



## 저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



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](#) 

이학석사학위 논문

Dihydrotestosterone에 대한  
앞정강근과 항문을림근 근육조직의  
반응차이

The different response of TA and  
LA muscles to  
Dihydrotestosterone treatment

2016년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

배 성 환

Dihydrotestosterone에 대한 앞정강근과

항문올림근 근육조직의 반응차이

The different response of TA and LA muscles to

Dihydrotestosterone treatment

지도교수 공 영 윤

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2016년 6월

서울대학교 대학원

생명과학부

배 성 환

배성환의 석사학위논문을 인준함

2016년 8월

위 원 장 이 건 수 (인)

부위원장 공 영 윤 (인)

위 원 백 성 희 (인)

The different response of TA and LA muscles  
to Dihydrotestosterone treatment

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

Sung-Hwan Bae

August 2016

Approved by thesis Committee

---

---

---

# I. 국문초록 (Abstract in Korean)

Dihydrotestosterone에 대한 앞정강근과 항문올림근  
근육조직의 반응차이

배 성 환

생명과학부

서울대학교 대학원 자연과학대학

항문올림근(Levator Ani muscle)은 회음근(Perineal muscle)의 일종으로 골격근(skeletal muscle)에 비해 성호르몬에 민감한 특징을 가진 독특한 근육조직이다. 따라서, 근육에 성호르몬이 미치는 영향에 대한 연구는 회음근으로 집중되었다. 선행 연구에서 회음근의 근육줄기세포는 Testosterone에 의해 분열이 촉진된다고 보고되었다. 하지만 골격근의 근육줄기세포가 Testosterone에 의해 분열을 멈추고 휴면상태로 전환되는 현상을 관찰하였다. Testosterone에 의하여 근육줄기세포에서 상반된 반응이 나타나는 원인을 밝히기 위해 사춘기이전의 어린

마우스에 Dihydrotestosterone을 처리하고 앞정강근(Tibialis Anterior muscle)과 항문올림근의 반응을 관찰하였다. 면역형광염색법(IHC)을 실시하고 세포주기 조절자의 mRNA 발현을 분석하여 근육줄기세포의 증식-휴면상태를 확인하였다. Notch 신호전달체계는 근육줄기세포에서 휴면으로의 전환에 관여한다. 이에 따라 Notch 신호전달체계의 지표 유전자와 그의 상위 조절자인 Mib1의 mRNA 발현을 분석하였다. 골격근에서 DHT에 의해 Mib1의 발현이 유도되고 Notch 신호전달 체계가 활성화되었다. 그 결과, 근육줄기세포는 분열을 멈추고 휴면상태로 전환되었다. 반면, 항문올림근은 Dihydrotestosterone가 있어도 Mib1의 발현이 유도되지 않아 Notch 신호전달체계가 활성화되지 않고 근육줄기세포가 계속 증식하는 것을 알 수 있었다.

**핵심어:** 남성호르몬, 근육줄기세포, 골격근, 회음근, Notch 신호전달체계

**학번:** 2013-22955

## II. 목 차

### (TABLE OF CONTENTS)

|   |    |
|---|----|
| I. 국문초록   | 1  |
| II. 목차  | 3  |
| III. 서문   | 5  |
| IV. 실험재료 및 방법   | 8  |
| 1. Mice   | 8  |
| 2. Sample preparation                                       | 8  |
| 3. Immunohistochemistry (IHC)                               | 9  |
| 4. Quantitative real-time PCR                               | 9  |
| V. 결과   | 12 |
| 1. DHT를 처리하면 지표기관과 근육의 무게와 크기가<br>달라진다.                     | 12 |
| 2. 앞정강근과 항문올림근의 근육줄기세포는 DHT를 처리했을 때<br>중식에 대한 반응이 다르게 나타난다. | 15 |
| 3. 항문올림근은 DHT를 처리했을 때 Notch 신호전달체계가<br>활성화되지 않는다.           | 19 |

4. 항문을림근은 DHT를 처리했을 때 Mib1의 발현이 증가하지  
않는다. -----21

VI. 고찰-----25

VII. 참고문헌-----28

VIII. 영문초록-----32



### Ⅲ. 서 문 (Introduction)

배아가 성체에 이르기까지 근육조직의 발달과정은 역동적이다. 체절에서 유래된 근육줄기세포는 배아기 동안 분자신호기전을 통해서로 융합하고 분화과정을 거쳐 1차 2차 근섬유가 된다. 출생 후에도 근육줄기세포는 자가 복제 및 분열을 통해 자신의 수를 늘리면서 생체를 구성하는 근육조직을 지속적으로 형성한다. 하지만 성체로 성장했을 때, 근육줄기세포는 자가 복제 및 분열을 줄이고 분화능을 유지한 채 휴지기에 들어간다. 휴지기 상태의 근육줄기세포는 부상 등의 원인으로 조직의 재생이 필요 할 때 다시 자가 복제와 분열을 한다.

