저산소 환경의 지구성 운동이 근육 위성세포의 활성화 및 증식에 미치는 효과

임창현^{1,2}, 손희정³

¹한국체육대학교 스포츠과학연구소, ²McMaster University, Department of Kinesiology, ³경기스포츠과학센터

Treadmill Exercise Increases Muscle Satellite Cell Activation Independent of Oxygen Concentration in Rat

Chang-Hyun Lim^{1,2}, Hee-Jeong Son³

¹Human Physiology, Korea National Sport University, Seoul; ²Department of Kinesiology, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, ³Center for Sport Science in Gyeonggi, Suwon, Korea

PURPOSE: This study was performed to investigate the effect of hypoxia in conjugation with endurance exercise training on skeletal muscle satellite cell activity in rats.

METHODS: Sprague-Dawley rats (20 weeks, N=21) were randomly divided into Control (Con, n=7), normoxia exercise (NE, n=7), and hypoxia exercise (HE, n=7) groups. Exercise training was performed on a rodent treadmill at a frequency of 5 days/week for 4 weeks, with gradual increases in exercise intensity. The rats were sacrificed 48 hours following the last exercise session. We conducted immunohistochemistry and western-blot for evaluating satellite cell cycle in phenotype and protein levels.

RESULTS: Any groups did not increase body weight, muscle weight and cross-sectional area were not increased in any groups after 4 weeks ($p > .05$). Satellite cell proliferation improved in NE ($p = .001$) and HE ($p < .001$) groups. NE ($p = .028$) and HE ($p < .001$) groups significantly increased the number of centrally-located myonuclei compared to Con.

CONCLUSIONS: Treadmill exercise can induce satellite cell proliferation and differentiation regardless of oxygen partial pressure in the air, and increasing muscle metabolism efficiency is expected through muscle remodeling by satellite cell activation.

Key words: Hypoxia, Satellite cell, Treadmill exercise, Myonuclear, Central myonuclear

서론

골격근은 지속적으로 근 단백질의 합성과 분해가 일어나며, 합성과 분해의 비율에 따라 근육량의 증가 및 감소가 결정된다. 적절한 양의 근육을 유지하는 것은 근 기능과 인체의 신진대사를 유지하는 것과 매우 밀접한 관련이 있다. 근육량의 감소는 인슐린 저항성을 증가시켜 혈당조절능력을 저하시키며, 고지혈증, 고혈압 등 각종 대사성질환의

발병률을 증가시킬 뿐만 아니라 낙상 등 사망률과도 밀접하게 관련되어 있다[1,2].

성장기 이후 근육량의 증가를 위해서는 근육의 basal lamina와 sarcolemma 사이에 위치하고 있는 myogenic-specific 전구체인 위성세포(satellite cell)의 역할이 매우 중요하다. 평상시, 위성세포는 휴지기 상태(quiescent state)로 존재하고 있지만, 근 손상이나 운동과 같은 외부 자극(mechanical stress)에 의해 활성화된다[3]. 활성화된 위성세포는 골격근

Corresponding author: Hee-Jeong Son Tel +82-31-250-5712 E-mail son1106@ggsc.or.kr

Keywords 저산소, 드레드밀운동, 위성세포, 근핵, 중심 근핵

* 이 논문은 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2015S1A5B5A07043500).

Received 22 Oct 2018 Revised 19 Nov 2018 Accepted 29 Nov 2018

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 요구에 따라 증식(proliferation)과 분화(differentiation)의 과정을 거쳐 근모세포(myoblast) 및 근관세포(myotube)를 형성하고, 근섬유에 융합(fusion)됨으로써 골격근을 재생 및 성장시키게 된다[4]. 이 과정에서 골격근은 위성세포로부터 추가적인 핵을 제공받으므로 외부자극에 대한 골격근의 전사능력(transcriptional capacity)이 향상된다[5]. 위성세포는 각 주기마다 특징적인 myogenic transcription factors (MRFs; MyoD, myf5, myogenin, MRF4)를 발현하게 된다. MRFs 중 MyoD와 myogenin은 각각 위성세포의 증식과 분화 단계에 활발하게 발현되어 위성세포의 주기를 확인할 수 있는 적절한 biomarker로 사용된다[3].

