

심장내피세포 골격단백의 배열 양상 ; monoclonal antibodies를 이용한 조사

영남대학교 의과대학 해부학교실

김한철 · 송인환 · 이웅창

서 론

세포골격단백은 진핵세포의 세포질에 널리 퍼져있는 단백질사의 망상구조로서 세포의 모양유지, 운동 그리고 세포소기관의 이동 등에 관여한다. 이러한 골격단백은 서로 다른 단량체로 구성된 microfilament, microtubule, intermediate filament의 세 종류의 기본적 단백질사로 구성이 되며 세포종류와 상태에 따라 분포양상 및 기능이 달라진다.

Microfilament의 대표적 성분인 actin은 근섬유의 구성성분으로 잘 알려져 있으며 세포막 아래에 위치하는 actin 섬유는 세포피질을 형성하여 세포막의 모양 변화와 세포의 운동을 가능하게 한다.¹⁻³⁾ 또한 세포질내에 존재하는 actin섬유는 망상 구조를 취하여 세포질의 교절화를 유지시키고 있다.⁴⁻⁵⁾ 이러한 actin은 항상 동일한 상태로 유지되는 것이 아니라 세포의 상태나 외부 환경에 따라 그 양상이 변하게 된다. 그 예로서 운동성이 활발한 내피세포에서 섬유형태의 actin이 세포질내에서 증가하였으며 운동성이 떨어지면 섬유형태의 actin이 감소한다고 하였다.⁶⁾ 또한 cytochalasin 같은 약제를 투여하면 actin 단량체의 중합과정을 방해하여 섬유 형태의 actin이 감소되고 운동성이 소실된다고 한다.⁷⁾

Microtubule은 tubulin의 중합체로 형성된 관모양의 구조를 가진 섬유사이다. 잘 알려진 cilia와 flagella는 microtubule로 구성된 구조물이며 이 외에도 microtubule은 세포질내에서 centrosome에서부터 방사형으로 전 세포질내로 퍼져 나가서 세포의 운동, 모양조절 그리고 세포소기관의 이동로의 역할을 수행하고 있다.⁸⁻¹²⁾ 현재 tubulin 단량체의 중합과정에 영향을 미치는 약물을 이용하여 microtubule의 성장과 생성, 분포 그리고 역할에 대한 많은 연구가 되어 오고 있다. 이 중 colchicine은 세포분열의 중기에서 나타나는 mitotic spindle의 생성을 방해하여 mitosis를 중단시키는 약제로 염색체 연구에 많이 사용되고 있다.

세포질의 microtubule의 배열은 극성화를 가지며 성장해 가는 방향으로 tubule이 자라나간다고 한다. 또한 세포가 성숙되면서 이러한 tubule로 고착화 된다고 한다.¹³⁻¹⁵⁾ 이처럼 골격단백은 고정화된 골격구조가 아니라 세포의 상태와 외부적 요인에 따라 구조와 양상이 변화하는 역동적인 것으로서 변화해가는 세포의 상태를 잘 반영해 주고 있다.

내피세포는 순환계 장기의 전 내면을 덮고 있으면서 혈액과 조직액 사이의 선택적 투과 및 확산장벽을 이루고 있으며 순환계의 근세포와 접촉되며 서로 밀접한 연관을 가지고 있다. 혈관근육세포와 공존 배양에서 근세포가 내피세포의

증식을 감소시킨다는 보고도 있다.^{16,17)}

저자는 심장 내피세포의 배양에 있어서 내피세포의 골격단백의 성분 중 가장 다량으로 존재하며 microfilament과 microtubule의 양상을 대표할 수 있는 actin과 tubulin에 대한 간접면역 형광법을 이용하여 그 성상의 변화를 관찰하고 아울러 심근세포와 공존배양시와 colchicine 처리시의 영향에 대해 알아 보고자 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

실험재료

내피세포 및 심근세포 분리효소로는 0.125% trypsin(Gibco)과 0.1% collagenase(Gibco) 용액을 사용하였으며 배양액으로는 MEM알파배양액(Gibco)에 fetal bovine serum을 10%로 첨가하고 gentamycin(동신제약)을 배양액 10당 50mg 첨가하여 사용하였다. 간접 면역형광법에서 일차항체는 monoclonal antibodies로 actin과 tubulin 항체 (Sigma)를 1:10으로 희석하여 사용하였고 이차항체로는 anti-rabbit IgG FITC conjugate(Sigma)를 1:16으로 희석하여 사용하였다. 실험동물로는 생후 3일된 Sprague-Dawley종 흰쥐를 사용하였다.