Notch 신호전달 체계는 Notch 리간드(Dll1, 3, 4, Jagged1, 2)와 Notch 수용체(Notch1, 2, 3, 4)가 결합한 후 ICD가 절단되고 Hes, Hey계열의 유전자를 발현하며 신호를 전달한다(Yuan et al., 2010). Notch 신호전달 체계에는 Numb, Rbpj와 같은 조절자의 도움을 받아 효과적으로 신호를 전달한다. 대표적인 조절자로 Mib1이 있는데, Mib1은 Notch의 리간드를 내포화 시켜 신호전달을 돕는다(Koo et al., 2005). 근육조직에서도 Notch 신호전달체계가 작용한다. Numb, Rbpj를 근섬유 특이적으로 결손시킨 형질전환 마우스를 이용하여 Notch 신호전달체계가 골격근의 근육줄기세포의 증식을 억제하고 휴면상태를 유지시킨다고 밝혔다(Rajani M.George et al., 2013;

Mourikis P et al.,2012).

항문올림근(Levator ani muscle)은 항문주변을 둘러싸고 있는 근육조직으로, 생식기 주변에 위치한 구해면체근(Bulbocavernosus muscle)등과 함께 회음근(Perineal muscle)에 속한다. 수컷 레트를 중성화 시키면 항문올림근의 무게가 줄어들었고, 이 마우스에 Testosterone을 처리하면 항문올림근이 다시 발달한다(Gori and Pellegrino, 1964; Gori et al., 1969). 그 만큼 회음근은 남성호르몬에 민감하다. 따라서 회음근은 암수 간 크기가 확연히 차이난기 때문에, 성별을 판별하거나 호르몬이 작용했는지 구별하는 지표로 이용된다. 대부분의 선행 연구자들은 성호르몬에 의해 회음근이 커지는 이유를 수많은 신호전달경로에서 찾으려 했지만, Tobin은 항문올림근의 근육줄기세포의 증식과 관련지어 설명하였다. 항문올림근이 발달하지 않은 성체 암컷 레트에 Testosterone을 처리하자 항문올림근이 비대해졌고 총 근핵수와 근육줄기세포의 수가 증가하였다(Yolaine Joubert and Christine Tobin, 1989). 또한, 성호르몬의 분비가 증가하는 사춘기 동안 수컷 레트의 근육줄기세포의 수가 자연적으로 증가했고 사춘기이전에 Testosterone을 처리하면 암수 상관없이 근육줄기세포의 수가 증가하였다(Yolaine Joubert, Christine Tobin and Marie Claude Lebart, 1994). 이때, Testosterone에 의해 분열이 증가하는 근육줄기세포는 휴지기 상태에서 증식 상태로 전환되는 것으로 밝혀졌다(Yolaine

Joubert and Christine Tobin, 1995). 하지만 항문올림근은 성호르몬에 의한 반응에 있어서 독특한 근육조직이기 때문에 항문올림근에 나타난 현상을 골격근에 적용하기엔 무리가 있다.

본 연구를 통해, 사춘기 이전의 어린 마우스에 DHT를 처리한 후, 항문올림근과 앞정강근의 반응을 비교 분석하였다. 형광면역염색법을 이용하여 근육줄기세포를 정확하게 분석하고, mRNA발현 분석기법을 통해 Testosterone에 의해 근육줄기세포에서 나타나는 변화를 확인하고 차이를 밝히고자 한다. 이를 통해, 남성호르몬이 골격근과 회음근의 근육줄기세포에 각각 어떤 영향을 미치는 지 밝힐 수 있을 것이다.

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

### 1. Mice

본 연구에 사용된 마우스는 C57BL/6B로 암수의 교배를 통해 자손을 유지하였다. 마우스는 서울대학교 SPF 동물 실험 시설(승인번호.121204-6)에서 사육되었다. 동물 실험 시설은 12시간 명-암 주기를 지키고 마우스에게 음수와 먹이를 지급하였다.

성 호르몬이 분비 되기 이전의 P10 수컷 마우스가 실험에 사용되었다. 모든 마우스는 서울대학교 실험동물운영위원회의 지침에 따라 실험되었다.

### 2. Sample preparation

남성호르몬은  $5\alpha$ -Dihydrotestosterone(A8380-1G, Sigma)를 사용하였다. P10 수컷 마우스는 피하주사법을 통해 DHT(0.1mg/마우스)가 주입되었고 72시간후 실험에 사용되었다. 모든 마우스는 경추탈골법과 Avertin 안락사로 희생되었다. 마우스의 앞정강근(T.A. muscles)과 항문올림근(L.A. muscles)은 적출 후 -80°C 에 냉동보관 되었고 RNA분석과 냉동절편에 이용되었다.

### 3. Immunohistochemistry (IHC)

앞정강근과 항문올림근은 액체질소에서 급속 냉각 후, Cryostat으로 6~8  $\mu\text{m}$  두께의 냉동절편으로 만들었다. 절편은 PBS(Phosphate buffered saline)로 2회 세척하고 4% paraformaldehyde조건에서 10분동안 고정시킨다. 3회 세척 후, permeabilization buffer(0.4% triton X-100 in 5% Bovine serum albumine)에서 10분 처리하였다. 세척 후 M.O.M blocking solution을 5분간 처리하였다. 1차항체는 Pax7(1:100, DHSB), Ki67(1:1000, abcam)의 비율로 blocking solution에 희석시켜 사용하였다. 상온에서 2시간동안 반응시킨 후, PBS로 3회 세척하였다. 2차 항체는 mouse594, rabbit 488을 5% BSA에 1:400비율로 희석하여 사용하였다. 상온에서 1시간동안 반응시킨 후, PBS로 3회 세척하였다. Mounting solution은 Vectashield(H-1200, vector laboratories)을 사용하였다.