지금까지 여러 선행연구들은 위성세포의 활성을 유도하는 다양한 요인들을 검증해 오고 있다. 그중 운동은 위성세포의 활성을 가장 효과적으로 유도하는 요인 중 하나로 근육의 성장 및 재생에 매우 밀접한 관련이 있음이 보고되었다[6-8]. 위성세포는 일회성 또는 장기간의 고강도 저항성운동 시 활발한 증식과 분화를 나타내었고[9-11], 장기간 부동화(immobilization)에 의한 근위축 시 정상인에 비해 위성세포의 수가 유의하게 줄어든 것이 보고되었다[12,13]. 또한 Verdijk et al. [14]은 노인성 근감소증(sarcopenia) 시 급격하게 나타나는 Type II 섬유의 근 위축이 유의하게 감소된 Type II 섬유의 위성세포 수와 동반됨을 보고함에 따라 골격근 내 위성세포의 숫자와 근육량 사이의 상관관계를 확인할 수 있었다. 이처럼 위성세포는 골격근의 재생에 필수적이며 위성세포를 조절하는 요인들을 연구하는 것은 근육량의 감소로 인한 문제점들을 해결할 수 있는 새로운 방안으로 제시될 수 있다. 그러나 지금까지 선행연구들은 주로 운동과 같은 기계적 자극(mechanical stimulation)에 의한 위성세포의 반응에 대해 연구하였고, 위성세포를 효과적으로 활성화시키기 위한 환경적 요인들에 대한 연구는 거의 없다.

다양한 환경적 요인들 중 저산소 환경은 주로 고지대에서 높아지는 고도에 따른 공기 내 산소분압의 감소에 의해 나타난다. 인체가 저산소 환경에 노출되면 공기 내 낮아진 산소분압으로 인해 동맥혈의 산소포화도가 감소되고 이로 인해 에너지의 생성 및 공급에 장애가 생기는 초기반응이 나타나게 된다. 그러나 장기간 저산소 환경에 노출되면 낮아진 산소분압에 대한 다양한 세포의 변화 및 적응 현상이 유도된다[15,16]. 최근 선행연구들은 저산소 환경이 MyoD의 발현량을 증가시켜 위성세포의 자가재생(self-renewal)과 증식을 촉진할 가능성을 제기하였다[17,18]. 증가된 위성세포의 증식은 잠재적으로 골격근의 성장 및 회복능력이 향상되어 있음을 의미한다[19]. 반면, 저산소 환경이 위성세포의 증식과 자가재생은 증가시키지만 최종적으로 근 성장 및 재생을 위한 분화를 유도하는 myogenin의 발현을 억제시킨다는 연구들도 보고되었다[19]. 따라서 저산소 환경이 위성세포의 주기에 영향을 미치고 있음은 분명하지만 결론적으로 다소 일치되지 않는 결과들이 보고되었다. 지금까지 운동분야에서 저산소 환경에 대한 연구들은 고지훈련과 관련된 새로운 운동방법들을 적용하여 운동수행 능력을 향

상시키는 것을 중점으로 진행되었고, 세포의 증식이나 분화와 같은 세포주기에 대한 연구는 거의 없다. 따라서 복합적인 요인들이 작용되는 in vivo 상황에서 운동과 저산소 환경이 위성세포의 세포주기에 미치는 영향에 대한 연구는 골격근의 대사를 이해하기 위한 새로운 측면의 결과를 제시할 수 있을 것이며, 위성세포를 활용한 효과적인 근 성장 및 회복의 운동법을 제안할 수 있을 것이다.

따라서 저산소 환경에서의 지구성 운동 훈련이 골격근에 미치는 영향을 확인하기 위해 근 횡단면적과 근 핵 등 골격근의 형태학적 분석을 실시할 것이며, 위성세포 수의 변화와 MyoD, myogenin의 발현 정도를 확인함으로써 위성세포의 활성 정도를 분석할 것이다.

연구 방법

1. 실험 동물

이 연구에 사용된 실험동물은 20주령 수컷 Sprague-Dawley rat이며, 실험기간 중 질병이나 이상체중을 보이는 동물은 실험 대상에서 제외하였다. 실험동물은 그룹별로 한 cage당 2마리씩 사육하였고, 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도(50-60%), 조명(12/12시간; light-dark cycle)을 유지하였다. 실험동물을 위한 식이는 탄수화물 67.5%, 지방 11.7%, 단백질 20.8%로 구성된 동물 사료를 사용하였다. 실험동물에 대한 사육과 희생 등 모든 절차는 한국체육대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인받은 후 실시되었다(KNSU-IACUC-2017-08).