실험방법

1) 세포배양

모든 과정은 무균조작을 하였다. 한 배에서 나온 10여 마리의 새끼에서 심장을 적출하여 준비된 4°C Phosphate buffer solution (이하 PBS)에 담궈 두었다. 이렇게 심장이 모두 모이면 효소와의 접촉면적을 넓히기 위해 심장에 칼집을 내고 PBS에 세척하여 혈액을 씻어낸 후 4°C 0.125% trypsin 10ml에 넣어 12시간 정도 처리하였다. 다음날 배양액 1ml를 넣어 trypsin의 작용을 중지시킨 후 trypsin 용액을 제거하고

PBS로 1회 세척한 후 37°C 0.1% collagenase 용액 10ml를 넣어서 37°C로 유지된 교반 배양기에서 분당 60회의 속도로 교반하면서 10분간 처리하였다. 첫 번째 상층액은 버리고 다시 10ml의 37°C collagenase 용액을 가하여 10분간 소화한 후 상층액을 취하여 100g로 3분간 원침하였다. 원침 후 상층액은 버리고 침전된 세포에 4°C PBS 10ml를 첨가하여 잘 섞은 후 다시 원침하여 상층액을 버리고 여기에 4°C 배양액 5ml를 첨가하여 얼음위에 저장하였다. 심장조직이 든 용기에는 37°C collagenase 용액 10ml를 넣어 다시 상기 조작을 하였다. 이러한 일련의 조작을 4회 반복하여 세포가 포함된 배양액 20ml를 얻었다. 이렇게 모여진 배양액을 원침하여 상층액을 버리고 37°C의 배양액 10ml를 첨가하여 배양용기에 넣어 CO₂ 배양기에서 90분간 배양하였다. 이렇게하면 세포의 활동도가 높은 내피세포는 배양용기에 착상하고 상대적으로 활동도가 낮은 심근세포는 아직 착상하지 못하고 배양액내에 부유하고 있는 상태가 된다. 이때의 배양액을 다른 배양용기에 옮겨 배양하면 내피세포와 심근세포를 분리하여 얻을 수 있다. 내피세포는 2회 계대배양한 것을 사용하였으며 계대배양된 내피세포는 0.05% trypsin 0.02% EDTA 용액으로 떼어내었다. 이렇게 얻은 내피세포를 대조군과 colchicine 처리 실험군을 위해서는 1×10⁵/ml의 농도로, 혼합배양군을 위해서는 6×10⁴/ml의 농도로 coverglass가 깔린 90mm 평판접시에 각각 10ml씩 넣어 배양하였다. 배양 1시간 후 상기방법을 이용하여 새로이 분리한 심근세포를 1×10⁵/ml 농도로 만들어 혼합배양군의 평판접시에 10ml 첨가하여 배양하였다. 위 조작에서 살아있는 세포수의 산정은 trypan blue dye exclusion test로 하였다.

2) 실험군 및 면역세포화학

실험군으로는 내피세포와 심근세포를 혼합배양한 군(이하 혼합군)과 내피세포만을 배양하여

colchicine에 1시간 처리한 군(이하 Colchicine군)의 두군으로 하였다. 대조군으로는 내피세포만을 배양하여 colchicine을 처리하지 않는 군으로 하였다. 혼합군에 심근세포를 첨가한 후 5시간 후에 Colchicine군의 배양액을 제거하고 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 colchicine을 포함한 배양액을 첨가하여 1시간동안 배양하였다. 1시간의 배양이 끝난후 colchicine이 없는 정상 배양액으로 교환 배양하였다. colchicine 처리가 끝난 시간부터 매일 동일한 시간에 6일간 실험군과 대조군의 평판 접시에서 coverglass를 꺼내어 그 위에 자라고 있는 세포에서 actin과 tubulin에 대한 간접 형광 면역법을 이용한 염색을 시행하였다. 염색방법은 다음과 같다. 우선 배양중의 coverglass가 배양액에서 나오면 4°C PBS로 세척한 후 -20°C acetone에서 20분간 고정하였다. 고정 후 다시 PBS로 세척한 후 actin과 tubulin의 일차항체용액에 세포가 접하게 하고 37°C 포화습도하에서 45분간 처리하였다. 그런 다음 PBS로 세척하고 이차항체인 anti-rabbit IgG FITC conjugate로 37°C 포화습도 하에서 45분간 처리한 후 PBS로 세척한 다음 DePeX(BDH)로 봉입하였다. 배양 중의 관찰은 도립 현미경으로 하였고 형광항체를 처리한 슬라이드는 형광현미경으로 하였다.