### 4. Quantitative real-time PCR

q-RT PCR을 하기 위해 앞정강근과 항문올림근의 RNA는 Trizol(Sigma, St. Louis, MO)을 통해서 추출되었다. 분리된 RNA는 oligo-dT primer와 reverse transcriptional enzyme(Promega, Madison, WI)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. cDNA는 SYBR

Green(Enzymomics)과 Rotor-Gene Q real-time PCR(Quiagen)을 사용되었다. mRNA의 발현은 beta-actin으로 표준화되었다. Primer 염기 서열은 아래와 같다:

AR-forward: 5' -GCCAGAAGCTTCATCTCAC-3'

AR-reverse: 5' -CTGCCTCCGAAGTGTGGTAT-3'

Mib1-forward: 5' -CCTACGACCTGCGTATCCTG-3'

Mib1-reverse: 5' -ACCTTTCCTCTACGCCATT-3'

p21-forward: 5' -TGGAGTCAGGCGCAGATCCA-3'

p21-reverse: 5' -CGCCATGAGCGCATCGCAAT-3'

p27-forward: 5' -AGGCAAACCTCTGAGGACCGG-3'

p27-reverse: 5' -TGCTCCACAGTGCCAGCGTT-3'

p57-forward: 5' -CGAGGAGCAGGACGAGAATC-3'

p57-reverse: 5' -GAAGAAGTCGTTTCGCATTGG-3'

Calcr-forward: 5' -GACCCTCAAATCTCCTGCT-3'

Calcr-reverse: 5' -ACATCCTTCCTTCAATCCGT-3'

Hes1-forward: 5' -CCCACCTCTCTTCTGACG-3'

Hes1-reverse: 5' -AGGCGCAATCCAATATGAAC-3'

Hes5-forward: 5' -AACTCCAAGCTGGAGAAGGC-3'

Hes5-reverse: 5' -CAGGAGTAGCCCTCGCTGTA-3'

Hey1-forward: 5' -TCAGAGCAGTGAGGTGAAGG-3'

Hey1-reverse: 5' -AGTGCAGGCAAGGTCTACAT-3'

HeyL-forward: 5' -GCTCGTATGTCTGGTGCTGA-3'

HeyL-reverse: 5' -CACTCCCTGAAGACGAAAGC-3'

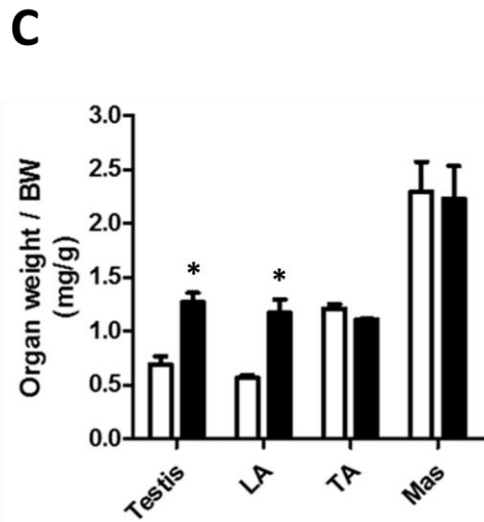
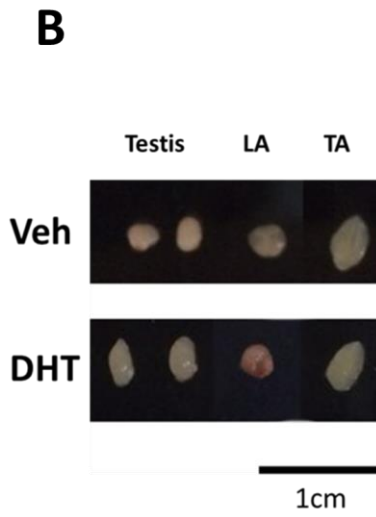
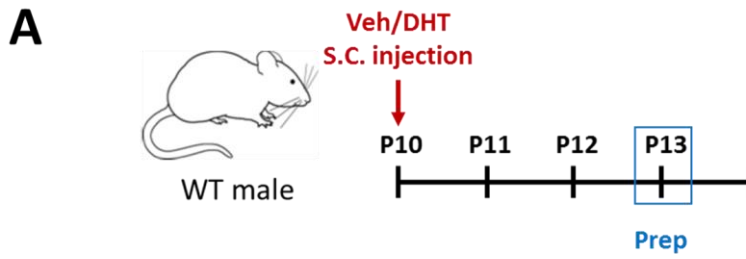
## V. 결 과 (Results)

### 1. DHT를 처리하면 근육과 지표 기관의 무게와 크기가 달라진다.

수컷 P10 마우스에 DHT를 피하주사하고 호르몬이 작용했는지 확인해 보았다.

