creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

이학석사학위 논문

# Gnrh1 유전자 결핍 마우스의 근육재생 능력 및 남성호르몬 이식에 의한 근육줄기세포의 재형성에 대한 연구

The studies of muscle regeneration capacity in Gnrh1 deficient mice and muscle stem cell re-establishment by androgen hormones implantation

2016년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

한 기 찬

# Gnrh1 유전자 결핍 마우스의 근육재생능력 및 남성호르몬 이식에 의한 근육줄기세포의 재형성에 대한 연구

The studies of muscle regeneration capacity in Gnrh1 deficient mice and muscle stem cell re-establishment by androgen hormones implantation

지도교수 공 영 윤

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2016년 6월


서울대학교 대학원

생명과학부

한 기 찬


한기찬의 석사학위논문을 인준함

2016년 6월

위 원 장 이 건 수 (인)

부위원장 공 영 윤 (인)

위 원 백 성 희 (인)

# The studies of muscle regeneration capacity in Gnrh1 deficient mice and muscle stem cell re-establishment by androgen hormones implantation

Advisor: Young-Yun Kong

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of

**Master of Science**

School of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

By

Gi-Chan Han

June 2016

Approved by thesis Committee

Young-Yun Kong

Sunghun Baek

# I. 국문초록 (Abstract in Korean)

## Gnrh1 유전자 결핍 마우스의 근육재생능력 및 남성호르몬 이식에 의한 근육줄기세포의 재형성에 대한 연구

한 기 찬

생명과학부

서울대학교 대학원 자연과학대학

Gnrh1 유전자 결핍 마우스는 생식샘 자극 호르몬(Gonadotropin-releasing hormone 1, Gnrh1) 유전자의 자연적인 돌연변이로 인해 난포 자극 호르몬(FSH)과 황제 형성 호르몬(LH)의 발현이 사춘기 이후부터 항상 감소되어 있는 모델이다. 그 결과 Gnrh1 유전자 결핍 마우스는 2차 성징을 유도하는 남성 및 여성 호르몬의 혈중 농도도 현저히 저하되어 생식이 불가능하다. 지금까지 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델에 대한 연구는 생식, 신경 및 행동 관련 실험에 대해서만 한정되어 있었다. 따라서 이 모델을 이용한 근육

표현형에 대한 연구는 현재까지 보고된 바가 없다. 그리고 성체 근육줄기세포의 유지, 증식, 자기 재생 및 분화에 대한 연구는 지금까지 많은 논문들에 의해서 연구되었지만 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델을 이용한 성호르몬과 성체 근육줄기세포의 형성 및 재형성에 대한 인과관계에 대한 연구는 이 논문을 통하여 처음으로 밝히게 되었다. 본 논문에서는 성별에 무관하게 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스의 성체 근육줄기세포의 수는 정상 마우스에 비해 확연히 감소됨을 관찰하였고 이 마우스 모델에 인위적 근육손상을 준 후 재생되는 근육 단면적 측정을 통해 근육재생 정도가 정상개체에 비해 지연됨을 확인하였다. 마지막으로 외부에서 생체 튜브를 이용한 두 종류의 남성호르몬(Testosterone 및 5α-dihydrotestosterone)을 피하 이식하였을 때 30일 뒤 Gnrh1 유전자 결핍 마우스의 성체 근육줄기세포의 수가 정상 마우스의 성체 근육줄기세포 수와 동등한 수준으로 회복한다는 사실을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 본 연구는 성호르몬이 성체 근육줄기세포의 형성에 필수적이며 적은 수의 성체 근육줄기세포는 반복적인 근육 손상 이후 근육재생은 가능하나 근육재생속도가 지연된다는 사실과 외부의 남성호르몬 이식으로 Gnrh1 유전자 결핍 수컷 마우스의 성체 근육줄기세포 수를 정상 범주로 증가시킬 수 있는 생체 내 중요한 역할을 수행하고 있음을 증명하였다.

핵심어: Gnrh1 유전자 결핍 모델, 성체 근육줄기세포 수, 근육재생속도, 남성호르몬 이식.

학번: 2013-20323

# Ⅱ. 목 차

# (TABLE OF CONTENTS)

Page

Ⅰ. 국 문 초 록 (Abstract in Korean) ---------- i

Ⅱ. 목 차 (Table of Contents) ---------- ⅳ

Ⅲ. 서 문 (Introduction) ----------1

Ⅳ. 실험 재료 및 방법 ----------5

(Materials and Methods)

Ⅳ-1. 마우스(Mice) ----------5

Ⅳ-2. 면역조직형광법(IF) ----------5

Ⅳ-3. 유세포분석(FACS) 및 면역세포형광법(ICC) ----------6

Ⅳ-4. 근육단면적 측정(CSA) ----------8

Ⅳ-5. 근섬유 동정(Fiber Isolation) 및 근 핵(Myonuclei) 수 측정----8

Ⅳ-6. 남성호르몬 이식 실험(Silastic Tube Implantation) ----------8

Ⅳ-7. 인위적인 근육 손상 실험(Muscle Injury) ----------9

Ⅳ-8. 통계 처리(Statistical Analysis) ----------9

Ⅴ. 결 과 (Results) ----------10

Ⅴ-1. 적은 수의 성체 근육줄기세포 수가 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스 모델에서 형성된다----------10

Ⅴ-2. 인위적인 근육 손상 실험 후 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스 모델의 근육재생이 늦어진다----------15

Ⅴ-3. Gnrh1 유전자 결핍 성체 수컷 마우스에 남성호르몬을 이식하면 성체 근육줄기세포 수가 재형성된다----------19

Ⅵ. 고 찰 (Discussion) ----------23

Ⅶ. 참 고 문 헌 (References) ----------28

Ⅷ. 영 문 초 록 (Abstract in English) ----------32

# Ⅲ. 서 문 (Introduction)

Gnrh1 유전자 결핍 마우스는 시상하부-뇌하수체 사이에 존재하는 생식샘 자극 호르몬이 자연적인 돌연변이에 의해 정상적인 기능을 하지 못하여 뇌하수체에서 성호르몬 분비를 촉진할 수 있는 난포 자극 호르몬(FSH)과 황체 형성 호르몬(LH)의 혈중 수치가 사춘기 이후부터 항상 감소되어 있는 모델이다(Cattanach et al., 1997; Ebling et al., 2006). 이는 분자적으로 생식샘 자극 호르몬의 리보핵산 전사 과정 중 스플라이싱이 비정상적으로 일어나 기능을 하는 단백질이 만들어지기 못하기 때문으로 알려져 있다(Son et al., 2005). 이 모델은 뇌에서부터 생식샘 자극 호르몬이 분비되지 않기 때문에 그것의 표적이 되는 남성 및 여성 호르몬이 사춘기 이후부터 분비되지 않아 2차 성징이 오지 않으며 생식 또한 불가능하다(Dwyer et al., 2015). 이 마우스 모델에 대한 주된 연구는 신경 및 행동에 대해서 연구(Gill et al., 2008; Ward and Charlton, 1981)가 주로 진행되어 왔으며 근육 표현형에 대한 이 모델에서의 연구는 현재까지 보고된 바가 없다.

성체 근육줄기세포는 근육재생과정에서 가장 필수적인 세포이다. 지금까지 근육줄기세포는 발생 과정 중 전사인자인 Pax7 단백질을 배아시기 E12.5부터 일생 동안 항상 발현하고 있다고 알려져 있다

(Lepper and Fan, 2010; von Maltzahn et al., 2013). 또한 Pax7 단백질을 발현하고 있는 근육줄기세포를 근육에서만 특이적으로 사멸시키거나 또는 Pax7 유전자를 근육줄기세포 특이적으로 결손 시켰을 때 인위적인 근육 손상을 일으키면 근육재생이 불가능하다는 논문 보고들이 있다(Gunther et al., 2013; Sambasivan et al., 2011). 그리고 정량적으로 하나의 근섬유 위에 존재하는 수 개의 근육줄기세포만으로도 100개 이상의 근섬유와 수천 개의 근세포들을 재생할 수 있다는 논문도 발표되었다(Collins et al., 2005). 따라서, 근육줄기세포수(Muscle stem cell pool)와 근육재생능력(Muscle regeneration capacity)은 상당히 밀접한 관계가 있을 것으로 예상되며 이에 대해서 자세한 연구가 진행될 필요가 있다.