성 적

세포골격단백 염색결과에서 섬유사 형태로 나타나는 반응(F-form)과 섬유사 형태는 보이지 않으면서 세포질에 균일질로 나타나는 반응을 보였다. 섬유사 형태는 미세한 망상구조를 취하며 세포질 전반에 걸쳐 퍼져 있었다.

세포가 용기에 착상되는 과정에 있는, 세포질이 응축된 상태에서는 F-form의 반응은 약하고 세포질 전반에 걸쳐 균일질 형태가 우세하였으며 세포질의 전체적 반응강도는 강하였다. 세포가 용기에 착상을 마치고 넓게 퍼져 나갈때는 F-form의 반응이 두드러지며 섬유사

도 다소 짙어졌다. 세포분열로 세포수가 증가하면서 단층을 형성함에 따라 F-form의 반응이 약해졌다. 부위에 따른 세포 농도에 의해서도 반응양상의 차이를 보였는데 세포가 밀집한 곳에서는 세포질의 돌기 형성이 저조하였고 확장 속도도 느릴뿐더러 F-form의 반응이 미약하였다. 이에 반해 세포가 드문드문 존재하는 곳에서는 활발한 돌기 형성을 보였으며 세포질의 퍼져 나가는 속도도 빨랐고 F-form의 출현이 현저하였다. 모든 세포에 있어 공통적 특징은 세포질의 돌기가 많고 넓게 퍼져 있는 세포에서 F-form의 출현이 현저하였다.

Actin과 tubulin의 변화 양상을 비교하기 위해 반응정도의 구분을 하였다. 반응 정도의 구분은 우선 각 세포에서 그 형광의 강도에 따라 ++, +로 구분하였고 골격단백사의 구분정도에 따라 다시 a, b, c의 등급으로 분류하였다. 그 척도로써 형광현미경 하에서 세포기질의 형광도가 높아 세포질 전체가 균일하게 강한 형광을 발할때 ++, 형광도가 낮아 일부에서 형광을 발하지 않는 부위가 나타날때 +로 하였다. 골격단백사 구분정도는 F-form의 반응강도가 강하며 단백사가 세포질 전반에 걸쳐 뚜렷하게 관찰될 때 a, 단백사의 반응강도가 강하나 세포질의 일부에서 단백사가 관찰될 때 b, 단백사가 세포질 일부에서 관찰되기는 하나 그 반응강도가 약하여 감지하기가 어려울 때 C로 하였다.

Actin의 염색 결과

실험일자에 따른 변화 양상을 보면 실험 1일 째는 세포가 다소 응축된 형태를 취하며 전체적 형광반응은 강하였으나 F-form의 출현은 뚜렷하지 않았다. 실험 2일째에 접어들면서 세포들은 용기에 완전히 착상하여 안정된 모습을 보였으며 형광도의 강도는 감소되었다. 또한 많은 세포질 돌기 형성을 하였지만 충분히 확장되지 못한 상태에 머물러 있었다. 실험 3일째 세포는 세포질 형광도에서의 큰 변화는 관찰되지

않았으나 넓게 퍼진 세포질과 F-form의 출현이 현저하였다. 실험 4일째에 접어들면서 내피세포들은 그간의 증식으로 인해 단층형성에 접어들기 시작하였으나 반응정도나 양상에 있어서는 전날과 같은 수준을 유지하였다. 심근세포는 실험 3일째부터 개개 세포의 박동이 관찰되었으며 실험 5일경에 접어들면서 세포가 연결되어 전체적 동시 박동을 시작하였다. 이전까지 실험군과 대조군에서 인지할만한 차이점이 관찰되지 않았으나 실험 5일째에 접어들면서 대조군과 colchicine군의 F-form 반응이 감소하였으나 혼합군에서는 여전히 강한 F-form 반응을 유지하였다. 이러한 차이는 6일째에도 지속되었다.