본 연구에서 호르몬이 분비되지 않는 사춘기 이전의 P10 마우스에 Corn oil과 Corn oil에 녹인 DHT를 각각 피하주사하고 3일 후에 마우스를 희생시켰다. (Figure 1A) DHT의 작용을 지표기관을 통해 확인하였다. Testosterone에 의해 항문올림근과 정소의 크기가 증가하기 때문에 두 기관을 지표로 정하였다. DHT를 처리했을 때, 정소(Testis)와 항문올림근의 크기가 대조군에 비해 커졌다. (Figure 1B) 어린 마우스는 영양상태에 따라 개체차이가 크기 때문에 이를 줄이고자 지표기관과 근육의 무게를 마우스의 체중으로 나누었다. DHT에 의해 정소와 항문올림근의 체중당 기관무게가 2배 증가하였다. 그 결과, DHT가 마우스에 작용했음을 확인할 수 있었다. (Figure 1C)





## Figure 1. DHT에 의해 지표기관의 크기와 무게가 증가하였다.

(A) DHT에 대한 앞정강근과 항문올림근의 근육줄기세포의 반응 차이를 관찰하기 위해 DHT(0.1mg/마우스)를 피하주사 하였다. 근육줄기세포에 반응이 나타나는 시간을 고려하여 주사 후 3일 뒤에 마우스를 희생시키고 근육을 적출하여 분석하였다.

(B) (A)의 실험조건으로 수행하였다 근육과 지표기관을 적출하여 크기를 비교하였다.

(C) (A)의 실험조건으로 수행하였다. 지표기관과 근육의 무게를 체중으로 나누어 비교하였다.

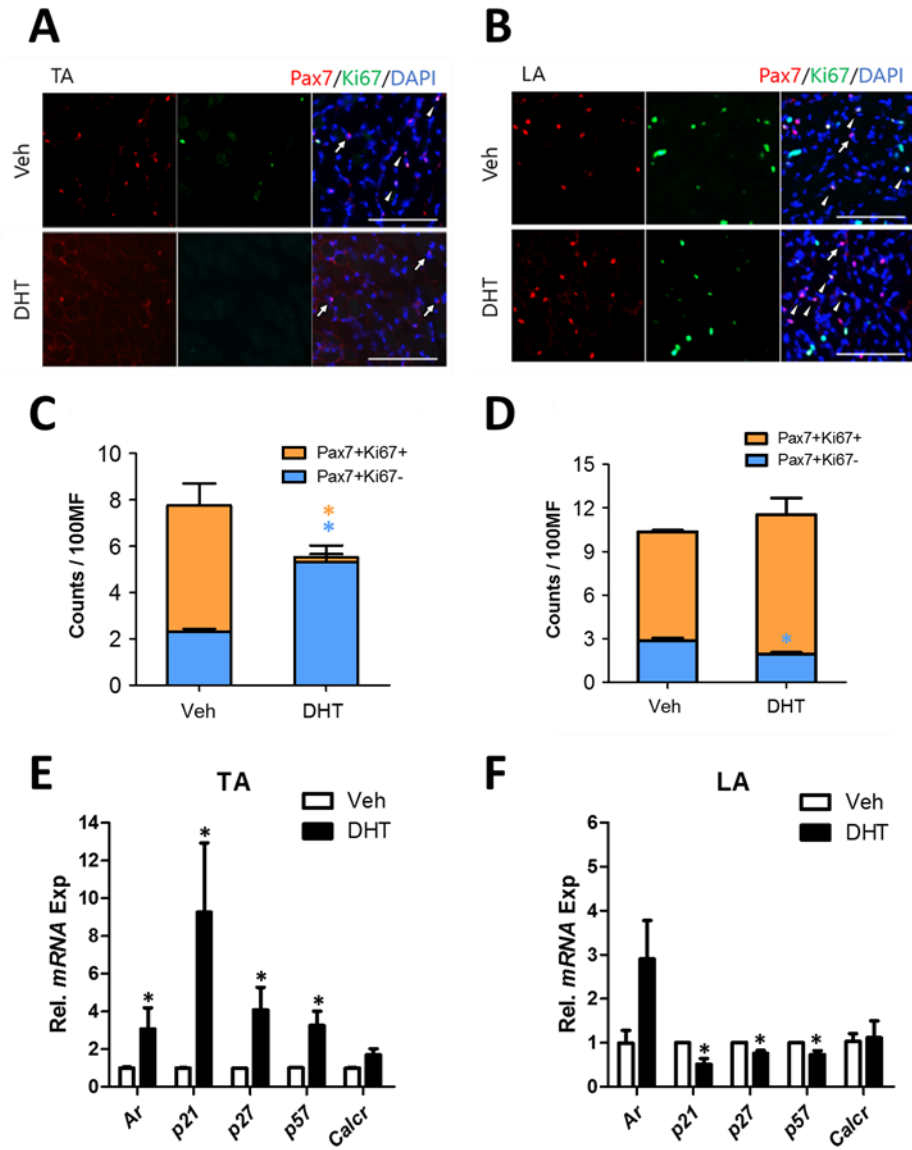
## 2. DHT를 처리했을 때, 앞정강근과 항문올림근의 근육줄기세포는 증식에 대한 반응이 다르다.

