

<학술논문>

DOI:10.3795/KSME-B.2010.34.1.083

세포외 기질 물질에 따른 심근세포(HL-1)의 성장 연구 §

홍윤미* · Khalid Anwar* · 김선민**

* 인하대학교 기계공학부

Effect of Extracellular Matrix on Cell-Surface Interactions and Growth of Cardiomyocytes(HL-1)

Yoonmi Hong*, Khalid Anwar* and Sun Min Kim**

* Department of mechanical engineering, Inha University

(Received September 24, 2009 ; Revised October 29, 2009 ; Accepted November 9, 2009)

Key Words : Cardiomyocyte(심근세포), Surface Coating Chemical(표면 처리 물질), Extracellular Matrix(세포외 기질 물질), Cell Culture(세포배양)

초록: HL-1 세포(심근세포주)는 AT-1 쥐의 심방암세포에서 추출한 심근세포로써, 특별한 약물의 주입 없이도 맥동현상을 보이며, 여러 번의 계대 배양 후에도 그 수축성을 잃지 않는 특성이 있어 바이오센서에 적용하기 용이하다. 본 연구에서는 세포 외 기질물질(ECM: extra cellular matrix)의 영향에 따른 HL-1의 성장과 형질변화를 분석하였다. HL-1 세포를 ECM 이 처리되지 않은 표면과 서로 다른 3 가지 ECM 인 gelatin 수용액, fibronectin 수용액 및 gelatin 과 fibronectin 의 혼합 수용액으로 처리된 표면에 배양하여 세포와 ECM 의 상호작용 및 세포의 성장을 관찰하였다. 세포 배양 직후부터 배양후 4 일까지의 세포의 변화를 형광 면역 염색법 (immunostaining)을 이용하여 분석하였다. 세포 증식은 Hoechst 와 EthD-1 을 통해 관찰하였고, DAPI 염색으로 세포핵을 phalloidin 염색을 통해 F-actin 을 관찰하였다. fibronectin 수용액을 ECM 으로 사용하였을 때, 세포 성장 및 형질유지에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 본 연구의 결과는 HL-1 세포와 ECM 의 상호 작용 및 세포의 성장을 이해하는 데 기초자료로 활용될 수 있으리라 기대된다.

Abstract: We present here the effect of extracellular matrix (ECM) on the proliferation and physiology of HL-1 cardiac cells. HL-1 cell is from AT-1 mouse atrial cardiomyocyte tumor lineage. HL-1 cell can be serially passaged, yet they maintain the ability to contract which is a promising character of HL-1 cell for the cell based biosensors. HL-1 cells grow up on the ECM which can affect on the attachment and growth of HL-1. In this paper, we discuss HL-1 cell-ECM interactions with three different ECMs and non-treated surface. HL-1 cells are grown for 4 days after seeding then observed their attachment. Also they were immunostained by hoechst and EthD-1 for proliferation, phalloidin for F-actin, and DAPI for nuclei. Fibronectin was revealed as the proper ECM material for HL-1 cell culture. This study can provide basic information for understanding the cell-ECM interactions and growth of HL-1 cells.

1. 서 론

심근세포에 대한 최근 연구는 물리적 혹은 전기적 자극으로 인한 세포의 형질 발현이나⁽¹⁾ 심근세포의 기계적 성질을 이용한 바이오센서의 작동기 제작 및 이온의 움직임을 통한 맥동현상의 특이성을 분석하는 연구⁽²⁾ 등이 이루어졌다.

§ 이 논문은 2009 년도 바이오공학부분 춘계학술대회 (2009. 5. 21-22, BEXCO) 발표논문임

† Corresponding Author, sunmk@inha.ac.kr

HL-1 세포(이하 HL-1)는 AT-1 쥐의 심방암세포로부터 추출해 낸 심근세포계로, 사람의 심근세포와 가장 유사한 표현형을 지니며, 바닥에 부착하여 성장하는 세포로 부착 후에도 스스로 수축과 이완을 반복하는 특이성⁽³⁾을 잃지 않고 자라는 특징이 있다.

HL-1 을 부착하기 위하여 세포외 기질 물질 (Extracellular matrix, or ECM)로 배양 표면을 12 시간 이상 처리하는데, 기존연구에서는 각각 gelatin 과 fibronectin 의 혼합 수용액,⁽³⁾ fibronectin 수용액, gelatin 수용액, collagen 수용액⁽⁴⁾ 등을 사용했다.

성장하는 세포는 세포에 작용하는 전단 응력,

세포간 상호작용, 세포와 ECM 간의 상호작용에 의해 영향을 받는다. 특히, ECM 은 세포의 부착에 도움을 준 뿐만 아니라 그 성장에도 영향을 주기 때문에⁶⁾ ECM 에 따라 세포의 성장을 비교 및 분석하는 것은 세포를 이용한 연구에 중요하다.