2. 실험설계 및 분석방법

1) 실험설계

저산소 환경과 지구성 운동 훈련이 골격근의 성장 및 위성세포의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 통제집단(Control group, Con; n=7), 정상환경 운동집단(Normoxia exercise group, NE; n=7), 저산소 환경 운동집단(Hypoxia exercise group, HE; n=7)으로 집단을 분류하였다. 지구성 운동 훈련은 정상환경과 저산소 환경으로 환경을 다르게 하여, 4주간 점진적으로 운동 강도를 증가시키며 트레드밀 운동을 실시하였다. 저산소 환경은 감소한 산소분압에 의해 산화적 대사와 밀접한 관련이 있기 때문에 지구성 운동을 실시하였다. 마지막 운동 후 48시간에 실험동물을 희생하여 필요한 조직들을 샘플링하였다. HE 집단은 운동 시에만 저산소 환경에 노출시켰다. 실험설계는 Fig. 1과 같다.

2) 저산소 환경조성

저산소 환경의 조성은 동물용 Normobaric hypoxia Chamber (b-CAT, Netherlands)를 이용하였으며, 고도설정은 3,000 m로 고도에 의한 압력은 변화 없이 산소농도가 14.6%가 유지되도록 조절하였다.

Fig. 1. Experimental design.

3) 지구성 운동

4주간 지구성 운동 수행을 위해 실험동물용 트레드밀(DJ2-242, Dual Treadmill Daejong, Ltd, Korea)을 사용하였으며 운동방법은 Bedford et al. [20]의 방법에 근거하였다. 운동훈련 시작 전 1주일간 본 운동의 50% 수준으로 10분간 사전적응 훈련을 시행하였다. 본 운동 시, 운동 강도는 최대산소섭취량의 50%인 8 m/min의 속도로 시작하여 최대산소섭취량의 70%인 23 m/min의 속도까지 점증적으로 증가시켰고, 운동시간도 30분에서 60분까지 4주간 순차적으로 증가시켰다. 저산소 환경의 운동집단은 운동 시에만 저산소 Chamber 안에서 고도 3,000 m에 해당되는 산소 분압에 노출된 상태로 운동을 수행하였다.

4) 실험동물의 희생과 조직 적출

4주간의 훈련이 종료되면 마지막 운동의 48시간 후 실험동물을 희생하였다. 실험동물은 이산화탄소를 이용하여 일시적으로 마취시킨 후 실험에 사용될 가자미근을 적출하였다. 적출된 가자미근의 일부는 근육의 형태학적 분석을 위해 OCT compound (Tissue Tek; Sakura Finetek Europe B.V, Zoeterwoude, Netherlands)로 전처리하였고, 일부는 단백질의 발현 정도를 분석하기 위해 액화질소에 급속 냉동시킨 뒤 조직을 이용한 실험이 진행되기 전까지 -80℃에 보관하였다.

5) SDS-PAGE

단백질의 정량을 위하여 급속 냉동시켜두었던 sample을 lysis buffer (25 mM Tris-Cl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 5 mM dithiothreitol [DTT])에 4℃ 유지된 상태에서 2시간 화학적 작용을 유도한 뒤 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액(total cytosol fraction)은 정량과정을 거친 후 2X SDS loading buffer (60 mM tris pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue)를 첨가하였다. 위와 같이 준비된 각각의 sample은 separating gel (30% acrylamide, 1.5 M tris pH 8.8, 10% Ammonium persulfate, TEMED)과

stacking gel (30% acrylamide, 1 M tris pH 6.8, 10% Ammonium persulfate, TEMED)에 분주하였으며, Standard marker (SDS-PAGE Molecular Weight Standard, BioRad)와 함께 80 V에서 전기영동을 실시하였다.

6) Western blot

전기영동이 마쳐지면, separating gel에 존재하던 단백질을 Nitrocellulose Blotting Membrane (Life science, Germany)으로 전사하기 위하여 Transfer buffer (190 mM glycine, 50 mM Tris-base, 0.05% SDS, 20% methanol)와 함께 80 V로 90분간 다시 전기영동을 실시한다. 단백질의 이동이 완료된 membrane은 90분 동안 5% BSA 용액(10 mM Tris-base, HCl-pH 7.6, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween20)에서 Blocking시킨 후 MyoD (sc-71629, Santa Cruz, CAL, USA)와 myogenin (sc-12732, Santa Cruz, CAL, USA), b-actin (sc-47778, Santa Cruz, CAL, USA) 1차 항체를 blocking 용액과 1:1,000의 농도로 4℃에서 incubation시켰다. 1차 항체incubation이 완료되면 TBS-T 용액으로 충분히 washing한 후 2차 항체(goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz, CAL, USA; Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 81-1620, ZYMED, CA, USA)를 5% skim milk용액과 1:5,000의 농도로 90분간 incubation시켰다. 항체의 작용이 완료되면, TBS-T용액을 이용하여 충분히 washing 한 후 WBRL solution (Luminata Crescendo Western HRP Substrate, Millipore, USA)으로 단백질을 발색시키고 이미지 분석 시스템(Molecular Imager ChemiDoc XRS System, Bio-Rad, USA)으로 촬영한 뒤 각 sample의 단백질량을 분석하였다(Quantity One 1-D Analysis Software, Bio-Rad, USA).