성호르몬이 분비되기 이전인 마우스에서 DHT에 의한 앞정강근과 항문올림근에서 근육줄기세포의 반응을 관찰하였다.

본 연구실에서는 사춘기 이전의 마우스에 성호르몬을 주입시키자 증식하던 골격근의 근육줄기세포가 휴지상태로 전환되는 것을 관찰하였다. 하지만 회음근의 근육줄기세포는 Testosterone에 의해 증식한다는 상반된 결과가 보고되었다(Yolaine Joubert and Christine Tobin, 1989), (Yolaine Joubert, Christine Tobin and Marie Claude Lebart, 1994), (Yolaine Joubert and Christine Tobin, 1995).

DHT에 의한 회음근과 골격근의 상반된 반응을 확인하기 위해서 두 근육을 동일한 조건에서 실험을 수행하였다. 근육줄기세포의 증식을 관찰하기 위해 IHC를 실시하였다. (Figure 2A, B) 그 결과, 골격근중 하나인 앞정강근의 근육줄기세포는 증식을 멈춘 반면, 회음근중 하나인 항문올림근의 근육줄기세포는 여전히 증식하고 있음을 확인하였다. (Figure 2C, D) 근육줄기세포의 증식을 세포주기 조절자(p21, p27, p57, Calcr)의 mRNA발현으로 확인하기 위하여 quantitative real-time PCR을 진행하였다. (Figure 2E, F) 그 결과, 앞정강근은 세포주기 조절자의 발현이 증가하고, 항문올림근은 감소함을 알 수 있었다. 따라서 앞정강근의 근육줄기세포는 DHT에

의해 증식을 멈추고, 항문올림근의 근육줄기세포는 계속 증식하는  
상반된 반응이 나타나는 것을 알 수 있었다.



## Figure 2. DHT를 처리했을 때, 앞정강근과 항문올림근의 근육줄기세포는 상반된 반응을 한다.

(A-B) (Figure 1A)의 절차로 실험을 수행하였다. 앞정강근과 항문올림근을 냉동 절편하여 IHC를 하였다. 근육줄기세포의 증식을 보기 위해 다음과 같은 항체를 사용하였다. 근육줄기세포의 지표로 Pax7(빨강)을 사용하였고, 세포증식의 지표로 Ki67(초록)을 사용하였다. 화살표머리는 Pax7+/Ki67+, 화살표는 Pax7+/Ki67-를 가리킨다. Scale bar: 100 $\mu$ m

(C-D) (A-B)의 이미지를 바탕으로 분석하였다. Pax7+/Ki67+는 증식하는 근육줄기세포를, Pax7+/Ki67-는 분열하지 않는 근육줄기세포를 의미한다.

(E-F) (Figure 1A)의 절차로 실험을 수행하였다. 세포주기 조절자의 mRNA발현은 앞정강근에서 증가하고 항문올림근에서는 감소하였다.

### 3. DHT를 처리했을 때 항문올림근의 Notch

#### 신호전달체계는 활성화되지 않는다.

앞정강근의 근육줄기세포는 DHT에 의해 증식을 멈췄지만, 항문올림근의 근육줄기세포는 계속 증식한다는 것을 알아내었다.

골격근의 근육줄기세포는 Notch 신호전달체계를 통해 증식을 억제하고 휴면상태를 유지 한다고 보고되었다(Rajani M.George et al., 2013), (Mourikis P et al.,2012). 하지만 항문올림근은 분열을 멈추지 않았기 때문에 Notch의 활성화 여부를 확인하였다.

본 연구실에서는 선행연구를 통해 DHT를 처리하면 골격근의 근육줄기세포에서 Notch 지표유전자인 Hes1, Hes5, Hey1, HeyL의 발현이 증가하는 것을 알아내었다. 따라서, Notch 신호전달체계가 활성화 되었는지 확인하기 위해 Hes1, Hes5, Hey1, HeyL을 지표유전자로 정하여 실험하였다.

지표유전자의 발현을 비교하기 위해 quantitative real-time PCR을 진행하였다. 그 결과, DHT를 처리했을 때, 앞정강근에서 Notch 지표유전자의 발현이 증가했지만 항문올림근에서는 Notch 지표유전자의 발현이 증가하지 않았다. (Figure 3B) 따라서, DHT에 의해 골격근에서만 Notch 신호전달 체계가 활성화됨을 알아내었다.

