화과정 및 운동에 따른 SOCS-3 발현을 연구한 반면에 본 연구에서는 분화가 완전히 진행된 myotube에 운동으로 인해 분비가 증가하는 IGF-I을 처리함으로써, 성숙된 근육 세포에서의 IGF-I에 의한 SOCS-3 유전자 발현의 변화를 관찰 할 수 있었다. 따라서 분화가 진행되고 있는 경우에 비해 상대적으로 빠른 시간인 처리 후 3 시간에서 mRNA 발현이 증가되고, 24 시간 이후로 mRNA 수준이 감소하는 경향을 관찰하였는데, 이는 번역(translation) 전 단계에서 단백질 발현이 증가한 것이라고 사료된다. 또한 immunostaining을 통해 제시된 그림에서 볼 수 있듯이, 24 시간 동안 IGF-I 처리 농도가 증가할수록 SOCS-3 단백질이 염색된 myotube가 더 많이 관찰되었고, 24, 48, 72 시간이 지날수록 단백질 발현이 증가함을 관찰함으로써 IGF-I이 SOCS-3 발현에 유의한 영향을 미친다는 것을 다시 한번 검증할 수 있었다. 이와 같이 본 연구에서는 myotube에서 IGF-I이 SOCS-3 유전자 발현에 유의한 영향을 미친다는 사실을 처음으로 밝혀내었다. SOCS-3와 IGF-I이 근육 세포 내에서 서로 다른 복잡한 경로로 근육 형성과정이나 골격근 관련 유전자를 발현에 관여한다고 알려져 있지만, 근육에서 이 두 가지 요소들의 관계에 관한 연구는 전무한 실정이었다. 더욱이 근육 형성과정과 분화가 완료된 myotube에서의 유전자 조절 기전이 매우 상이함에도 불구하고, myotube에서의 SOCS-3 유전자 발현에 관련한 연구는 이루어지지 않았다.

본 연구의 결과는 운동이 근육에서 SOCS-3 유전자 발현을 증가시켰음을 보고한 선행연구 결과들과 관련하여, 운동에 의해 증가되는 IGF-I이 SOCS-3 유전자 발현에 중추적인 역할을 하는 것으로 사료된다. 비록 운동이 근육에서의 SOCS-3 유전자 발현을 증가시키는데 있어 다양한 조절기전이 있을 것이라 예상되지만, IGF-I은 운동에 의해 증가하여 근육 세포 내에서

매우 중요한 역할을 하는 조절자로 잘 알려져 있기 때문에 본 연구 결과가 앞으로 근육 관련 연구에 있어 운동과 SOCS-3, SOCS-3와 IGF-I, IGF-I과 SOCS-3 유전자 및 인슐린 대사에 있어 명확히 밝혀지지 않은 기전을 증명해 나아가는데 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이라 생각된다. 그러나 본 연구에서는 IGF-I의 하부 신호전달 경로와 SOCS-3 간의 관계, 그리고 선행 연구들에서 제기된 IL-6와의 관계에 대한 연구는 수행하지 못하였다. 따라서 IGF-I이 근육 관련 유전자의 발현을 증가시키는데 있어 SOCS-3의 역할을 보다 명확히 설명하기 위해서는, SOCS-3 유전자와 IGF-I 고유의 신호전달 경로로 밝혀져 있는 phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen activated protein kinase (MAPK) 신호전달 경로와의 관계 및 JAK/STAT 경로와 관련한 연구가 반드시 이루어져야 할 것이라 생각된다. 또한 운동으로 인한 SOCS-3 유전자 발현 증가와 SOCS-3 발현 증가에 따른 인슐린 저항성의 증가에 대한 기전적 연구가 더 필요할 것이라 사료된다. 그리고 나서 운동과 인슐린, 운동과 사이토카인, 그리고 SOCS-3 유전자 발현간의 역할적 관계에 대한 기전을 명확히 밝혀나가야 할 것이며, 나아가 골격근 관련 유전자의 발현 및 전사 활성화에 관한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이라 생각된다.