지금까지 보고된 성호르몬과 근육의 비대성에 대한 임상적 연구는 약물적으로 남성호르몬(Testosterone)의 농도를 증가시키면서 인체에 주입하였을 때 근섬유의 면적과 근 핵의 수가 남성 호르몬 농도에 비례하여 증가한다고 알려져 있다(Sinha-Hikim et al., 2002). 그리고 남성 호르몬의 생리적 농도를 초과하게 인체에 주입하면 근육줄기세포의 수 또한 높은 농도에 비례하여 증가한다고 보고하였다(Sinha-Hikim et al., 2003). 또한 해외의 다른 연구진들은 남성 호르몬의 근육 발달 및 근육의 비대성에 대한 남성 호르몬의 직접적인 기능을 밝히고자 근육 특이적 남성호르몬 수용체(Androgen receptor) 유전자 적중 마우스 모델을 이용하여 연구를 수행하였다. 예를 들어,

프랑스의 한 연구진에 의하면 근섬유 특이적으로 남성호르몬 수용체를 제거하였을 경우 근력은 감소하나 사지골격근의 무게에는 차이가 없다고 보고한 반면 벨기에의 한 연구진에 의하면 근세포 특이적으로 남성호르몬 수용체를 제거하였을 경우 근력에는 차이가 없으며 사지골격근의 무게가 감소한다는 논문을 각각 발표하였다 (Chambon et al., 2010; Ophoff et al., 2009). 이처럼 근육과 성호르몬의 관계에 대한 연구들이 많이 진행되었지만 현재까지 분자적으로 사지골격근의 비대성에 대한 정확한 원인은 불분명한 상황이다. 위 두 논문에서 비록 공통적으로 구해면체근(Bulbocavernosus muscle)과 항문거근(Levator ani muscle)의 크기 및 무게는 남성호르몬 수용체와 연관성을 찾을 수 있다는 보고를 했으나 사지골격근의 발달 및 비대성에 대한 남성호르몬 수용체의 직접적인 영향을 확인하지 못하였다. 따라서 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델을 이용한 사춘기 이후의 근육의 발달 정도와 이 모델을 이용하여 인위적으로 남성호르몬을 체내로 이식하여 근육의 무게와 단면적 변화 그리고 근육줄기세포의 수에 대한 비교 분석이 필요하다.

따라서 본 논문에서는 자연적인 돌연변이에 의해 발생된 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델을 이용하여 근육줄기세포의 형성 및 재형성에 대한 성호르몬의 기능에 대해 연구하였다. 그리고 성체기에 형성된 근육줄기세포 수와 근육재생 정도의 관계를 반복적인 근육 손상 실험을 통하여 비교해 보았다. 마지막으로 두 종류의 남성호르몬

을 한달 기간 동안 이식하여 Gnrh1 유전자 결핍 성체 수컷 마우스의 생체 내 혈중 남성 호르몬 농도를 조절한 후 사지 골격근 내에 존재하는 성체 근육줄기세포 수에 대한 변화를 분석하였다.

# Ⅳ. 실험 재료 및 방법 (Materials and Methods)

## Ⅳ-1. 마우스(Mice)

자연적인 돌연변이에 의해 14번 상염색체에 존재하는 유전자(Gonadotropin releasing hormone 1)의 일부가 결실된 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스(Cattanach et al., 1977)의 획득은 Jackson laboratory로부터 암수 쌍으로 구매하였다. 교배는 $Gnrh1^{+/hpg}$ x $Gnrh1^{+/hpg}$ 유전자형과 같이 이형 유전자(Hetero)의 암수 쌍을 통하여 번식하였고 유전형 분석(Genotyping) 결과 자손들 중 $Gnrh1^{+/+}$ 와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 유전자형을 가진 암수 성체 마우스만 실험에 사용되었다. 또한 본 논문에 전반적으로 실험에 사용한 마우스의 주령은 3 ~ 4개월 된 성체 암수 마우스가 사용되었다. 모든 마우스는 서울대학교 SPF 동물 실험 시설의 지침 의거 교배, 실험 및 도태되었다.

## Ⅳ-2. 면역조직형광법(IF)

IF에 사용된 조직은 사지골격근(hindlimb muscle) 중 앞정강근인 TA muscle(tibialis anterior muscle) 좌우 근육 조직을 사용하였다. IF용 조직 slide를 얻기 위하여 TA muscle을 2ml 튜브(0030 120.094, Eppendorf) 속의 Optimal cutting temperature compound(4583,

Tissue-Tek®)에 담그고 액체 질소(-196℃)에서 15분 얼린 후 저온유지장치(cryostat)내에서 조직절편을 만든다. 만들어진 조직절편은 PBS(Phosphate buffered saline)에 수세를 5분씩 두 번 하고 4% paraformaldehyde에 10분 고정한다. 이후 permeabilization buffer(0.4% triton X-100 in 5% BSA)에 10분 반응시킨다. Blocking buffer와 1차 항체를 녹이는 용매는 M.O.M kit(FMK-2201, Vector Inc)의 solutions을 사용하였고 1차 항체의 희석률은 Pax7(1:100, DHSB), Ki67(1:1000, abcam), Laminin(1:2000, abcam) 등과 같이 사용하였다. Edu 염색의 경우 Click-iT® Edu Imaging Kits의 protocols을 준수했다. 마우스에 Edu 주입은 도태 전 24h 간격으로 두 번 주입하였다. 2차 항체를 녹이는 용매는 5% BSA(bovine serum albumin)를 사용하였고 2차 항체의 희석률은 mouse 594, rabbit 488, rat 488 모두 1:400으로 사용하였다. Mounting solution은 Vectashield(H-1200, vector laboratories)를 사용하였다.

### Ⅳ-3. 유세포분석(FACS) 및 면역세포형광법(ICC)

유세포분석 및 면역세포형광법에 사용된 근육조직은 사지근육인 앞정강근인 TA(tibialis anterior muscle), 장딴지근인 GA(gastrocnemius muscle), 허벅지근인 Q(quadricep muscle), 삼두근인 Tri(Triceps muscle)의 좌우 근육 조직을 사용하였다. 준비된 사지근육을 1mm$^2$

미만으로 잘게 썰어 0.2% collagenase type Ⅱ(17101015, Gibco) in DMEM/High Glucose 용액에 샘플당 5ml씩 1시간 30분 간 37℃가 유지된 회전기(rotator) 내에서 반응시킨다. Washing buffer(10% horse serum in DMEM/High Glucose)을 샘플당 5ml씩 넣고 원심분리기(1200rpm, 5min, 4℃)를 돌린 뒤 상층액을 제거한다. Dispase solution(dispase 4ml, washing buffer 6ml, collagenase type Ⅱ 0.0037g)을 각 샘플당 5ml씩 넣고 30분 간 37℃가 유지된 회전기 내에서 반응시킨다. 20 gauge 바늘을 10ml 주사기에 꽂아 dispase solution mixture을 petri-dish 위에서 10번 분쇄시킨다. 원심분리기(1200rpm, 5min, 4℃)를 돌린 후 상층액을 제거하고 40㎛ strainer로 한 번 걸러준다. 1차 항체 VCAM1-biotin(553331, BD Pharmingen), CD31-APC(551262, BD Pharmingen), CD45-APC(103112, Biolegend), Sca1-FITC(553335, BD Biosciences)를 1:100 비율로 FACS buffer(10% horse serum in autoclaved PBS)에 넣고 4℃ 암조건에서 샘플과 30분간 반응시킨다. FACS buffer로 한 번 수세 후 2차 항체 Streptavidin-PE-Cy7를 1:100 비율로 샘플에 넣고 4℃ 암조건에서 15분간 반응시킨다. FACS AriaⅢ 기계로 $VCAM1^{+}$, $Sca1^{-}$, $CD31^{-}$, $CD45^{-}$인 밀집지역에 있는 근육줄기세포를 동정한다.