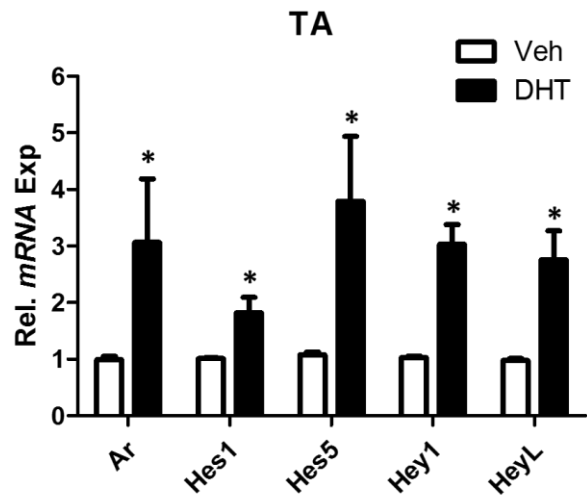
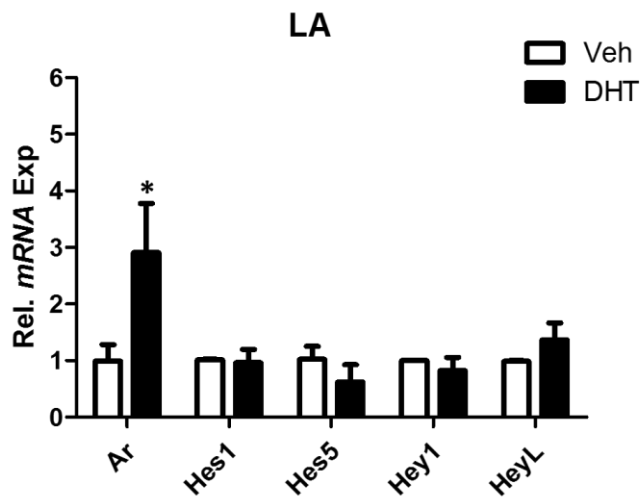
**A****B**



Figure 3. DHT를 처리했을 때, 항문올림근은 Notch  
지표 유전자의 발현이 증가하지 않는다.

(A-B) (Figure 1A)의 절차로 실험을 수행하였다. . DHT를 처리한 후,  
Notch 지표 유전자의 mRNA발현은 앞정강근에서 증가하고  
항문올림근에서는 변함이 없었다.

#### 4. 항문올림근은 DHT를 처리했을 때 Mib1의 발현이 앞정강근과 차이가 난다.

DHT에 의해 앞정강근은 Notch 신호전달 체계가 활성화 되지만, 항문올림근은 Notch 신호전달 체계가 활성화되지 않음을 알아내었다.

Notch 신호전달 체계는 다양한 상위조절자, 중간조절자, 리간드와 수용체가 관여한다고 알려져 있다(Freddy Radtke, 2013). 상위 조절자 중 하나인 Mib1은 리간드의 종류에 상관없이 Notch 신호전달체계를 조절한다고 보고되었다(Koo et al., 2005).

본 연구실에서는 선행연구를 통해 DHT를 처리하면 골격근의 근육줄기세포에서 Notch 상위조절자인 Mib1의 발현이 증가하는 것을 알아내었다. 또한 골격근에서 DHT 처리 하고 12시간~24시간 후의 지점에서 Mib1의 발현이 정점을 찍었다가 시간이 지날수록 감소하는 것을 관찰하였다. 따라서, DHT 처리하고 24시간후에 두 근육에서 Mib1이 발현되었는지 확인해 보았다. (Figure 4A)

DHT를 처리했을 때, 두 근육간 Mib1의 발현을 비교하기 위해 quantitative real-time PCR을 진행하였다. 그 결과 앞정강근은 DHT를 처리했을 때 Mib1의 발현이 확연히 증가하지만, 항문올림근에서는 Mib1의 발현이 유의미하게 증가하지 않았다. (Figure 4B, C)

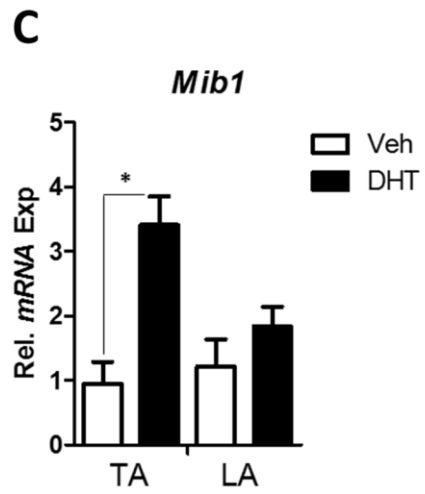
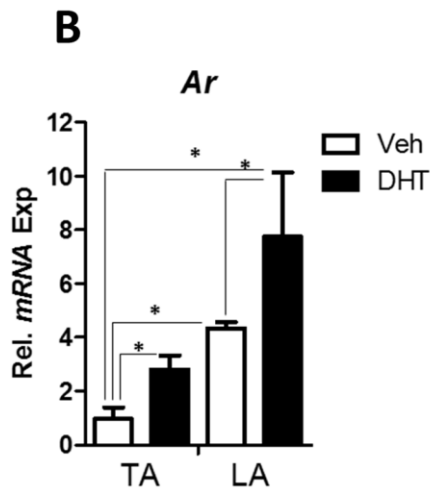
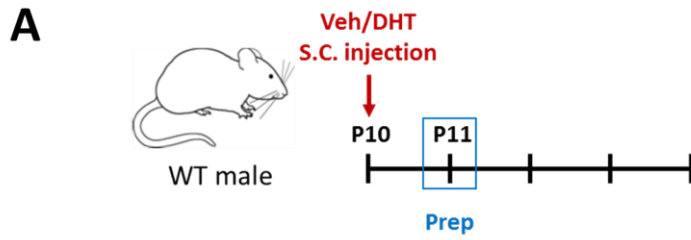


Figure 4. DHT를 처리했을 때, 항문올림근과  
앞정강근의 Mib1 발현이 차이난다.