7) Immunohistochemistry

골격근의 형태학적 분석을 위해 OCT 처리되어 보관중인 sample들을 10 μm 두께로 얇게 횡단절편을 낸 후 4% paraformaldehyde에 5분간 고정시켰다. 0.1 M PBS를 사용하여 근육 횡단절편을 세척한 후 -20℃에서 100% methanol에 10분간 담가두었다가 10% donkey serum (D9663, Sigma, USA)과 0.1% triton X-100을 섞어 만든 reagent로 상온에서 block-

ing하였다.

1차 안티바디는 휴지기 상태인 위성세포의 수를 확인하기 위하여 Pax7 (MAB 1675, R&D systems, USA)을 사용하였고, 횡단면적을 측정하기 위해 rabbit anti-laminin antibody (L9393, Sigma, USA)를 사용하였다. 1차 안티바디는 1% Bovine Serum Albumin (BSA, BSA100, BOVO-GEN, Australia)과 0.1% tiriton X-100을 포함한 0.1 M PBS에 1:100 비율로 희석시켜 4°C에서 sample과 함께 overnight하였다. Overnight 후 2차 안티바디로 Alexa fluor 594 donkey anti-rabbit IgG antibody (MOP-A-21207, Life technologies, USA)와 Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG antibody (MOP-A-21202, Life technologies, USA)를 사용하여 상온에서 4시간 동안 incubation시켰다. 2차 안티바디의 incubation이 마쳐지면, 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)이 포함된 VECTASHIELD mounting medium (H-1200, VECTOR, USA)을 이용해 mounting하였다. 각 실험 절차 간에, sample은 0.1 M triton-PBS로 10분 동안 세 번씩 immersing하여 세척하였으며, 착색 이미지는 LEICA TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystem, Germany)의 Diode laser (405 nm wave-

length)와 OPSL laser (488 nm, 552 nm wavelength)를 사용하여 관찰하였다. Mackey et al. [8]의 연구결과와 같이 위성세포와 근 핵의 개수는 OCT 처리된 sample을 양끝과 중간부분으로 3등분하여 각 부분에서 2-3개의 절편을 얻어 개체 당 200개 이상의 근섬유를 분석하였다.

3. 자료처리 및 통계

실험을 통해 얻어진 결과들은 SPSS/PC+Version 18.0 프로그램을 사용하여 평균과 표준편차를 산출한 뒤 각 집단 간 차이를 검증하기 위하여 일원변량분석(One-way ANOVA)을 적용하였다. 사후 검증은 Tukey HSD 방법을 사용하였고, 가설의 수락 수준은 $\alpha = .05$ 로 설정하였다.

연구 결과

1. 체중 및 근육량의 변화

4주간 집단별 처치에 따른 체중의 변화를 살펴본 결과, Con 집단이 NE와 HE 집단에 비해 시기에 따라 증가하는 경향은 있었지만 집단

Fig. 2. Change of body weight (A) and soleus muscle weight (B). Con, Control group; NE, Normoxia exercise group; HE, Hypoxia exercise group.

Fig. 3. Immunohistochemical image (A) and change of cross-sectional area (B). Red line, laminin; Con, Control group; NE, Normoxia exercise group; HE, Hypoxia exercise group. Scale bar=100 μm .

간 시기에 따른 차이가 없었으며($p>.05$), 집단 내에서도 시기에 따른 차이는 나타나지 않았다($p>.05$)(Fig. 2A). 4주간 처치 후 가자미근의 근육량은 집단 간 차이가 없었다(Con: 0.192 ± 0.02 , NE: 0.196 ± 0.034 , HE: 0.195 ± 0.02 , $p>.05$)(Fig. 2B).