Tubulin의 염색 결과

전 실험기간을 통해 actin에 비해 형광도는 다소 약하게 나타났으며 반응강도의 분포양상은 actin의 경우와 비교해 볼 때 핵 주위에 아주 강한 반응을 보이는 centrosome 부위가 관찰되었다. 실험 1일째 세포질이 응축된 상태에서 반응강도는 강하게 나타났고 F-form의 출현은 뚜렷

하지 않았다. 특히 Colchicine군에서 F-form의 감소 경향이 관찰되었다. 실험 2일째 세포질이 다소 확장된 상태에서 반응강도는 약해졌고 F-form의 출현 또한 뚜렷하지 않았다. Colchicine군에서 F-form의 뚜렷한 감소 경향이 관찰되었다. 실험 3일째 접어들면서 반응강도는 전날의 수준을 유지하였으나 F-form의 뚜렷한 증가가 관찰되었으며 많은 돌기를 가지고 넓게 확장된 세포질을 가진 세포에서 강하게 관찰되었다. Colchicine군에서는 다른 군과 비교해 볼 때 전날의 현저한 차이를 보이던 것과는 달리 대조군과 비슷한 수준에 다달았다. 실험 4일째 단층형성이 시작되었으며 반응강도와 F-form의 반응은 전날과 같은 수준을 유지하였다. 실험 5일째 심근 세포들이 연결된 동시 박동이 관찰되었으며 F-form 반응은 약하여졌다. 이러한 반응강도가 6일째에도 지속되었다. 전 기일을 통해 대조군과 혼합군의 차이는 관찰되지 않았으며 Colchicine에서 실험 2일째까지 다른 군에 대해 F-form이 약하다가 3일 이후로는 동일한 수준을 유지하였다.

Table 1. Reaction intensity and fiber distinction of actin and tubulin in rat endothelial cells

DAY	ACTIN			TUBULIN		
	CONTROL	COCULTURE	COLCHICINE	CONTROL	COCULTURE	COLCHICINE
	GROUP	GROUP	GROUP	GROUP	GROUP	GROUP
1	b ⁺⁺	c ⁺⁺				
2	b ⁺	c ⁺				
3	a ⁺					
4	a ⁺					
5	b ⁺	a ⁺	b ⁺	b ⁺	b ⁺	b ⁺
6	b ⁺	a ⁺	b ⁺	b ⁺	b ⁺	b ⁺

* Fiber distinction

a : clear fiberform

b : moderate fiberform

c : weak fiberform

* Reaction intensity

++ : strong fluorescence

+ : weak fluorescence

고 칠

내피세포는 혈액과 조직액 사이에 존재하면서 세포 내, 외의 환경요인에 민감하게 반응하고 투과, 확산의 장벽으로써 뿐만 아니라 혈액 조직액간의 평행 유지에 필요한 많은 물질을 생산함으로써 순환계 장기세포로서의 가장 중요한 위치에 있다. 척추동물의 내피세포는 비교적 일찍 분화되며 분화된 뒤에도 활발한 분열 능력을 가지고 있다. 이런 분열 능력으로 인해 순환계 내면의 손상된 세포를 빠른 시간내에 복구할 수 있다. 또한 저산소 상태라든가 염증같은 상태에서는 내피세포들의 증식이 활발해져서 그러한 상태에 처한 조직속으로 모세혈관을 형성해 들어간다. 악성종양이 그처럼 빠른 속도로 자랄 수 있는 것도 이런 모세혈관의 형성에 기인한 것이다.

일반적으로 세포는 환경에 따라 그 성상이 변화되기는 하나 분화가 완성된 세포에서는 그 환경이 변화해도 세포 특유의 성질은 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 내피세포 같이 고도로 분화된 세포에서는 그 고유 성질을 가지는 경향이 뚜렷하다. 배양상태에서의 내피세포는 그 배지의 성분이 그 성상의 유지에 미치는 영향이 제일 클 것이며 생체와 비슷하게 구성된 배지 내에서 내피세포의 단독 배양시와 심근세포와의 혼합배양시 그리고 colchicine 처리시의 골격단백의 배열 양상을 추적한다면 배양하에서 내피세포 골격단백 배열 양상 및 그에 미치는 이들의 영향을 알 수 있으리라 생각한다.