본 연구에서는 gelatin 수용액과 fibronectin 수용액 그리고 fibronectin, gelatin 혼합 수용액의 3 가지 ECM 과, ECM 을 처리하지 않은 표면에 HL-1 세포를 4 일 동안 배양하고, ECM 에 따른 HL-1 의 성장을 여러 가지 면역염색을 통하여 그 증식과 생존 및 형태 등을 비교 분석했다.

2. 실험

2.1 HL-1 배양

HL-1 은 루이지애나 주립대학의 William C. Claycomb 교수로부터 분양 받았으며 초기배양 시에는 0.02%의 gelatin 199ml 에 0.1%의 fibronectin 1ml 를 혼합한 ECM 을 사용하여 배양플라스크의

표면을 처리하여 사용했다. 배지는 Claycomb media (Sigma) 87%, Fetal bovine serum(Sigma) 10%, Penicillin/Streptomycin(Life Technologies) 1%, Norepinephrine(Sigma) 1%, L-Glutamine(Sigma) 1%를 혼합해서 사용했다.

배양은 이산화탄소(CO₂)농도 5%와 공기 95%, 37℃로 유지되는 습식 인큐베이터에서 이루어졌고 계대배양비 1:3 으로 3~4 일 간격으로 계대배양했다. 실험 시에 배지는 매일 교체했다.

2.2 ECM 표면 처리

ECM 은 120℃에서 20 분간 고압 멸균소독한 증류수에 0.1%의 fibronectin 을 1:200 의 비율로 희석한 fibronectin 수용액, 동일 증류수에 희석한 0.02% gelatin 수용액, 그리고 0.02%의 gelatin 수용액 199ml 에 0.1% fibronectin 1ml 넣은 gelatin 과 fibronectin 혼합액까지 총 3 종류를 사용하였다. 또한, ECM 처리 표면과 비교하기 위하여 증류수로 세척된 표면을 Negative control 로 사용하였다. 모든 표면처리는 24 well plate 에 이루어졌다.