2. 골격근의 횡단면적(Cross-sectional area)

4주간 집단별 처치 후 가자미근의 횡단면적은 Con ($4,560 \pm 653.8 \mu\text{m}^2$), NE ($4,692.7 \pm 401.5 \mu\text{m}^2$), HE ($4,702.6 \pm 332.9 \mu\text{m}^2$), 집단 간 차이가 없었다($p>.05$)(Fig. 3).

3. 근 핵(Myonuclear)

4주간 집단별 처치 후 가자미근의 단일 근섬유당 근 핵의 수는 Con (4.82 ± 0.75) NE (5.21 ± 1.0) HE (5.63 ± 0.78), 집단 간 차이가 없었다($p>.05$)(Fig. 4A, B). 근 핵 당 근섬유의 지배영역(myonuclear domain)은 NE ($862.51 \pm 122.2 \mu\text{m}^2$)와 HE ($842.93 \pm 71.1 \mu\text{m}^2$) 집단이 Con ($998.7 \pm 143.3 \mu\text{m}^2$) 집단에 비해 감소되는 경향을 나타내었으나 차이가 없었다($p>.05$)(Fig. 4C). 근 섬유의 세포질 가운데 핵이 위치하는 central nuclear는 Con 집단에 비해 NE (251%, $p=.028$)와 HE (361%, $p<.001$)가 유

의하게 증가되었다(Fig. 4D).

4. 위성세포(Satellite cell)

4주간 집단별 처치 후 가자미근의 단일 근섬유당 위성세포의 수는 Con 집단에 비해 NE (180%, $p=.001$)와 HE (200%, $p<.001$) 집단이 유의하게 증가하였다(Fig. 5A, B). 근 핵 당 위성세포의 수는 Con 집단이 NE (163%, $p=.001$)와 HE (184%, $p<.001$) 집단에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 5C).

5. MyoD, myogenin 단백질 발현

4주간 집단별 처치 후 가자미근의 MyoD 단백질 발현은 Con 집단에 비해 NE (138%, $p=.013$)와 HE (134%, $p=.03$) 집단이 유의하게 증가하였다(Fig. 6A). 가자미근의 myogenin 단백질 발현은 HE (115%, $p=.048$) 집단만이 Con 집단에 비해 유의하게 증가되었다(Fig. 6B).

논 의

이 연구의 주요결과는 4주간 트레드밀 훈련이 골격근의 무게와 횡

Fig. 4. Immunohistochemical image of myonuclear (A) and change of the number of myonuclear (B), myonuclear domain (C) and central nuclei (D). Red line, laminin; Blue dots, myonuclei; Yellow arrow, central nuclear; Con, Control group; NE, Normoxia exercise group; HE, Hypoxia exercise group. * $p<.05$, significant difference from Con; ** $p<.001$, significant difference from Con. Scale bar=100 μm .

Fig. 5. Immunohistochemical image of quiescent satellite cell (A) and change of the number of quiescent satellite cell (B) and ratio of satellite cell per myonuclear (C). Red line, laminin; Yellow circle and green dot, quiescent satellite cell; Con, Control group; NE, Normoxia exercise group; HE, Hypoxia exercise group. * $p < .05$, significant difference from Con; ** $p < .001$, significant difference from Con. Scale bar=100 μ m.

Fig. 6. MyoD (A) and myogenin (B) protein expression. Con, Control group; NE, Normoxia exercise group; HE, Hypoxia exercise group. * $p < .05$, significant difference from Con.

단면적의 증가를 유도하지는 못하였지만 정상환경과 저산소 환경 집단 간 차이 없이 위성세포의 증식을 유도하였으며, 위성세포의 분화에 의한 central nuclear의 유의한 증가를 나타냈다.

위성세포는 골격근 내에 존재하는 줄기세포로 골격근의 재생 및 성장에 상당한 역할을 담당하고 있다. 안정기의 위성세포는 운동과 같은 외부자극에 의해 활성화되고 활성화된 위성세포는 증식과 분화의 단계를 거쳐 골격근의 대사에 밀접하게 관여한다[9]. 일반적으로 위성세포의 증식은 개체 수를 증가시킴으로써 즉각적으로 골격근의 요구에

따라 분화의 단계로 돌입하거나, 분화되지 않고 휴지기 상태로 돌아가는 자가재생(self-renewal)으로 많은 수의 위성세포를 보유하게 된다. 위성세포의 수가 증가된 것은 잠재적으로 골격근 대사에 참여할 수 있는 myonuclei로 differentiation될 source가 증가되었음을 의미한다[21]. NE와 HE 집단은 4주간 처치에 의해 Con 집단보다 위성세포 수가 유의하게 증가되었다(Fig. 5B). 또한 위성세포의 증식단계에서 발현되는 MyoD의 발현량이 4주간의 운동 후 NE와 HE 집단에서 활발한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6A). 이 결과들은 운동이 실시되는 환경에 상관