References

- Alexander, W. S. and D. J. Hilton. 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 503-529.
- Auernhammer, C. J., C. Bousquet, A. Chensnokova, and S. Meled. 2000. SOCS proteins: modulators of neuro-immunoendocrine functions. Impact on corticotroph LIF signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 658-664.
- Benedetti, F., T. Alonzi, A. Moretta, D. Lazzaro, P. Costa, V. Poli, A. Martini, G. Ciliberto, and E. Fattori. 1997. Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J. Clin. Invest.* **99**, 643-650.
- Bodell, P. W., E. Kodesh, F. Haddad, F. P. Zaldivar, D. M. Cooper, and G. R. Adams. 2009. Skeletal muscle growth in young rats is inhibited by chronic exposure to IL-6 but preserved by concurrent voluntary endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* **106**, 443-453.
- Cacalano, N. A., D. Sanden, and J. A. Johnston. 2001. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat. Cell Biol.* **3**, 460-465.
- Dey, B. R., R. W. Furlanetto, and P. Nissley. 2000. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 protein interacts with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 38-43.
- Diao, Y., X. Whang, and Z. Wu. 2009. SOCS1, SOCS3, and PIAS1 promote myogenic differentiation by inhibiting the

- leukemia inhibitory factor-induced JAK1/STAT1/STAT3 pathway. *Mol. Cell Biol.* **29**, 5084-5093.
8. Emanuelli, B., P. Peraldi, C. Filloux, D. Sawaka-Verhelle, D. J. Hilton, and E. Van Obberghen. 2000. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 15985-15991.
 9. Emanuelli, B., P. Peraldi, C. Filloux, C. Chavey, K. Freidinger, D. J. Hilton, G. S. Hotamisligil, and E. Van Obberghen. 2001. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 47944-47949.
 10. Florini, J. R., D. Z. Ewton, and S. A. Coolican. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* **16**, 481-517.
 11. Galvin, C. D., O. Hardiman, and C. M. Nolan. 2003. IGF-I receptor mediates differentiation of primary cultures of mouse skeletal myoblasts. *Mol. Cell Endocrinol.* **200**, 19-29.
 12. Glass, D. J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem Cell Biol.* **37**, 1974-1984.
 13. Haddad, F., F. Zaldivar, D. M. Cooper, and G. R. Adams. 2005. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* **98**, 911-917.
 14. Hansen, J. A., K. Lindberg, D. J. Hilton, J. H. Nielsen, and N. Billestrup. 1999. Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1832-1843.
 15. Hawley, J. A. and S. J. Lessard. 2008. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiologica* **192**, 127-135.
 16. Holloszy, J. O. 2005. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J. Appl. Physiol.* **99**, 338-343.
 17. Jandziszak, K., C. Suarez, E. Wasserman, R. Clark, B. Baker, F. Liu, R. Hintz, P. Saenger, and L. P. Brion. 1998. Disturbances of growth hormone-insulin-like growth factor axis and response to growth hormone in acidosis. *Am J. Physiol.* **275**, R120-R128.
 18. Jennische, E. and H. A. Hansson. 1987. Regenerating skeletal muscle cells express insulin-like growth factor I. *Acta Physiol. Scand* **130**, 327-332.
 19. Kakisis, J. D., C. D. Liapis, and B. E. Sumpio. 2004. Effects of cyclic strain on vascular cells. *Endothelium* **11**, 17-28.
 20. Kim, C. H., J. H. Youn, J. Y. Park, S. K. Hong, K. S. Park, S. W. Park, K. I. Suh, and K. U. Lee. 2000. Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J. Physiol.* **278**, E977-E984.
 21. Kraegen, E. W., D. E. James, A. B. Jenkins, D. J. Chisholm, and L. H. Storlien. 1989. A potent in vivo effect of ciglitazone on muscle insulin resistance induced by high fat feeding of rats. *Metabolism* **38**, 1089-1093.
 22. Lebrun, P. and E. Van Obberghen. 2008. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiologica* **192**, 29-36.
 23. McLellan, A. S., T. Kealey, and K. Langlands. 2006. An E box in the exon 1 promoter regulates insulin-like growth factor-I expression in differentiating muscle cells. *Am J. Physiol.* **291**, C300-C307.
 24. Nielsen, C., L. C. Gormsen, N. Jessen, S. B. Pedersen, N. Møller, S. Lund, and J. O. Jørgensen. 2008. Growth hormone signaling *in vivo* in human muscle and adipose tissue: impact of insulin, substrate background, and growth hormone receptor blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 2842-2850.
 25. Park, P. and P. Cohen. 2005. Insulin-like growth factor I (IGF-I) measurements in growth hormone (GH) therapy of idiopathic short stature (ISS). *Growth Horm. IGF Res.* **15**, S13-S20.
 26. Rieusset, J., K. Bouzakri, E. Chevillotte, N. Ricard, D. Jacquet, J. P. Bastard, M. Laville, and H. Vidal. 2004. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* **53**, 2232-2241.
 27. Rui, L., M. Yuan, D. Frantz, S. Shoelson, and M. F. White. 2002. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* **277**, 42394-42399.
 28. Sadowski, C. L., T. S. Choi, M. Le, T. T. Wheeler, L. H. Wang, and H. B. Sadowski. 2001. Insulin Induction of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA expression in C2C12 Skeletal Muscle Cells Is Mediated by Stat5*. *J. Biol. Chem.* **276**, 20703-20710.
 29. Shi, H., I. Tzamelis, C. Bjorbaek, and J. S. Flier. 2004. Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 34733-34740.
 30. Spangenburg, E. E. 2005. SOCS-3 induces myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **280**, 10749-10758.
 31. Spangenburg, E. E. 2006. Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *J. Physiol.* **572**, 839-848.
 32. Steppan, C. M., J. Wang, E. L. Whiteman, M. J. Birnbaum, and M. A. Lazer. 2005. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol. Cell Biol.* **25**, 1569-1575.
 33. Takeda, K. and S. Akira. 2000. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 199-207.
 34. Tollet-Egnell, P., A. Flores-Morales, A. Stavréus-Evers, L. Sahlin, and G. Norstedt. 1999. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* **140**, 3693-3704.
 35. Trenerry, M. K., K. A. Carey, A. C. Ward, and D. Cameron-Smith. 2007. STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise. *J. Appl. Physiol.* **102**, 1483-1489.
 36. Ueki, K., T. Kondo, and C. R. Kahn. 2004. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **24**, 5434-5446.
 37. Ueki, K., T. Kondo, Y. H. Tseng, and C. R. Kahn. 2004. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**,