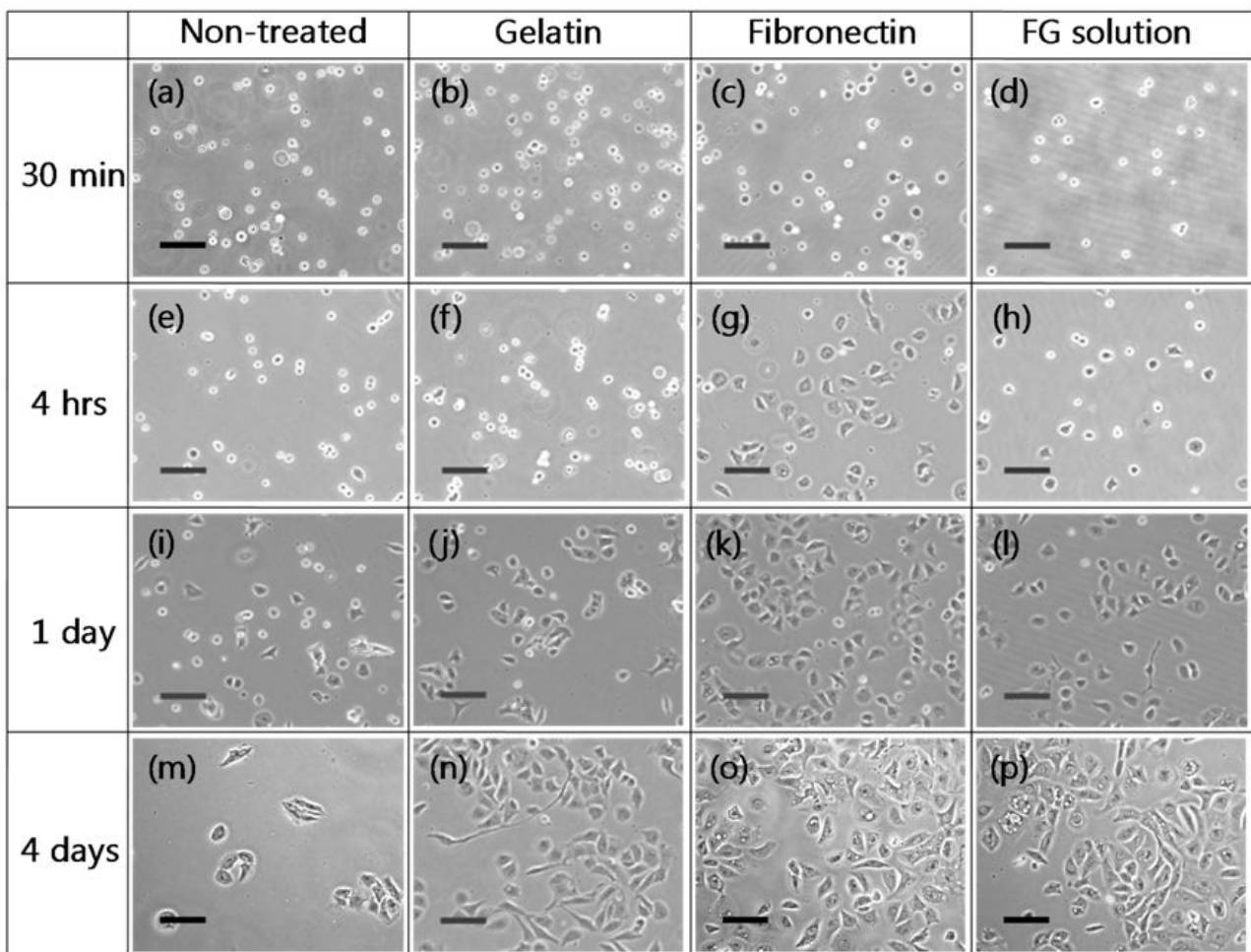


Fig. 1 Phage contrast images of HL-1 cells cultured on different surfaces at different times. All surfaces are treated with each ECM solutions during overnight. The scale bar is 100µm

2.3 면역 염색 분석

세포 증식 분석을 위해 Hoechst 와 EthD-1 로 면역염색했다. 배양 플라스크를 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline(Ca-Mg free), Invitrogen)로 빠르게 1 회 씻어낸 후 Hoechst(DPBS 와 1:1000), EthD-1(DPBS 에 4mM 농도)로 처리하여 인큐베이터에서 20 분간 염색한 후 DPBS 로 1 회 세척하고, 각각 전체 세포의 핵과 죽은 세포를 도립 형광 현미경(Ti-u Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰했다. 1280*1024 pixel 면적의 다섯 영역을 임의로 선택하여 seeding 후 첫째 날의 세포 수와 넷째 날의 세포 수를 계산했다.

세포 형태 분석을 위해서 phalloidin 으로 F-actin 을 DAPI 로 세포핵을 면역염색했다. 배양 플라스크를 DPBS 로 빠르게 2 회 세척 한 후 상온에서 3.7%의 포름알데히드로 20 분 동안 고정시키고, 20 분간 blocking solution(1% BSA, 0.3% Triton-X, 10mM PBS) 으로 permeabilization 했다. Filamentous actin(Phalloidin, 1:200)을 1 시간 염색하고, 2 분간 핵 염색(DAPI 1:5000) 후 mounting 한 후 덮어 관찰했다. 매 순서가 끝나고 DPBS 로 빠르게 3 회 세척 했다.

3. 결과

3.1 표면 부착

HL-1 의 부착을 시간에 따라 관찰한 결과 ECM 처리를 하지 않은 표면에서 자란 HL-1 은 세포의 분포가 균일하지 않고 뭉쳐서 자라는 것을 확인할 수 있다(Fig. 1(m)). 또한, 다른 ECM 에서 자란 HL-1 보다 세포 수가 현저히 떨어지는데, 이는 seeding 후 첫날 배지 교환 중에 미처 표면에 부착 되지 않은 원형 세포(Fig. 1(i))가 떨어져 나간 경우도 배제할 수 없다. Gelatin 의 경우에도 seeding 4 시간 후 까지는 표면에 미부착 상태이다(Fig. 1(f)). 1 일 후부터는 거의 모든 세포가 표면에 부착한 것을 확인할 수 있다(Fig. 1(j)). Fibronectin 을 사용한 경우에 seeding 후 30 분 경과(Fig. 1(c)) 후에 표면과의 원활한 상호작용으로 부착이 빠르다는 것을 알 수 있으며, 4 시간 후에는 모든 세포가 표면에 부착한 모양을 보인다(Fig 1(g)) 1 일 후부터는 증식 원활하게 이루어지고 있음을 확인할 수 있다 (Fig.1 (k)). Fibronectin 과 gelatin 혼합액(이하, FG solution)에서는 4 시간 경과 후 상당히 많은 양의 HL-1 이 바닥에 부착했음을 확인할 수 있다. FG solution 에서 자라는 경우 HL-1 이 표면에 부착하는데 소요되는 시간이 5~6 시간 이상임을 고려할 때, HL-1 의 부착을 돕는 ECM 으로는 fibronectin 이 가장 효과적임을 알 수 있다.