없이 4주간 실시된 트레드밀 운동 훈련에 의해 위성세포를 활성화시키기에 충분하였음을 나타낸다. 따라서 NE와 HE 집단 간의 증가된 위성세포의 수는 Con 집단에 비해 잠재적으로 골격근의 재생 및 성장이 증가되었음을 의미한다. Koning et al. [22]은 *in vitro* 실험을 실시함으로써 배양된 위성세포가 저산소 환경에 노출되자 MRFs 중 MyoD의 발현을 증가시키며 증식이 촉진됨을 보고하였다. 따라서 저산소 환경에서 위성세포가 더욱 빠르게 근섬유로의 성장을 유도할 수 있음을 주장하였다. 그러나 이 연구결과는 NE 집단과 HE 집단 간의 위성세포의 수와 MyoD 단백질 발현량에 통계적인 차이가 없었다. 독립적인 저산소 환경의 영향을 확인할 수 있는 집단이 없었다는 제한점이 존재하지만, 저산소 환경에 노출된 상태로 운동을 수행할 경우 위성세포의 증식에 저산소 환경이 미치는 추가적인 영향은 확인할 수 없었으며 운동이라는 절대적인 자극에만 영향받고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

4주간 집단에 따른 처치 후 각 집단 간 체중, 가자미근의 무게 및 횡단면적에 차이가 없었다(Figs. 2, 3). 일반적으로 지구성 운동은 미토콘드리아의 생합성, 융합, 분열 등을 통한 산화적 능력을 향상시키기 위해 실시되며[23], 골격근의 비대와 근력 증가를 위해 저항성 운동이 수행된다[24]. 이 연구에서 실시된 4주간의 트레드밀 운동은 위와 같은 운동의 특성에 따라 골격근의 비대를 유도하지 못하였다. 그러나 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 Con 집단이 NE와 HE 집단에 비해 체중이 증가된 경향이 나타났음에도 불구하고 세 집단의 가자미근의 무게와 횡단면적이 유사하였다. 이것은 운동환경과는 상관없이 4주간의 트레드밀 운동이 Con 집단에 비해 신체조성의 제지방량이 증가되었을 가능성을 제시할 수 있다. Kayser et al. [25]은 저산소 환경에 장기간 노출 시 근육은 원활하지 않은 산소공급을 보완하기 위하여 모세혈관의 증가와 함께 근육량이 감소(atrophy)되는 현상이 나타남을 주장하였다. 그러나 이 결과를 통하여 저산소 환경에서의 트레드밀 운동은 저산소 환경의 노출에 의한 근육량 감소 현상을 상쇄시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 지구성 운동과 저항성 운동은 운동의 방법에 따라 나타나는 적응현상에 특수성을 지니고 있음이 분명하다. 이미 여러 연구에서 서로 상호 보완되는 다양한 결과들을 보고하고 있으며[26,27], 운동 방법에 상관없이 골격근의 합성과 분해 즉, 순회전율(turnover)이 증가되었음을 주장하고 있다[28]. 따라서 세 집단 간 절대적인 골격근량과 근 횡단면적에는 차이가 없을지라도 NE와 HE 집단은 트레드밀 운동에 의해 골격근을 구성하고 있는 구성물질들은 새롭게 재구성(remodeling)되었을 가능성이 있다. 이 연구의 근 핵 결과는 이를 뒷받침하고 있다. 일반적으로 근 핵은 더 이상 분열하지 않는 post mitotic 기관이다. 따라서 온전히 위성세포의 분화에 의존하여 근 핵의 수를 증가시킬 수 있다[29]. 또한 하나의 근 핵이 지배할 수 있는 세포질의 영역이 한정되어 있기 때문에 근육량이 증가될 경우 추가적인 근 핵의 요구가 동반되게 된다(ceiling theory) [30]. 4주간 집단에 따른 처치 결