### Ⅳ-4. 근육단면적 측정(CSA)

근육단면적 측정에 사용된 근육은 앞정강근인 TA muscle(tibialis anterior muscle) 좌우 근육 조직을 사용하였다. Laminin 항체로 면역 조직 염색한 이후 Leopard program(ZOOTOS, Korea)을 통해 근육단면적을 측정하였다.

### Ⅳ-5. 근섬유 동정 및 근핵 수 측정

근섬유 동정에 사용된 근육조직은 사지근육 중 장딴지근인 GA(gastrocnemius muscle) 조직을 사용하였다. 0.2% collagenase type Ⅱ(17101015, Gibco) in DMEM/High Glucose 용액에 샘플당 5ml씩 넣고 37℃ 에서 1시간 반응시킨다. 이후 근섬유 동정 실험 방법(Pasut et al., 2013)에 따라 진행하였다. 근핵 수 측정은 Vectashield(H-1200, Vector Laboratories)을 사용하여 근핵을 염색하였고 500㎛ 당 근핵 수를 세었다.

### Ⅳ-6. 남성호르몬 이식 실험

남성호르몬은 Testosterone propionate(T1875-5G, Sigma)와 5α-Dihydrotestosterone(A8380-1G, Sigma) 두 종류를 사용하였다. 각각 Silastic tube(508-009, Dow corning)를 이용해 마취된 마우스 개체의

목 뒤 피하로 이식(subcutaneous implantation)하였다. Testosterone propionate의 경우 1㎝ 길이의 tube를 사용하였고 5α-Dihydrotestosterone의 경우는 0.5㎝ 길이의 tube를 사용하여 tube 내부를 가루로 채워서 실험을 진행하였다. 3 ~ 4개월 된 수컷 마우스에 이식 후 한 달이 지난 마우스가 실험에 사용되었다.

### Ⅳ-7. 인위적인 근육 손상 실험

근육손상 부위는 오른쪽 TA muscle(tibialis anterior muscle)에 1.2% $BaCl_2$ in Saline, 100㎕를 위쪽과 아래쪽 방향에서 50㎕씩 나누어 천천히 주입하였다. 근육 손상을 주기 전 마우스에 2% Avertin(0.02㎖/g body weight)을 주입하여 마취 후 실험을 진행하였다.

### Ⅳ-8. 통계 처리(Statistical Analysis)

통계적 유의성은 독립적인 최소 세 번의 실험으로부터 나온 raw data을 가지고 student *t*-test로 확인하였다. 근육 손상 실험의 경우 error bars는 표준 오차(S.E.M)로 나타냈다. 또한 $p$ value가 0.05 보다 낮을 경우 * 표시로 나타내었다.

# Ⅴ. 결 과 (Results)

## Ⅴ-1. 적은 수의 성체 근육줄기세포 수가 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스 모델에서 형성된다.

현재까지 보고된 해외의 논문에 따르면 성체 근육줄기세포의 유지에 관여하는 세포 신호 전달은 Notch 신호와 연관성이 매우 깊다. 예를 들어, Notch 신호의 표적 유전자인 Hey1과 Hey1이 동시에 이중 결손된 마우스의 경우 성체 근육줄기세포가 유지 되지 않는 것을 관찰할 수 있었고(Fukada et al., 2011), 동일한 표현형을 Notch 신호의 co-activator 전사인자인 RBP-J를 근육줄기세포 특이적으로 결손시켰을 때도 확인할 수 있었다(Bjornson et al., 2012; Vasyutina et al., 2007). 또한 본 연구실에서는 사춘기 이후의 성호르몬이 Sex hormone-Mib1$^{Myofiber}$-Notch axis을 통해 성체 근육줄기세포 형성에 핵심적인 역할을 한다는 보고를 하였다(Kim et al., unpublished).

마우스의 혈중 성호르몬 농도를 정상보다 낮게 조절할 수 있는 예에는 물리적으로 정소제거(Orchidectomy) 및 난소제거(Ovariectomy)의 방법이 있고(Axell et al., 2006; Lara-Garcia et al., 2011) 화학적으로 남성 및 여성 호르몬 길항제들을 원하는 기간 동안 체내로 주

입하여 혈중 농도를 낮추는 방법이 존재한다(Kass et al., 2014). 하지만 유전학적인 모델로 가장 상위에서 뇌하수체와 시상하부를 연결하는 생식샘 자극 호르몬의 유전자적 결함으로 인해 하위 신호체계가 무너져 사춘기 이후 성호르몬 분비가 되지 않는 Gnrh1 유전자 결손 마우스(이하 $Gnrh1^{hpg/hpg}$) 마우스가 보고되었다(Cattanach et al., 1977). 지금까지 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 근육 표현형에 대한 연구는 현재까지 보고된 바가 없기 때문에 3개월 주령의 암수 성체 마우스를 이용하여 성체 근육줄기세포의 형성에 대해 분석해보았다. 그 결과 본 연구실의 선행 연구 내용과 같이 수컷 성호르몬 결핍 마우스의 근육줄기세포의 수는 정상개체에 비해 현저히 감소됨을 재확인할 수 있었다(Figure 1a, 1b, $P<0.05$, Kim et al., unpublished). 암수 성별에 차이가 없이 동일한 표현형을 나타내는지 확인하기 위하여 3개월 주령의 암컷 마우스의 앞정강근(TA muscle)의 성체 근육줄기세포를 면역염색 해 본 결과 수컷 마우스에 비해 그 차이는 적었지만 정상 개체에 비해 감소되어 있음을 확인하였다(Figure 2c, 2d, $P<0.05$). 하지만 3개월 주령의 수컷 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 근핵의 수는 정상개체와 차이가 없음을 근섬유 동정 후 Hoechst 염색을 통해 확인하였다(Figure 1e, 1f, $P>0.05$). 앞정강근(TA)을 포함한 다른 부위의 근육조직에서도 감소된 성체 근육줄기세포 수를 확인하기 위하여 3개월 주령의 수컷 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 사지골격근(Hindlimb muscle)을 유세포 분석(FACS) 방법을 통해 동정한 후 면역세포염색

법을 통해 동정된 전체 세포 수 대비 근육줄기세포의 표지 단백질인 Pax7$^{+}$한 세포 수를 세어보았다. 위의 결과와 마찬가지로 동정된 전체 세포 중에서 실질적으로 Pax7 단백질을 발현하고 있는 세포의 수가 성호르몬 결핍 마우스 모델에서 현저히 감소되었음을 확인할 수 있었다(Figure 1g, 1h).