내피세포를 심장조직에서 얻어 바로 1차 배양을 해 보면 배양용기에 착상한 세포의 밀도가 100 cell/mm^2 정도에서도 활발한 증식으로 2~3 일이 지나면 중층에 돌입한다. 그러나 내피세포를 계대배양하면 세포분열이 상당히 둔화된다. 이러한 이유로 시간을 요하는 실험에서 1차 배양의 내피세포를 사용한다면 내피세포의 관찰이 어려워진다. 본 실험에서처럼 심근세포

와의 공존배양시 영향을 알아보고자 한다면 공존하는 심근세포가 내피세포에 미치는 영향을 여러 측면에서 예상해 볼 때 생체에서와 같이 심근세포와 내피세포가 연접이 되고 또한 심근세포가 박동을 하는 단계 이상은 지나야 실험 결과에 대한 신빙성이 높을 것이라 사료된다. 저자는 한 배에서 나온 흰 쥐의 심장에서 비교적 동질성의 내피세포를 대량으로 얻고 또한 분열 속도가 저하된 안정된 세포를 사용하기 위해 2대 계대배양한 내피세포를 사용하였다.

배양 1일째 F-form이 두드러지지 않으면서 형광도가 높게 나타났다. 이것은 하나의 세포에서 단량체 및 다량체 골격단백의 전체양은 거의 일정하다는 것¹⁸⁾을 생각해 볼 때 아직 용기에 완전히 착상을 하지 못했기 때문에 응축된 상태의 세포질이 상대적으로 강한 형광을 발하는 것으로 추측되었다. 실험 2일째는 세포가 확장되면서 세포질이 얇어져서 상대적으로 반응 강도가 약해진 것으로 생각된다. 실험 3~4일째는 계대배양후 세포 손상에서 완전히 회복되고 충분히 확장된 세포질을 가진 내피세포들이 저농도의 세포배양 상태에서 활발한 세포이동을 하고 있는 상태이다. F-form의 증가는 골격단백이 세포 이동의 역할을 수행한다는 것을 생각해 볼 때 골격단백의 섬유형태의 중합체로의 전환이 증가한 때문으로 생각되었다. 5~6일경에 이르러 실험군에서 F-form의 반응이 감소된 것은 배양중의 세포들이 세포분열에 의해 세포 수가 증가하여 단층을 형성하기 시작함에 따라 내피세포의 이동이 정지되기 때문에 중합체로의 전환이 감소한 결과로 생각되었다. 100cell/mm^2 정도의 농도로 내피세포를 배양하면 1차 배양에서 2~3일경이 되면 활발한 증식으로 단층을 이미 형성하지만 2대 이상의 계대배양에서는 같은 농도에서 4~5일경이 되어야 단층을 형성한다. 본 실험에서 혼합배양군에서는 심근세포를 첨가하여 배양하므로 내피세포의 농도를 낮추어 배양하였다. 본 실험에서도 도립 현미경

하에서의 관찰에서 4일째 접어들면서 단층에 접근하여 5일 이후에는 단층이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 혼합군의 actin 염색을 제외한 다른 군에서 F-form의 감소는 단층을 형성한 세포들의 세포이동이 억제되므로 인해 섬유 형태의 중합체로의 전환이 감소되기 때문으로 생각되어졌다. 심근세포를 공존배양한 혼합군을 볼 때 actin의 경과에서 실험군과 대조군이 4일째까지는 차이를 보이지 않다가 5일에 접어들면서 다른 군에서는 단층형성과 더불어 F-form의 감소추세를 보였으나 혼합군에서는 여전히 강한 F-form의 반응을 유지하고 있었다. 이 결과의 해석에는 심근세포와의 공존배양에 있어 내피세포에 미치는 생화학적 요인을 고려해 봄직도 하지만 내피세포를 실리콘 판 위에서 배양하면서 실리콘 판을 눌리는 물리적 자극을 주었을 때 stress-fiber가 자극 방향으로 배열된다는 보고¹⁹⁾ 등을 볼 때 우선 심근세포의 박동에 따른 물리적 자극에 의한 영향이 주 원인인 것으로 생각되었다. 그러나 tubulin의 결과는 대조군과 공존 배양군 사이에 차이점이 발견되지 않았다. 이는 내피세포가 단층을 이루면서 세포이동이 정지된 상태에서 심근세포 박동에 의한 물리적 자극이 주어지더라도 actin에서와 같은 다양체 형성에 영향을 끼치지 않는 것을 알 수 있다. 이것은 세포골격단백으로서 세포이동에는 actin섬유와 microtubule이 같이 관여하나 세포의 수축에는 actin섬유가 수축단백으로 관여하고²⁰⁾ microtubule은 세포수축과는 별 연관이 없는 것으로 생각되었다.