- 10422-10427.
38. Wallenius, V., K. Wallenius, B. Ahrén, M. Rudling, H. Carlsten, S. L. Dickson, C. Ohlsson, and J. O. Jansson. 2002. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* **8**, 75-79.
39. Weigert, C., A. M. Hennige, K. Brodbeck, H. U. Häring, and E. D. Schleicher. 2005. Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J. Physiol.* **289**, E251-257.
40. Yadav, A., A. Kalita, S. Dhillon, and K. Banerjee. 2005. JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. *J. Biol. Chem.* **280**, 31830-31840.
41. Yaspekis, B. B. III., I. A. Kvasha, and T. Y. Figueroa. 2009. High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKKalpha/beta phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. *Am J. Physiol.* **296**, R1709-R1715.

초록 : C2C12 myotube에서 insulin-like growth factor-I이 SOCS-3 유전자 발현에 미치는 영향

김혜진 · 이원준*

(이화여자대학교 건강과학대학 체육과학과)

SOCS-3와 IGF-I은 근육의 분화 과정 및 근비대 기전에 있어 매우 중요한 조절자 역할을 하는 유전자 및 성장인자이며, 최근 골격근에서 IGF-I과 SOCS-3 유전자의 상호작용에 관한 연구의 필요성이 제기되고 있다. 본 연구에서는 C2C12 myotube에서 IGF-I이 SOCS-3 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 4일간 분화시킨 C2C12 myotube에 IGF-I을 다양한 농도(0-200 ng/ml) 및 시간(3-72 시간)에 따라 처리하였다. 그 결과 IGF-I이 SOCS-3 유전자의 단백질 발현을 시간 의존적으로 유의하게 증가시켰으며, 3 시간에서 mRNA 발현을 증가시키고, 시간이 지남에 따라 긴 시간에서는 농도 의존적으로 발현이 감소하였음을 알 수 있었다. 또한 면역형광 염색을 통해 IGF-I이 myotube에서 SOCS-3의 단백질을 발현 시켰음을 뚜렷하게 관찰 할 수 있었다. 위 결과들을 바탕으로 본 연구에서는 IGF-I의 처리가 분화된 근육 세포인 C2C12 myotube에서 SOCS-3 유전자 발현에 유의한 영향을 미쳤음을 증명하였다. 이러한 결과는 선행연구에서 보고한 운동이 SOCS-3 유전자 발현을 증가시킴에 있어서 IGF-I이 중추적인 역할을 한 것으로 생각된다. 그러나 IGF-I에 의한 SOCS-3 유전자 발현 조절 기전에 있어 관련 신호 전달 체계 및 골격근 관련 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 보다 더 이루어져야 할 것이라 사료된다.