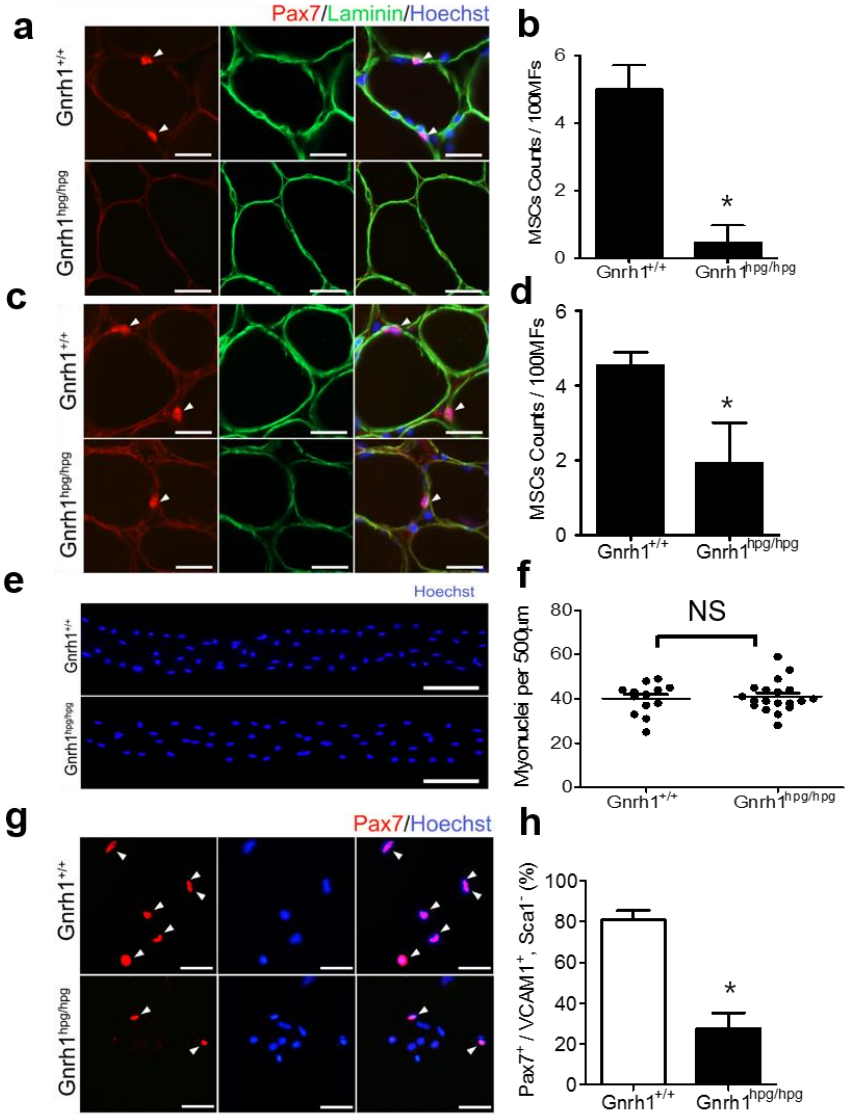
a
Pax7/Laminin/Hoechst
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
b
MSCs Counts / 100MFs
6
4
2
0
*
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
c
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
d
MSCs Counts / 100MFs
6
4
2
0
*
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
e
Hoechst
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
f
Myonuclei per 500μm
80
60
40
20
0
NS
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
g
Pax7/Hoechst
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
h
Pax7+ / VCAM1+, Sca1- (%)
100
80
60
40
20
0
*
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg

Figure 1. 적은 수의 성체 근육줄기세포 수가 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스 모델에서 형성된다.

(a-b) 생후 3개월 주령의 수컷 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 앞정강근(TA muscle) 절편을 이용하여 면역조직염색법을 통해 성체 근육줄기세포의 수를 확인함, (c-d) 생후 3개월 주령의 암컷 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 앞정강근(TA muscle) 절편을 이용한 면역조직염색법을 통해 성체 근육줄기세포의 수를 확인함, (e-f) 생후 3개월 주령의 수컷 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 근섬유를 동정 후 근핵 수를 비교함, (g-h) 생후 4개월 주령의 수컷 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 사지 골격근에 존재하는 근육줄기세포를 동정한 후 세포면역염색법을 통하여 $Pax7^{+}$한 근육줄기세포 비율을 확인함. 화살표로 $Pax7^{+}$한 각각의 근육줄기세포를 표시하였다. Scale bar: 25㎛

Ⅴ-2. 인위적인 근육 손상 실험 후 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스 모델의 근육재생이 늦어진다.

근육 재생과정은 배아 시기의 근육발달과정과 완벽하게 동일하지는 않지만 일반적으로 재생 과정의 단계별 유사한 점이 존재한다고 알려져 있다(Wang and Rudnicki, 2012). 또한 디프테리아 독소를 이용한 형질전환 마우스를 이용한 실험에서 근육줄기세포만이 근육재생의 원천 세포임을 확인하였다(Lepper et al., 2011). 그리고 적은 수의 근육줄기세포로도 효율적으로 근육재생이 가능하다는 연구 보고도 있다(Gunther et al., 2013). 따라서 적은 수로 형성된 3개월 주령의 수컷 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 마우스의 근육 재생과정이 정상적으로 일어나는지 그리고 근육 재생 정도를 정상 마우스와 비교 분석하기 위해서 1차 인위적인 근육 손상 후 30일 뒤 근육의 단면적을 측정하였다(Figure 2a). 화학적 근육 손상 방법 중 하나로 1.2% $BaCl_2$, 100㎕을 오른쪽 앞정강근에 고르게 근육 손상을 준 후 30일이 지나면 현저히 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 마우스의 근육재생이 지연됨을 관찰할 수 있었다(Figure 2b, 2d). 반면 근육손상을 주지 않은 동일한 마우스의 왼쪽 앞정강근의 근육 단면적의 수치는 통계적으로 차이가 나지 않았다(Figure 2c, $P > 0.05$). 대부분 근육 손상 실험으로 근육재생의 표현형을 분석하고자 할 경우 인위적으로 근육 손상 실험을 반복적으로

3회 또는 5회 이상 등을 주고 난 후 근육 재생 정도에 대한 차이를 비교하거나 선천적으로 유전적 결함을 가진 $Dmd^{mdx}$ 마우스와의 교배를 통해 근육을 구성하는 구조 단백질(Dystrophin)을 제거하여 지속적으로 근육손상을 일으키는 방법이 존재한다(Kitamoto and Hanaoka, 2010; Urciuolo et al., 2013). 본 논문에서는 3번의 근육 손상 실험을 반복하고 근육의 재생 정도를 관찰하였다(Figure 2e). 한 번의 근육 손상을 주는 실험과 같은 실험 방법으로 30일 간격으로 세 번의 근육 손상을 가하게 되면 한 번의 근육 손상 실험과 동일하게 근육 단면적이 정상개체에 비해 작게 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2f, 2g). 마찬가지로 반대편의 근육 손상을 주지 않은 왼쪽 앞정강근(TA muscle)의 근육단면적은 차이가 없었다.