과 집단 간 근 횡단면적에 차이가 없었다(Fig. 3). 이에 따라 근 핵의 숫자(Fig. 4B)와 근 핵의 지배영역(Fig. 4C)에도 차이가 없었다. 그러나 위성세포의 분화에 의해 증가되는 central nuclear의 수가 NE와 HE 집단에서 Con 집단에 비해 유의하게 증가된 것을 확인하였다(Fig. 4D). Central nuclear는 근육의 손상이나 성장의 요구에 의하여 위성세포가 분화하여야만 생겨나는 위성세포 대사의 중요한 biomarker이며 근 핵이 추가되는 유일한 방법이다. Jonassie et al. [31]은 지구성 운동 형태의 훈련을 실시할 경우 위성세포의 활성 marker인 ki-67, MyoD의 발현이 증가하며, 근 비대나 근 핵 수의 증가 없이도 증가된 위성세포의 분화(pax7-/MyoD+)를 보고하였다. 이처럼 NE와 HE 집단에서 Central nuclear의 숫자가 Con 집단에 비해 2배 이상 증가했음에도 불구하고 근 횡단면적과 근 핵의 전체 숫자에는 변화가 없었음은 근 비대와 상관없이 위성세포의 활성으로 인해 이전의 근 핵들이 새로운 근 핵으로 교체되었을 가능성을 제시해 주며 이는 골격근의 재구성(remodeling)을 강력하게 뒷받침하고 있다[31,32]. 이렇게 새롭게 생겨난 근 핵들은 근육의 요구에 따른 전사(transcription)과정에 더욱 효율적으로 참여하게 된다[5].

마지막 운동 48시간 후 위성세포의 분화 단계에서 발현되는 myogenin 단백질은 NE 집단이 Con과 HE 집단에 비해 유의하게 증가되었다(Fig. 6B). 이 결과는 위성세포뿐만 아니라 조직 전체에서 발현되는 결과이기 때문에 위성세포 주기만의 결과로 제한할 수는 없지만 마지막 운동 후 48시간의 시점에 NE 집단의 위성세포 분화 정도가 Con과 HE 집단에 비해 증가되었을 가능성이 있다. Central nuclear 결과를 통해 HE 집단은 NE집단과 같이 4주간의 훈련으로 위성세포의 분화가 일어났음은 분명하다. 그러나 운동 후 48시간의 시점에는 NE 집단에 비해 myogenin 발현량이 낮음에 따라 위성세포의 분화 주기에 차이가 있을 가능성을 제시해준다. 일반적으로 위성세포는 증식단계 후 분화 단계를 거쳐 근섬유로 융합되거나 분화단계를 거치지 않고 다시 휴지기의 위성세포로 돌아오는 자가재생의 과정을 선택적으로 거치게 된다[19]. Wei et al. [19]은 위성세포를 배양하여 *in vitro* 실험을 실시한 결과 저산소 환경의 노출은 위성세포의 myogenin 발현을 억제하여 증식된 위성세포의 분화를 억제하고, myoblast로의 분화에 작용되는 mir-1과 mir-206의 감소를 통한 Pax7의 증가를 유도하여 위성세포의 자가재생을 촉진시킨다고 보고하였다. 선행연구 결과와 같이 4주간의 훈련 후 저산소 환경에서의 낮은 myogenin 단백질 발현량이 저산소 환경에 의한 위성세포의 자가재생 촉진인지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하지만 마지막 운동 후 48시간 시점에 정상환경과는 다른 myogenin 발현 형태를 확인할 수 있었다.

지금까지 저산소 환경이 위성세포에 미치는 영향에 대한 선행연구들은 대부분 배양된 세포를 이용하여 *in vitro* 실험으로 진행되었다. 따라서 다양한 대사 요인들이 복합적으로 작용하는 *in vivo* 연구를 통

하여 저산소 환경과 운동이 위성세포에 미치는 영향을 확인하기 위한 추가적인 연구가 많이 필요한 실정이다.

결론

종합해 보면 4주간 정상 환경과 저산소 환경에서의 트레드밀 운동은 골격근의 비대를 유도하지는 못하였지만 위성세포의 충분한 증식과 분화를 증가시켰으며, 위성세포의 증가된 분화는 골격근 구성요소들의 재구성을 통해 골격근의 대사를 향상시켰을 것으로 기대된다. 위성세포의 주기를 확인하기 위한 최적의 방법으로 분석하지 못했다는 제한점이 있지만 저산소 환경에서의 운동은 정상환경에 비해 위성세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 예상되며, 운동의 환경과는 상관없이 운동자극에 의해 위성세포의 활성이 조절됨을 확인할 수 있었다.

CONFLICT OF INTEREST

이 논문 작성에 있어서 어떠한 조직으로부터 재정을 포함한 일체의 지원을 받지 않았으며, 논문에 영향을 미칠 수 있는 어떠한 관계도 없음을 밝힌다.