(A) 앞정강근과 항문올림근의 근육줄기세포에서 DHT에 대한 반응 차이를 관찰하기 위해 DHT(0.1mg/마우스)를 피하주사 하였다. 근육줄기세포의 반응이 나타나는 시간을 고려하여 주사 후 1일 뒤에 마우스를 희생시키고 근육을 적출하여 분석하였다.

(B-C) (A)의 절차로 실험을 수행하였다. DHT를 처리했을 때, Mib1의 mRNA발현은 앞정강근에서는 증가하고 항문올림근에서는 통계적으로 유의미한 증가는 나타나지 않았다.

## VI. 고찰 (Discussion)

항문올림근은 발생학적으로 사지근육과 기원이 같다. 배아발생 과정에서, 체절에서 유래된 근아세포(myoblast)는 지아(limb bud)로 이동하여 사지를 구성하는데 일부가 배설강 쪽으로 이동하여 회음근을 형성한다고 보고되었다(Petr Valasek, 2004). 골격근과 기원이 같음에도 불구하고 항문올림근은 성호르몬에 민감한 특징을 가지는 독특한 근육조직이다. 성호르몬과의 연관성 때문에 과거의 호르몬과 근육의 연구들은 항문올림근을 대상으로 이루어졌다. 남성호르몬의 회음근의 비대화 현상을 보고하고 그 기작을 밝히는데 집중되어 있었다. 하지만 최근의 연구는 골격근을 대상으로 일반적인 근육의 특징을 밝히고자 하는 경향이라 과거의 회음근에 관한 연구와 충돌이 생긴다. 본 연구를 통해, 성호르몬을 처리했을 때 골격근과 회음근의 근육줄기세포의 반응을 비교하여 각 근육의 특성이 다름을 제시하고 그 기작을 밝히고자 하였다.

본 연구에서 DHT를 처리하였을 때, 항문올림근의 근육줄기세포는 계속 분열하지만 앞정강근은 증식을 멈추고 휴면상태로 전환됨을 알 수 있었다. 두 근육은 Notch 신호전달체계의 활성화 여부가 달랐고, 상위조절자인 Mib1의 발현도 차이가 나는 것을 관찰하였다. 항문올림근의 근육줄기세포가 DHT를 처리했음에도 분열상태인

것은 Mib1의 발현이 앞정강근에 비해 유도가 되지 않았고 따라서 Notch 신호전달 체계 역시 활성화 되지 않았기 때문임을 알 수 있었다.

본연구실에서는 골격근에서 Mib1 프로모터 지역에 AR 결합 부위가 존재하고 DHT를 처리했을 때, Ar과 폴리머레이즈가 결합부위에 결합함을 알아내었다. DHT를 처리했을 때, 항문올림근에서 Ar의 발현 유도는 일어나지만 Mib1의 발현은 증가하지 않는 것을 통해, Mib1 프로모터 지역이 응축되어있기 때문이라는 가능성을 기대해볼 수 있다. 이를 밝히기 위해 DHT를 처리한 후 항문올림근의 Mib1의 프로모터 지역으로의 Ar과 폴리머레이즈의 결합을 Chip-seq으로 분석하는 실험을 계획 할 수 있다. Ar과 폴리머레이즈의 결합이 나타나지 않는다면 Mib1 프로모터 지역의 응축이 결합을 억제하였기 때문이라고 예상해 볼 수 있다. 따라서 골격근과 회음근은 Mib1의 발현 유도 여부가 다를 뿐 Notch 신호전달 체계를 활성화 시킨다면, 항문올림근의 근육줄기세포도 휴면상태도 전환될 것으로 예상된다.

이러한 예측을 바탕으로 Cre<sup>ERT</sup> 형질 전환 마우스로 N1ICD를 근육줄기세포 특이적으로 과 발현시킨 모델을 연구에 이용할 수 있다. 항문올림근에서 Mib1의 발현 유도는 일어나지 않지만 Tamoxifen 주입으로 근육줄기세포에 Notch 신호전달을 활성화

시키면, 근육줄기세포가 휴면상태로 전환될 것으로 기대된다. 이를 통해, DHT에 의한 근육줄기세포의 휴면상태로의 전환에 Mib1의 발현 유도가 결정적임을 알 수 있을 것이다.

사춘기 이전의 레트에 인위적으로 Testosterone을 처리하거나 사춘기를 거치면서 내생적으로 Testosterone의 분비가 증가할 경우 항문올림근의 근육줄기세포는 증식이 촉진된다고 보고되었다(Yolaine Joubert, Christine Tobin and Marie Claude Lebart, 1994). 하지만 Testosterone에 의해 증가하는 항문올림근의 근육줄기세포 수가 성체가 되었을 때 다시 줄어들고 그 상태를 유지하는 현상에 대해 설명된 바 없고, 그 기작은 밝혀지지 않았다. 주령별로 앞정강근과 항문올림근의 분열-휴면 중인 근육줄기세포의 수를 비교해 봤을 때, 항문올림근도 앞정강근과 같이 결국엔 분열을 멈추고 모두 휴면상태로 전환된다(data not shown).