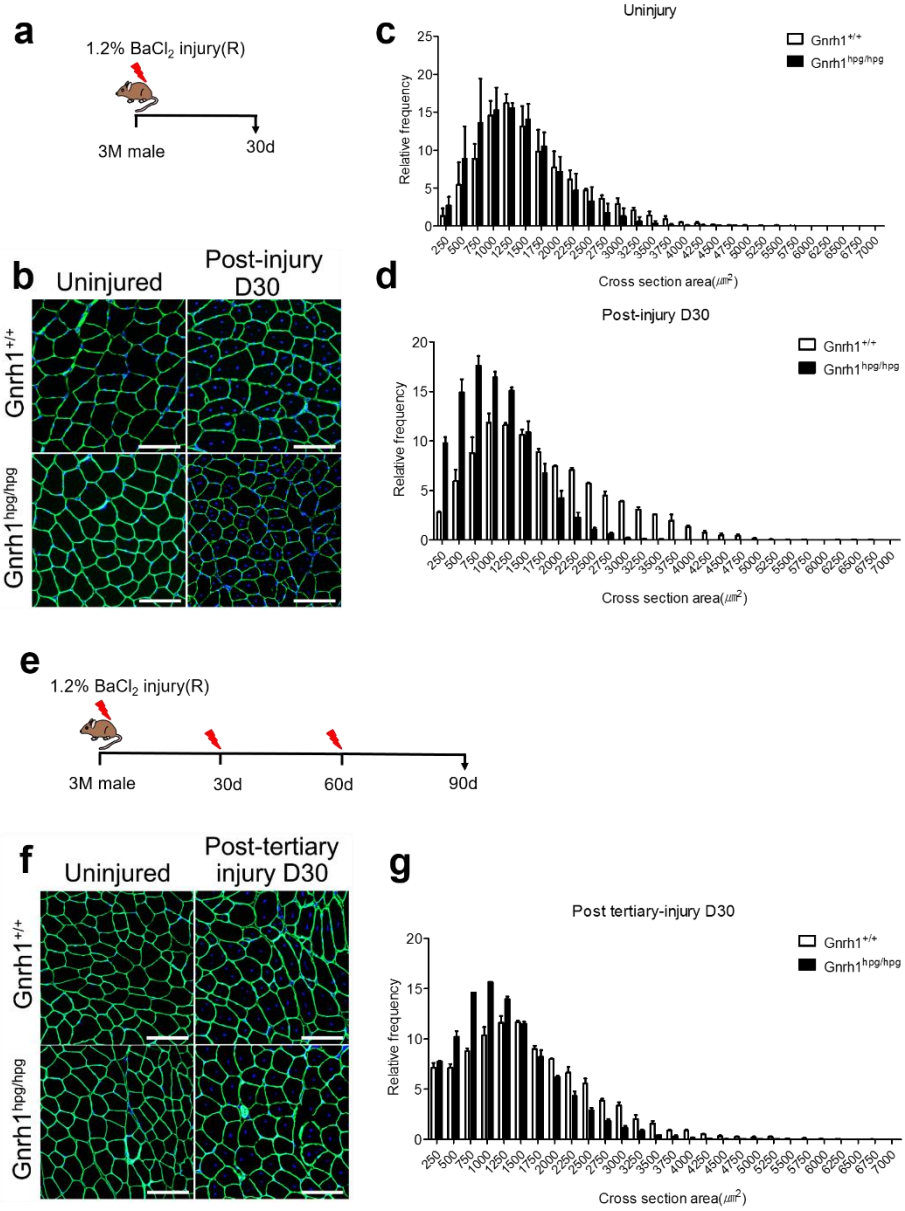
a
1.2% BaCl2 injury(R)
3M male
30d
b
Uninjured
Post-injury D30
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
c
Uninjury
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
Relative frequency
Cross section area(μm2)
d
Post-injury D30
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
Relative frequency
Cross section area(μm2)
e
1.2% BaCl2 injury(R)
3M male
30d
60d
90d
f
Uninjured
Post-tertiary injury D30
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
g
Post tertiary-injury D30
Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
Relative frequency
Cross section area(μm2)

Figure 2. 인위적인 근육 손상 실험 후 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스 모델의 근육재생이 늦어진다.

(a) 생후 3개월 주령의 수컷 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 앞정강근(TA muscle)에 1차 1.2% $BaCl_2$ 근육 손상을 주는 실험 모식도, (b-d) 1차 근육손상 후 30일 뒤 근육재생 정도를 면역염색법을 이용해 비교함, (e) 생후 3개월 주령의 수컷 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 앞정강근(TA muscle)에 3차 1.2% $BaCl_2$ 근육 손상을 주는 실험 모식도, (f, g) 3차 근육손상 후 30일 뒤 근육재생 정도를 면역염색법을 이용해 비교함. Scale bar: 25㎛

Ⅴ-3. Gnrh1 유전자 결핍 성체 수컷 마우스에 남성호르몬을 이식하면 성체 근육줄기세포 수가 재형성된다.

성호르몬이 사춘기 이후부터 분비가 되지 않기 때문에 Gnrh1 유전자 결핍 성체 마우스의 근육줄기세포의 수가 줄어든 것으로 간주된다(Kim et al., unpublished). 한편 다양한 종류의 성호르몬 저하 모델에서 외부의 성호르몬을 체내로 주입하였을 때 정상적으로 생식의 기능을 회복한다는 연구 보고가 있다(Dwyer et al., 2015; Viswanathan and Eugster, 2011). 마찬가지로 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스의 성체 근육줄기세포 수가 줄어든 표현형을 정상 수준으로 회복할 수 있는지를 알아보기 위하여 생체 튜브를 이용한 두 종류의 남성호르몬(Testosterone, 5α-Dihydrotestosterone)을 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스와 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스에 각각 피하 이식하였다(Figure 3a). 피하 이식 후 30일이 경과하면 남성호르몬에 민감한 근육 부위인 항문거근과 정소 그리고 정낭의 크기 및 무게가 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스의 경우 소폭 증가한 반면 $Gnrh1^{hpg/hpg}$ 마우스는 이식 전에 비해 확연히 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3b, 3c). 그리고 두 종류의 남성호르몬을 이식 한 정상 $Gnrh1^{+/+}$ 마우스의 앞정강근(TA muscle)의 성체 근육줄기 세포 수가 정상 범위 보다 다소 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3d, 3h). 흥미롭게도 성호르몬 결핍 모델인 $Gnrh1^{hpg/hpg}$의 경우에는 앞정강근(TA muscle)에서 두 종류의 남성호르몬을 이식하게 되면 정상 마우스 수준과 비슷한 정도로 성체 근육줄기세포

수가 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3e, 3h). 또한 이 성체 근육줄기세포들은 세포주기 활성화 표지인자인 Ki67과 Edu로 면역 염색해 본 결과 Gnrh1$^{+/+}$ 와 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 마우스 모두 두 마커를 발현하고 있지 않았다(data not shown). 따라서 이식 후 30일에는 성체 근육줄기세포의 세포주기가 종료된 것으로 보인다. 전체적인 성체 근육줄기세포 수에 대한 분석을 하기 위해 남성호르몬 이식 전후 각 마우스의 사지 골격근 내에 존재하는 성체 근육줄기세포를 유세포분석 실험을 통해 모두 동정하였다. 이를 면역세포염색법으로 전체 동정된 세포 수 대비 실제로 근육줄기세포 표지 단백질인 Pax7$^{+}$한 세포 수로 비교해 본 결과 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 의 성체 근육줄기세포의 Pax7$^{+}$한 비율이 정상 수준으로 확연히 증가한 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3f-g, 3i).