Colchicine을 투여한 Colchicine군을 볼 때 tubulin에서 배양 초기에 현저한 변화를 보였다. 실험 1일째 즉 colchicine에서 1시간동안 노출된 직후 대조군과 뚜렷한 차이는 아니지만 감지할 만한 차이의 F-form 감소를 보였고 배양 2일째는 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보이다가 3일 이후로는 대조군과 같은 수준을 유지하였다. Colchicine이 tubulin의 중합과정을 방해한다는 것

은 잘 알려져 있다. microtubule의 중합과정을 방해하는 약제도 많으며 그 작용기전 또한 다양하다. Vinblastine 계통의 약제는 tubulin 단단체를 결정화시켜서 중합과정을 방해하고 colchicine 계통은 colchicine-tubulin 결합체가 microtubule의 성장부에 부착되어 더 이상의 tubulin의 첨가를 방해하는 것으로 알려져 있다.²¹⁻²³⁾ 본 실험에서 Colchicine군에서 colchicine을 처리한 직후부터 그 효과가 관찰되었으며 처리후 1일 후가 가장 강한 효과를 보인 것으로 사료되며 colchicine 제거후 2일 지나면 그 효과에서 완전히 회복되는 것으로 보인다. actin의 결과에서는 대조군과 colchicine 실험군에서 감지할 만한 차이가 관찰되지 않았다. 이는 colchicine이 actin의 중합과정에는 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되었다.

Legends on figures

Fig. 1. Photomicrograph of tubulin in control group cells 1st day in culture. Condensed cytoplasm shows strong fluorescence and moderate degree of fiberform is visible.
Bar=10μm

Fig. 2. Photomicrograph of tubulin in the cells of colchicine group 1st day in culture. Condensed cytoplasm shows strong fluorescence and fiberform is weakly visible. Bar=10 μm

Fig. 3. Tubulin in the cells of control group. 2nd day in culture. Somewhat spread cytoplasm shows weak fluorescence and moderate degree of fiberform is visible. Bar=10μm

Fig. 4. Tubulin in the cells of colchicine group 2nd

day in culture. Fiberform is apparent in cytoplasm. Bar=10mm

Fig. 5. Actin in the cells of control group, 3rd day in culture. Fully-expanded cytoplasm shows weak fluorescence and fiberform is clearly visible and is more striking in processes. Bar=10μm

Fig. 6. Actin in the cells of coculture group, 3rd day in culture. Fully-expanded cytoplasm shows weak fluorescence and fiberform is clearly visible. Bar=10μm

Fig. 7. Actin in the cells of control group, 5th day in culture. Fully-expanded cytoplasm shows weak fluorescence and moderate degree of fiberform is visible. Bar=10 μm