REFERENCES

- Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, Rosenberg IH, Roubenoff R. Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol*. 2004;159(4):413-21.
- Nair KS. Aging muscle. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(5):953-63.
- Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*. 2013;93(1):23-67.
- Bentzinger CF, von Maltzahn J, Rudnicki MA. Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(3):27.
- Blaauw B, Reggiani C. The role of satellite cells in muscle hypertrophy. *J Muscle Res Cell Motil*. 2014;35(1):3-10.
- Crameri RM, Aagaard P, Qvortrup K, Langberg H, Olesen J, et al. Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *J Physiol*. 2007;583(Pt 1):365-80.
- Mikkelsen UR, Langberg H, Helmark IC, Skovgaard D, Andersen LL, et al. Local NSAID infusion inhibits satellite cell proliferation in human skeletal muscle after eccentric exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(5):1600-11.
- Mackey AL, Kjaer M, Charifi N, Henriksson J, Bojsen-Moller J, et al. Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle biopsies. *Muscle Nerve*. 2009;40(3):455-65.
- Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, Wiswell RA. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve*. 2006;33(2):242-53.
- Shefer G, Rauner G, Stuelsatz P, Benayahu D, Yablonka-Reuveni Z. Moderate-intensity treadmill running promotes expansion of the satellite cell pool in young and old mice. *FEBS J*. 2013;280(17):4063-73.
- Snijders T, Verdijk LB, Hansen D, Dendale P, van Loon LJ. Continuous endurance-type exercise training does not modulate satellite cell content in obese type 2 diabetes patients. *Muscle Nerve*. 2011;43(3):393-401.
- Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem Cell Biol*. 1999;111(3):189-95.
- Nierobisz LS, Cheatham B, Buehrer BM, Sexton JZ. High-content screening of human primary muscle satellite cells for new therapies for muscular atrophy/dystrophy. *Curr Chem Genom Transl Med*. 2013;7:21-9.
- Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, et al. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(1):E151-7.
- Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, et al. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 2001;15(21):2865-76.
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997;277(5332):1669-72.
- Flann KL, Rathbone CR, Cole LC, Liu X, Allen RE, et al. Hypoxia simultaneously alters satellite cell-mediated angiogenesis and hepatocyte growth factor expression. *J Cell Physiol*. 2014;229(5):572-9.
- Urbani L, Piccoli M, Franzin C, Pozzobon M, De Coppi P. Hypoxia increases mouse satellite cell clone proliferation maintaining both in vitro and in vivo heterogeneity and myogenic potential. *PLoS One*. 2012;7(11):e49860.
- Liu W, Wen Y, Bi P, Lai X, Liu XS, et al. Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation. *Development*. 2012;139(16):2857-65.
- Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1979;47(6):1278-83.
- Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles

- of growing rats. *Anat Rec.* 1971;170(4):421-35.
22. Koning M, Werker PM, van Luyn MJ, Harmsen MC. Hypoxia promotes proliferation of human myogenic satellite cells: a potential benefactor in tissue engineering of skeletal muscle. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(13-14):1747-58.
23. Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, et al. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J Physiol.* 2008;586(15):3701-17.
24. McDonagh MJ, Davies CT. Adaptive response of mammalian skeletal muscle to exercise with high loads. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1984;52(2):139-55.
25. Kayser B. Nutrition and energetics of exercise at altitude. Theory and possible practical implications. *Sports Med.* 1994;17(5):309-23.
26. Coffey VG, Hawley JA. Concurrent exercise training: do opposites distract? *J Physiol.* 2017;595(9):2883-96.
27. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell.* 2014;159(4):738-49.
28. Shamim B, Hawley JA, Camera DM. Protein availability and satellite cell dynamics in skeletal muscle. *Sports Med.* 2018;48(6):1329-43.
29. Cheek DB. The control of cell mass and replication. The DNA unit--a personal 20-year study. *Early Hum Dev.* 1985;12(3):211-39.
30. Petrella JK, Kim JS, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(5):E937-46.
31. Joannis S, McKay BR, Nederveen JP, Scribbans TD, Gurd BJ, et al. Satellite cell activity, without expansion, after nonhypertrophic stimuli. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309(9):R1101-11.
32. Joannis S, Gillen JB, Bellamy LM, McKay BR, Tarnopolsky MA, et al. Evidence for the contribution of muscle stem cells to nonhypertrophic skeletal muscle remodeling in humans. *FASEB J.* 2013;27(11):4596-605.