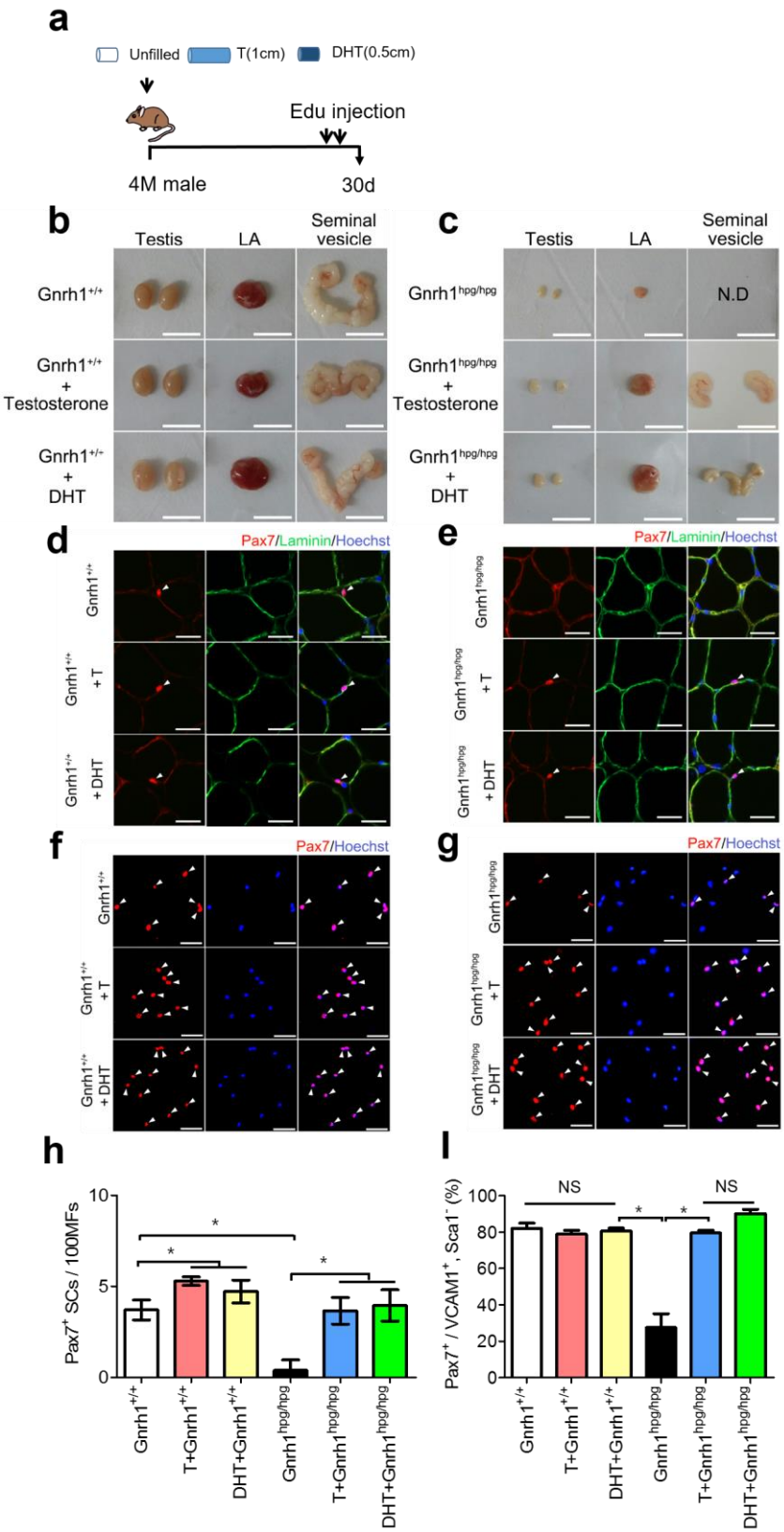
a
Unfilled
T(1cm)
DHT(0.5cm)
Edu injection
4M male
30d
b
Testis
LA
Seminal vesicle
Gnrh1+/+
Gnrh1+/+ + Testosterone
Gnrh1+/- + DHT
c
Testis
LA
Seminal vesicle
Gnrh1hpg/hpg
N.D
Gnrh1hpg/hpg + Testosterone
Gnrh1hpg/hpg + DHT
d
Pax7/Laminin/Hoechst
Gnrh1+/+
Gnrh1+/+ + T
Gnrh1+/+ + DHT
e
Pax7/Laminin/Hoechst
Gnrh1hpg/hpg
Gnrh1hpg/hpg + T
Gnrh1hpg/hpg + DHT
f
Pax7/Hoechst
Gnrh1+/+
Gnrh1+/+ + T
Gnrh1+/+ + DHT
g
Pax7/Hoechst
Gnrh1hpg/hpg
Gnrh1hpg/hpg + T
Gnrh1hpg/hpg + DHT
h
Pax7+ SCs / 100MFs
10
5
0
*
*
*
Gnrh1+/+
T+Gnrh1+/+
DHT+Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
T+Gnrh1hpg/hpg
DHT+Gnrh1hpg/hpg
I
Pax7+ / VCAM1+, Sca1- (%)
100
80
60
40
20
0
NS
NS
*
*
Gnrh1+/+
T+Gnrh1+/+
DHT+Gnrh1+/+
Gnrh1hpg/hpg
T+Gnrh1hpg/hpg
DHT+Gnrh1hpg/hpg

Figure 3. Gnrh1 유전자 결핍 성체 수컷 마우스에 남성호르몬을 이식하면 성체 근육줄기세포 수가 재형성된다.

(a) 생후 4개월 주령의 수컷 Gnrh1$^{+/+}$ 마우스와 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 마우스에 남성호르몬(Testosterone, 5$\alpha$-dihydrotestosterone)을 이식하는 실험 모식도, (b, c) 생체 튜브 이식 30일 뒤 수컷 Gnrh1$^{+/+}$ 마우스와 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 마우스의 고환(Testis), 항문거근(LA muscle), 정낭(Seminal vesicle)의 크기를 비교함, (d, e, h) 생체 튜브 이식 30일 뒤 수컷 Gnrh1$^{+/+}$ 마우스와 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 마우스의 앞정강근(TA muscle)에서의 성체근육줄기세포 수를 비교함, (f, g, i) 유세포 동정 실험을 이용하여 생체 튜브 이식 30일 뒤 수컷 Gnrh1$^{+/+}$ 마우스와 Gnrh1$^{hpg/hpg}$ 마우스의 사지골격근(limb muscle)내의 성체근육줄기세포 수를 비교함. 화살표로 Pax7$^{+}$한 각각의 근육줄기세포를 표시하였다. Scale bar: 25㎛

# Ⅵ. 고 찰 (Discussion)

Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델을 이용하여 성체 근육줄기세포 수의 형성 정도를 비교 해본 결과 성별에 무관하게 정상 마우스에 비해 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델에서 감소된 근육줄기세포 수가 형성됨을 발견하였다. 본 연구실은 선행 연구를 통하여 사춘기에 분비되는 성호르몬에 의해 근섬유 특이적으로 성체 근육줄기세포 수가 Notch 신호를 통해 조절됨을 보고하였다(Kim et al., unpublished). Gnrh1 유전자 결핍 수컷 마우스의 성체 근육줄기세포 수의 감소는 본 연구실의 선행연구와 본 논문을 통하여 재확인되었지만 Gnrh1 유전자 결핍 암컷 마우스의 성체 근육줄기세포 수가 수컷 마우스에 비해 적게 줄어든 점에 대한 연구가 더 필요하다. 예를 들어, 암컷 마우스의 경우 근육 발달이 수컷 마우스에 비해 늦게 성숙이 되기 때문에 3개월 마우스에서는 아직 성체 근육줄기세포 수가 덜 줄어든 것일 수 있다(Bergmann et al., 1995). 또는 암컷 마우스의 경우 근육에서의 성호르몬 기능이 수컷에 비해 진화적으로 덜 발달했기 때문에 수컷에 비교하여 성호르몬의 영향을 덜 받을 가능성도 존재한다(Miller et al., 1993). 또한 체내 성호르몬을 저하시킬 수 있는 방법에는 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 외에도 정소 및 난소 제거와 같은 물리적인 방법이나 성호르몬 길항제 처리와 같은 화학적인 방법이 존재한다(Axell et al., 2006; Kass et al., 2014; Lara-

Garcia et al., 2011). 이 두 모델에서의 아직 밝혀지지 않은 근육줄기세포에 대한 분석이 필요하다.