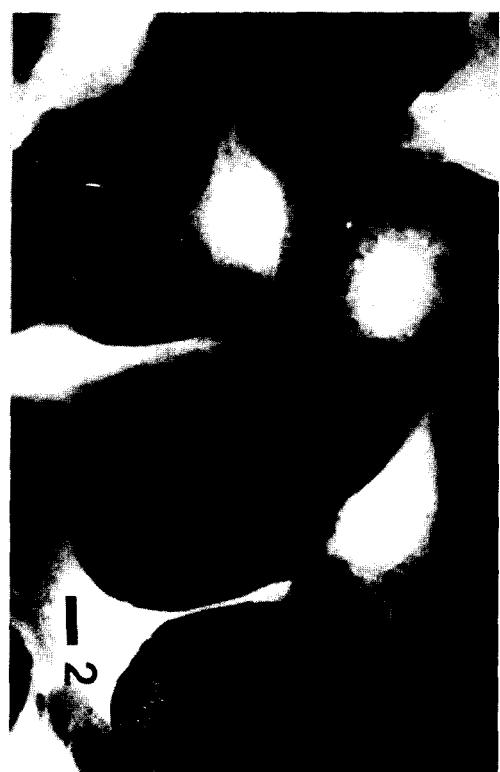


Fig. 8. Actin in the cells of coculture group, 5th day in culture. Fully-expanded cytoplasm shows weak fluorescence and fiberform is clearly visible. Bar=10μm

요 약

흰 쥐 내피세포의 배양에 있어서 세포골격단백의 변화 양상과 심근세포와의 공존 배양시의 영향 그리고 colchicine이 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 monoclonal antibodies를 이용한 간접면역형광법으로 actin과 tubulin염색을 시행하여 microtubule과 microfilament의 변화 양상을 일령별로 관찰하였다. 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

세포질이 넓게 퍼지고 많은 돌기를 가진 세포에서 섬유사형태의 반응이 강하였으며 내피세포가 단층을 형성하면서 섬유사형태의 반응이 약해졌다.





심근세포를 혼합배양한 군에서 내피세포가
단층을 형성하면서 microtubule은 대조군과 같은
수준으로 섬유사형태의 반응이 감소하였으나
microfilament는 여전히 강한 섬유사형태의 반
응을 유지하였다.

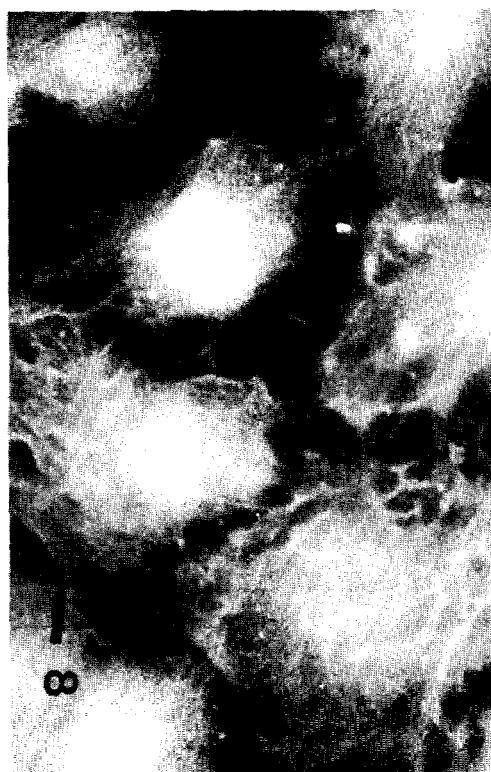
Colchicine을 처리한 군에서 microfilament는
대조군과의 차이점이 발견되지 않았으나 micro-
tubule에서는 colchicine 처리 직후부터 섬유사
형태의 감소경향을 보였으며 1일 이후가 가장
현저한 감소를 보이다가 2일 이후에는 대조군의
수준으로 돌아왔다.

참고문헌



regulation by proteins from nonmuscle cells.
Physiol. Rev., 62 : 672-737, 1982.

- Bray, D., Heath, J., and Moss, D. : The membrane-associated "cortex" of animal cells : its structure and mechanical properties. *J. Cell Sci.*, 4 : 71-88, 1986.
- Korn, E.D. : Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.*, 62 : 672-737, 1982.
- Pollard, T.d., and Cooper, J.A. : Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann. rev. Biochem.*, 55 : 987-1035, 1986.
- Sato, M., Schwartz, W.H., and Pollard, T. D. : Dependence of the mechanical properties of actin/alpha-actinin gels on deformation rate. *Nature*, 325 : 828-830, 1987.
- Stossel, T.P., Chaponnier, C., Ezzell, R. M., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Kwiatkowski, D.J., Lind, S.E., Smith, D.B., Southwick, F.S., and Yin, H.L. : Non-muscle actin binding proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1 : 353-402, 1985.
- Gabbiani, G., Gabbiani, F., Heimark, R. L., and Schwartz, S.M. : Organization of actin cytoskeleton during early endothelial regeneration in vitro. *J. Cell Sci.*, 66 : 39-