Cre형질 전환 마우스로 Mib1의 발현을 근섬유 특이적으로 억제시킨 모델을 연구에 이용할 수 있다. 본연구실에서는 MCK-Cre;Mib1<sup>ff</sup>마우스 모델의 근육줄기세포의 수 및 상태를 주령별로 분석한 결과 Mib1에 의해 휴면상태의 근육줄기세포의 수가 유지된다는 점을 알 수 있다. 항문올림근의 근육줄기세포수가 골격근의 근육줄기세포와 같은 기작을 통해 수가 유지될 것으로

예상된다.

종합해 보자면, DHT에 의해 앞정강근과 항문올림근의 근육줄기세포는 상반된 반응을 나타낸다. 골격근은 DHT에 의해 Mib1의 발현이 유도되고 Notch 신호전달 체계가 활성화된다. 그 결과, 근육줄기세포는 분열을 멈추고 휴면상태로 전환된다. 반면, 항문올림근은 DHT가 있어도 Mib1의 발현이 유도되지 않아 Notch 신호전달체계가 활성화되지 않고 계속 증식하게 된다. 하지만 사춘기이전 마우스의 회음근에서 Mib1의 발현이 유도되지 않는 이유와 성체 마우스의 회음근의 근육줄기세포가 골격근의 근육줄기세포와 같은 메커니즘이 적용되는지 보고된다 없다. 후속 연구로 Pax7-Cre<sup>ERT</sup>;ROSA N1ICD와 MCK-Cre;Mib1<sup>fl</sup> 형질전환 마우스의 분석을 통해 의문점을 밝힐 수 있을 것이라 기대해본다.



## VII. 참고문헌 (Reference)

Freddy Radtke et al(2013). Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nature Reviews* 13, 427-437.

Gori, Z., and Pellegrino,C.(1964). Ultrastructural observations on the atrophy by castration and on following regeneration caused by testosterone. *In "Proceedings, Third Europe. Reg. Conf. Electron Microsc," Vol. B, pp.83-84. Czech. Acad, Sci., Prague.*

Gori, Z., Pellegrino, m., and Pollera, M.(1969). The hypertrophy of levator ani muscle of rat induced by testosterone: An electron microscope study. *Exp. Mol. Pathol.* 10, 199-218.

Koo et al(2005). Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* 132, 3459-3470.

Mourikis P, et al(2012). A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* 30(2),243-252.

Petre Valasek et al(2004). A dual fate of the hindlimb muscle mass:

cloacal/perineal musculature develops from leg muscle cells. *Development* 132, 447-458.

Rajani M.George, et al(2013). Numb-deficient satellite cells have regeneration and proliferation defects. *PNAS* 110, 18549-18544.

Sengelaub DR, Forger NG(2008). The spinal nucleus of the bulbocavernosus: Firsts in androgen-dependent neural sex differences. *Horm Behav* 53, 596-612.

Yolaine Joubert and Christine Tobin(1989). Satellite cell proliferation and increase in the number of myonuclei induced by testosterone in the levator ani muscle of the adult female rat. *Developmental biology* 31, 550-557.

Yolaine Joubert, Christine Tobin and Marie Claude Lebart(1994).Testosterone-induced masculinization of the rat levator ani muscle during puberty. *Developmental biology* 162, 104-110.

Yolaine Joubert, Christine Tobin(1995).Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Developmental biology* 169, 286-294.

Yuan et al(2010).Functions of notch signaling in the immune system:

consensus and controversies. *Annual review of immunology* 28, 343-365

## VIII. Abstract in English (영문초록)

The Different response of Tibialis Anterior muscles and Levator Ani muscles to Dihydrotestosterone treatment

Sung-Hwan Bae

School of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

During postnatal muscle development, muscle mass increases in response to various conditions such as hormones, nutrient absorption and exercise. Among these factors, androgen plays significant roles in muscle growth. Previous reports revealed that androgen induces myofiber hypertrophy and satellite cell proliferation in perineal muscles. However, hindlimb muscles are different from perineal muscles which are sexually dimorphic. We found that in hindlimb muscles, satellite cells stop proliferating after Dihydrotestosterone

treatment suggesting testosterone acts via different mechanism in hindlimb muscles and perineal muscles. In this study, we examined what makes the different satellite cell responses following androgen treatments. We performed administration of Dihydrotestosterone into Postnatal 10day-old male mouse. In the results, Satellite cells of Tibialis Anterior muscles stop proliferating after Dihydrotestosterone treatment. In contrast, Satellite cells of Levator Ani muscles remain proliferation. It is reported that Notch signaling involved in conversion of proliferative satellite cell into quiescent satellite cell. To examine whether Mib1-Notch signaling is activated in Levator Ani muscles and Tibialis Anterior muscles, we performed quantitative real-time PCR. The expression of Mib1 and Notch target genes is induced only in Tibialis Anterior muscles. In conclusion, our results suggest that either induction of Notch signaling or not makes the different response of Tibialis Anterior muscles and Levator Ani muscles.

**Keywords:** Dihydrotestosterone, Satellite cell, Skeletal muscle, Perineal muscle, Notch

**Student number:** 2013-22955