근육재생과정은 기존에 잘 알려진 근육줄기세포로부터 시작한다. 55년 전 기저막(Basal lamina)과 근초(Sarcolemma) 사이에 존재하는 위치적인 특성으로 세상에 알려지게 된 근육줄기세포(Mauro, 1961)는 그 이후 수많은 논문들에 의해 근육재생과정에 필수적인 세포로 자리매김하게 되었다(Lepper et al., 2011; von Maltzahn et al., 2013). Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델의 경우 정상 마우스에 비해 형성된 근육줄기세포 수가 감소되어 있기 때문에 인위적으로 근육 손상을 반복적으로 주면 처음엔 근육 재생이 불가능할 것으로 생각되었다. 하지만 적게 형성된 근육줄기세포 수만으로도 근육 단면적의 크기는 정상 마우스에 비해 크게 감소하였지만 근육 조직은 재생되었다. 이와 유사하게 적은 수의 근육줄기세포로도 효율적으로 근육재생이 가능하다는 연구 보고가 있다(Gunther et al., 2013). 그리고 근육재생과정은 근육발생과정과 유사한 점이 많기 때문에 적게 형성되었던 근육줄기세포 수가 근육 손상 이후에 수의 변화나 세포의 특성이 어떻게 변화되는지에 대해서 자세하게 알아볼 필요가 있다. 또한 근육을 구성하는 구조 단백질(Dystrophin)의 기능 상실로 인한 근육줄기세포 주변에 악화된 환경을 지속적으로 유도한 $Dmd^{mdx}$ 마우스 모델과의 교배를 통해 장기간 동안 성호르몬 결핍 마우스 모델 내에서의 성체 근육줄기세포 수의 유지, 증식, 분화 및

재형성에 대해 세분하게 관찰을 하면 성호르몬의 농도 저하와 근육 줄기세포 그리고 근육 재생과의 밀접한 관계를 좀 더 정확하게 밝힐 것으로 기대된다.

본 논문에서는 외부에서 두 종류의 남성 호르몬(Testosterone 및 5α-Dihydrotestosterone)을 이용하여 생체 이식 튜브를 통한 체내의 Gnrh1 유전자 결핍 수컷 마우스의 혈중 남성 호르몬의 농도를 증가시키면 한 달 만에 성체 근육줄기세포 수가 정상 수준만큼 증가된 것을 관찰 할 수 있었다. 하지만 남성 호르몬에 민감한 조직인 항문거근(LA muscle), 정소(Testis), 정낭(Seminal Vesicle)을 이용하여 성호르몬의 체내 반응성에 대해 관찰하였지만 실제로 혈중 성호르몬의 농도가 생리적인 범주에 속하였는지에 대해서 정확한 분석 장비를 통해 확인해야 한다. 성호르몬을 측정할 수 있는 Eliza Kit이나 RIA를 통한 수치 분석은 정확도에 있어서 한계 및 변수가 존재한다고 알려져 있다(Bartke et al., 1973; Hsing et al., 2007). 따라서 LC/MS 장비와 같은 보다 정밀한 기계를 통한 실험에 대한 신뢰도를 높일 필요가 있다(Wooding et al., 2015). 흥미로운 사실은 남성호르몬을 이식한 정상 마우스 $Gnrh1^{+/+}$의 증가된 근육줄기세포 수는 Gnrh1 유전자 결핍 마우스인 $Gnrh1^{hpg/hpg}$의 증가된 근육줄기세포 수에 비해 상대적으로 적었다. 다시 말하면 근 섬유당 항상 일정한 수의 성체 근육줄기세포 수를 유지하려는 조절 기작이 존재할 가능성이 있을 수 있다. 근육줄기세포를 연구한 다른 해외 연구팀에 따르면 근육

손상으로 증가된 근육줄기세포 수는 일정 시간이 지나면 원래의 수대로 돌아오는 항상성을 유지한다고 보고하였다(Kitamoto and Hanaoka, 2010; Shea et al., 2010). 그러므로 상대적으로 사춘기 이후 Gnrh1 유전자 결핍 마우스에서 적게 형성된 근육줄기세포 수의 증가가 정상 마우스에 비해 크게 증가된 것으로 생각할 수 있다. 하지만 성호르몬 유무에 따른 증가된 성체 근육줄기세포 수가 계속적으로 유지할 수 있는지에 대한 검증은 장기간에 걸쳐 연구가 필요하다. 또한 성호르몬 이식 후 증가된 성체 근육줄기세포 수에 의해 지연되었던 근육재생과정이 정상 마우스의 수준으로 다시 회복할 수 있는지도 확인 할 필요가 있다. 추가적으로 유세포 분석을 통한 성체 근육줄기세포의 동정 및 면역세포염색법 실험을 통해 근육줄기세포 표지 단백질인 $Pax7^{+}$ 세포의 실질적인 수가 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델에서 감소됨을 확인할 수 있었지만 계속 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델에서 연구를 진행하기 위해서는 기존에 알려진 유세포 분석 방법(Liu et al., 2015)을 변경해야 할 필요가 있다. 왜냐하면 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델의 경우 $VCAM^{+}$, $SCA1^{-}$, $CD31^{-}$, $CD45^{-}$ 한 FACS plot의 밀집부위가 대부분 $Pax7^{-}$ 세포이기 때문이다. 그렇기 때문에 성체 근육줄기세포 막에 많이 발현하는 $\alpha$7-$intergrin^{+}$, $CD34^{+}$과 같은 단백질에 해당하는 항체를 사용하여 성체 근육줄기세포를 동정하면 보다 정확하게 성호르몬 이식 전후 변화되는 근육줄기세포 수에 대해 비교하기가 용이할 것으로 예상된다

(Tierney et al., 2016). 마지막으로 두 종류의 남성호르몬 (Testosterone 또는 5α-Dihydrotestosterone) 뿐만 아니라 두 종류의 여성호르몬(Estrogen 또는 Progesterone)의 경우에도 성체 근육줄기세포의 형성, 증식, 재형성 과정에 어떠한 영향을 줄 수 있는지를 생체 이식 튜브를 이용하거나 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델을 이용하여 분석할 가치가 있다.

요약하자면 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델의 성체 근육줄기세포 수는 성호르몬의 영향으로 정상개체에 비해 감소되어 있고 줄어든 성체 근육줄기세포 수에 의해 근육재생이 늦어진다. 하지만 남성호르몬 이식으로 인해 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델의 성체 근육줄기세포 수를 정상 마우스의 수만큼 단기간에 회복시킬 수 있다는 결론을 내릴 수 있다. 앞으로 Gnrh1 유전자 결핍 마우스 모델의 장점을 활용한 다른 종류의 성호르몬과 성체 근육줄기세포의 역동성에 대해 자세한 연구가 좀 더 필요하다.

# Ⅶ. 참고문헌 (Reference)


Axell, A.M., MacLean, H.E., Plant, D.R., Harcourt, L.J., Davis, J.A., Jimenez, M., Handelsman, D.J., Lynch, G.S., and Zajac, J.D. (2006). Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. Am J Physiol Endocrinol Metab *291*, E506-516.

Bartke, A., Steele, R.E., Musto, N., and Caldwell, B.V. (1973). Fluctuations in plasma testosterone levels in adult male rats and mice. Endocrinology *92*, 1223-1228.

Bergmann, P., Militzer, K., Schmidt, P., and Buttner, D. (1995). Sex differences in age development of a mouse inbred strain: body composition, adipocyte size and organ weights of liver, heart and muscles. Lab Anim *29*, 102-109.

Bjornson, C.R., Cheung, T.H., Liu, L., Tripathi, P.V., Steeper, K.M., and Rando, T.A. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. Stem Cells *30*, 232-242.

Cattanach, B.M., Barr, J.A., Beechey, C.V., Martin, J., Noebels, J., and Jones, J. (1997). A candidate model for Angelman syndrome in the mouse. Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society *8*, 472-478.

Cattanach, B.M., Iddon, C.A., Charlton, H.M., Chiappa, S.A., and Fink, G. (1977). Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. Nature *269*, 338-340.

Chambon, C., Duteil, D., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Malivindi, R., Kato, S., Chambon, P., and Metzger, D. (2010). Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 14327-14332.

Collins, C.A., Olsen, I., Zammit, P.S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T.A., and Morgan, J.E. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. Cell *122*, 289-301.