- 46, 1984.
7. Cooper, J.A. : Effects of cytochalsin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.*, 105 : 1473 – 1478, 1987.
 8. Mitchison, T., and Kirschner, M. : Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature*, 312 : 232 – 237, 1984.
 9. Kirschner, M., and Mitchison, T. : Beyond self-assembly from microtubules to morphogenesis. *Cell*, 45 : 329 – 342, 1986.
 10. Sammak, P.J., and Borisy, G.G. : Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature*, 332 : 724 – 726, 1988.
 11. Allen, R.D., Weiss, D.G., Hayden, J.H., Brown, D.T., and Fujwara, H. : Gliding movement and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm : evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. *J. Cell Biol.*, 100 : 1736 – 1753, 1985.
 12. Gotlieb, A.I., and Subrahmanyam, L. : Microtubule-organizing centers and cell migration : Effect of inhibition of migration and microtubule disruption in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 96 : 1266 – 1272, 1983.
 13. Gundersen, G.G., Khasja, S., and Bulinske, J.C. : Postpolymerization detyrosination of α -tubulin : a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J. Cell Biol.*, 105 : 251 – 264, 1987.
 14. Maruta, H., Greer, K., and Rosenbaum, J.L. : The acetylation of α -tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.*, 103 : 571 – 579, 1986.
 15. Schulze, E., Asai, D.J., Bulinske, J.C., and Kirschner, M. : Post-translational modification and microtubule stability. *J. Cell Biol.*, 105 : 2167 – 2177, 1987.
 16. Orlidge, A., and D'Amore, P.A. : Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, 105 : 1455 – 1462, 1987.
 17. Schumacher, B.L., Grant, D., and Eisenstein, R. : Smooth muscle cells produce an inhibitor of endothelial cell growth. *Arteriosclerosis*, 5 : 110 – 115, 1985.
 18. Gabbiani, G., Gabbiani, F., Heimark, R.L., and Schwartz, S.M. : Organization of actin cytoskeleton during early endothelial regeneration in vitro. *J. Cell Sci.*, 66 : 39 – 46, 1984.
 19. Shirinsky, V.P., and Antonov, A.S. : Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J. Cell Biol.*, 109 : 331 – 339, 1989.
 20. Becker, C.G., and Murphy, G.E. : Demonstration of contractile protein in endothelium and cells of the heart valve endocardium. intima, arteriosclerotic plaques and Aschoff bodies of rheumatic heart disease. *Am. J. Pathol.*, 55 : 1 – 15, 1969.
 21. Lawrence, G.B., and Gray, G.B. : Tubulin-Colchicine complex inhibits microtubule elongation at both plus and minus ends. *J. Biol. Chem.*, 258 : 4190 – 4194, 1983.
 22. Inoue, S. : Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 91 : 131 – 147, 1981.
 23. Salmon, E.D., McKeel, M., and Hays, T. : Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. *J. Cell Biol.*, 99 : 1066 – 1075, 1984.

Distribution patterns of cytoskeletal proteins in cardiac endothelial cells : Investigation using monoclonal antibodies

Han Chul Kim, In Hwan Song, Yung Chang Lee

*Department of Anatomy
Yeungnam University, College of Medicine
Taegu, Korea*

To investigate the changing patterns of microfilament and microtubule arrangement and influence of myocardial cells and colchicine to microfilament and microtubule formation in cardiac endothelial cells the authors carried out indirect immunofluorescence stain for actin and tubulin with supernatant monoclonal antibodies. Secondary antibodies were IgG FITC conjugate. The results were summarized as follows.

Fiberform reactions were stronger in the cells with many processes and spread cytoplasm and they became weaker after the endothelial cells formed monolayer.

In the endothelial cells cocultured with myocardial cells the fiberform of the microtubule became less visible compared to control group but fiberform of the microtubule maintained strong intensity as endothelial cells formed monolayer.

In the group treated with colchicine, there were no visible differences in microfilaments compared to control group but fiberform of microtubule revealed weaker intensity after colchicine treatment. The intensity of microtubule fiberform returned to control level after 2 days.