Dwyer, A.A., Raivio, T., and Pitteloud, N. (2015). Gonadotrophin replacement for induction of fertility in hypogonadal men. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab *29*, 91-103.

Ebling, F.J., Nwagwu, M.O., Baines, H., Myers, M., and Kerr, J.B. (2006). The hypogonadal (hpg) mouse as a model to investigate the estrogenic regulation of spermatogenesis. Hum Fertil (Camb) *9*, 127-135.

Fukada, S., Yamaguchi, M., Kokubo, H., Ogawa, R., Uezumi, A., Yoneda, T., Matev, M.M., Motohashi, N., Ito, T., Zolkiewska, A.*, et al.* (2011). Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. Development *138*, 4609-4619.

Gill, J.C., Wadas, B., Chen, P., Portillo, W., Reyna, A., Jorgensen, E., Mani, S., Schwarting, G.A., Moenter, S.M., Tobet, S.*, et al.* (2008). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal population is normal in size and distribution in GnRH-deficient and GnRH receptor-mutant hypogonadal mice. Endocrinology *149*, 4596-4604.

Gunther, S., Kim, J., Kostin, S., Lepper, C., Fan, C.M., and Braun, T. (2013). Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells. Cell Stem Cell *13*, 590-601.

Hsing, A.W., Stanczyk, F.Z., Belanger, A., Schroeder, P., Chang, L., Falk, R.T., and Fears, T.R. (2007). Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *16*, 1004-1008.

Kass, A.S., Forre, O.T., Fagerland, M.W., Gulseth, H.C., Torjesen, P.A., and Hollan, I. (2014). Short-term treatment with a gonadotropin-releasing hormone antagonist, cetrorelix, in rheumatoid arthritis (AGRA): a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Scand J Rheumatol *43*, 22-27.

Kitamoto, T., and Hanaoka, K. (2010). Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration. Stem Cells *28*, 2205-2216.

Lara-Garcia, M., Alvarado, M., Cuevas, E., Cortes-sol, A., Dominguez, A., Tovar, A., and Pacheco, P. (2011). The effects of castration and hormone replacement on the cross-sectional area of pubococcygeus muscle fibers in the female rat. Anat Rec (Hoboken) *294*, 1242-1248.

Lepper, C., and Fan, C.M. (2010). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. Genesis *48*, 424-436.

Lepper, C., Partridge, T.A., and Fan, C.M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. Development *138*, 3639-3646.

Liu, L., Cheung, T.H., Charville, G.W., and Rando, T.A. (2015). Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting. Nat Protoc

*10*, 1612-1624.
Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol *9*, 493-495.
Miller, A.E., MacDougall, J.D., Tarnopolsky, M.A., and Sale, D.G. (1993). Gender differences in strength and muscle fiber characteristics. Eur J Appl Physiol Occup Physiol *66*, 254-262.
Ophoff, J., Van Proeyen, K., Callewaert, F., De Gendt, K., De Bock, K., Vanden Bosch, A., Verhoeven, G., Hespel, P., and Vanderschueren, D. (2009). Androgen signaling in myocytes contributes to the maintenance of muscle mass and fiber type regulation but not to muscle strength or fatigue. Endocrinology *150*, 3558-3566.
Pasut, A., Jones, A.E., and Rudnicki, M.A. (2013). Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. J Vis Exp, e50074.
Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., and Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. Development *138*, 3647-3656.
Shea, K.L., Xiang, W., LaPorta, V.S., Licht, J.D., Keller, C., Basson, M.A., and Brack, A.S. (2010). Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. Cell Stem Cell *6*, 117-129.
Sinha-Hikim, I., Artaza, J., Woodhouse, L., Gonzalez-Cadavid, N., Singh, A.B., Lee, M.I., Storer, T.W., Casaburi, R., Shen, R., and Bhasin, S. (2002). Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. Am J Physiol Endocrinol Metab *283*, E154-164.
Sinha-Hikim, I., Roth, S.M., Lee, M.I., and Bhasin, S. (2003). Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. Am J Physiol Endocrinol Metab *285*, E197-205.
Son, G.H., Park, E., Jung, H., Han, J., Lee, K.H., Seong, J.Y., and Kim, K. (2005). GnRH pre-mRNA splicing: solving the mystery of a nature's knockout, hpg mouse. Biochem Biophys Res Commun *326*, 261-267.
Tierney, M.T., Gromova, A., Sesillo, F.B., Sala, D., Spenle, C., Orend, G., and Sacco, A. (2016). Autonomous Extracellular Matrix Remodeling Controls a Progressive Adaptation in Muscle Stem Cell Regenerative Capacity during

Development. Cell Rep *14*, 1940-1952.
Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Molon, S., Grumati, P., Montemurro, F., Tedesco, F.S., Blaauw, B., Cossu, G.*, et al.* (2013). Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. Nat Commun *4*, 1964.
Vasyutina, E., Lenhard, D.C., Wende, H., Erdmann, B., Epstein, J.A., and Birchmeier, C. (2007). RBP-J (Rbpsuh) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 4443-4448.
Viswanathan, V., and Eugster, E.A. (2011). Etiology and treatment of hypogonadism in adolescents. Pediatr Clin North Am *58*, 1181-1200, x.
von Maltzahn, J., Jones, A.E., Parks, R.J., and Rudnicki, M.A. (2013). Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 16474-16479.
Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Satellite cells, the engines of muscle repair. Nat Rev Mol Cell Biol *13*, 127-133.
Ward, B.J., and Charlton, H.M. (1981). Female sexual behaviour in the GnRH deficient, hypogonadal (hpg) mouse. Physiol Behav *27*, 1107-1109.
Wooding, K.M., Hankin, J.A., Johnson, C.A., Chosich, J.D., Baek, S.W., Bradford, A.P., Murphy, R.C., and Santoro, N. (2015). Measurement of estradiol, estrone, and testosterone in postmenopausal human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. Steroids *96*, 89-94.

# Ⅷ. 영 문 초 록 (Abstract in English)

## The study of muscle regeneration capacity in Gnrh1 deficient mice and muscle stem cell re-establishment by androgen hormone implantation

Gi-Chan Han
School of Biological Sciences
The Graduate School
Seoul National University

Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) is the primary regulator of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. In the absence of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), which is secreted from hypothalamus, the follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) levels are substantially reduced after puberty. Subsequently, the pubertal maturation and reproductive system are impaired because of low serum levels of sex hormones, which are essential to induce secondary sexual characteristics. The previous

studies on Gnrh1-deficient mice, which have natural mutation in Gnrh1 gene, have been confined to fertility, nervous system, and sexual behavior, but not skeletal muscle. Unlike a myriad of studies which show the importance of adult muscle stem cells in maintenance, proliferation, self-renewal and differentiation, there were no in-depth study on the skeletal muscle in the absence of sex hormones. Here, for the first time, this study shows the causal relationship between sex hormone and formation as well as re-establishment of adult muscle stem cell using Gnrh1-deficient mouse model.

Regardless of sexuality, Gnrh-1 deficient mice showed low number of muscle stem cells. Moreover, the quantification of muscle cross-sectional area after muscle injury showed that Gnrh-1 deficient mice showed delayed muscle regeneration. When two types of androgens (Testosterone and 5$\alpha$-dihydrotestosterone)-filled bio-silastic tubes were implanted in Gnrh-1 deficient mice, the adult muscle stem cell pool was rescued. Consequently, these results showed that the sex hormone is indispensable for the establishment of adult muscle stem cell pool. Also, muscle regeneration was delayed in Gnrh-1 deficient mice after repetitive muscle injury but eligible to regenerate muscle fibers. Lastly, androgen implantation is enable to restore muscle stem cell pool in Gnrh1 deficient mice.

Key words: Gnrh1 deficient mice model, Muscle stem cell pool, Muscle regeneration capacity, Androgen hormone implantation.

학번: 2013-20323