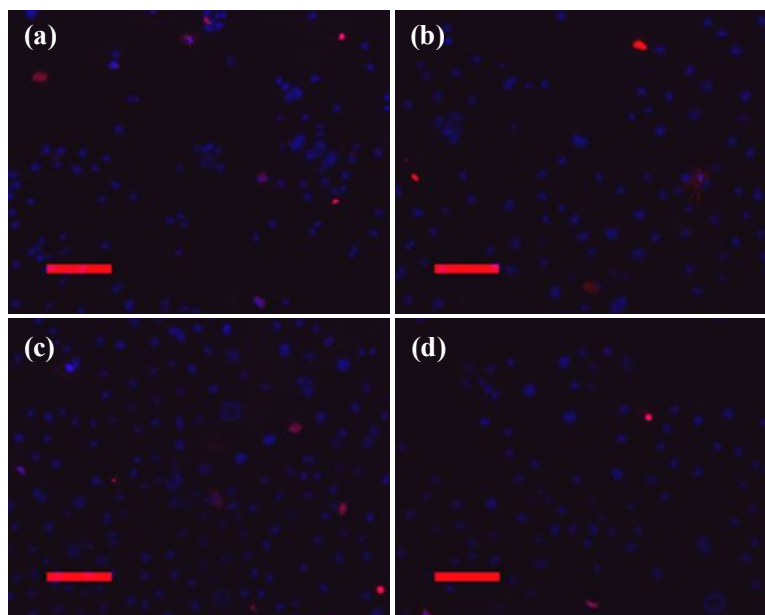


Fig. 2 Fluorescence images of HL-1 cells immunostained with Hoechst (blue, live cells) and EthD-1(red, dead cells) on different ECMs at day 4. (a) Non-treated, (b)gelatin, (c)fibronectin, (d)fibronectin/gelatin solution. The scale bar is 100µm

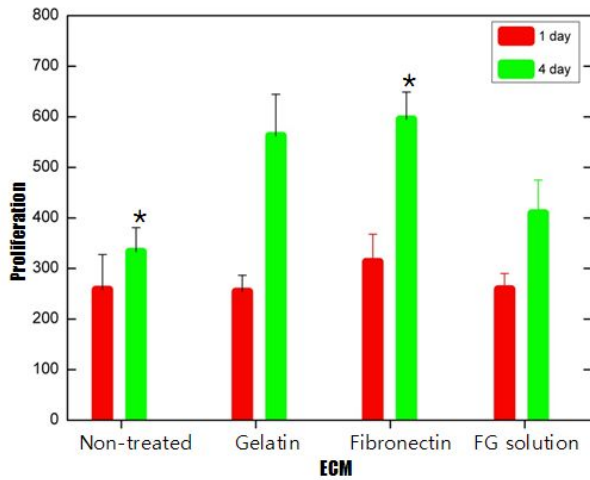


Fig. 3 Comparisons of the cell proliferation on different ECMs. (Student paired T-test, n=5, *, p<0.05)

3.2 세포 증식

Hoechst(Fig. 2)와 EthD-1 형광 염색 결과로 ECM의 HL-1의 증식속도에 대한 영향을 알 수 있다. 4일째의 세포 증식을 비교(Fig. 3)해 보면, FG solution을 ECM으로 사용했을 때(Fig. 2(d))보다 fibronectin을 사용했을 때(Fig. 2(c))의 HL-1 성장이 더욱 빠른 것을 알 수 있다. Hoechst와 EthD-1의 염색 결과로 세포의 분포도 또한 대략적으로 확인할 수 있다.

3.3 면역염색

ECM으로 처리하지 않는 표면에서는 세포와 ECM 사이의 상호작용이 잘 이루어지지 않고 오히려 세포간 상호작용이 더욱 강하게 이루어져 세포간의 그룹화가 더욱 강하게 이루어진 것으로 나타났다(Fig. 4(a)). Gelatin으로 처리한 표면에서 성장한 HL-1은 세포생존률이나 증식에 있어서는 Fibronectin이나 FG solution과 비교해서 뒤떨어지는 결과를 보이지는 않았지만, F-actin 염색 결과 세포들간의 상호작용이 부족한 것으로 확인되었다(Fig. 4(b)). Fibronectin에서 성장한 HL-1은 세포와 세포의 상호작용에 의한 근육단백질 결합에 있어서도 다른 ECM보다 강한 결합을 볼 수 있었다(Fig. 4(c)). FG solution의 경우도 근육 단백질의 분포가 어느 정도 균일하여 세포와 ECM 및 세포간의 상호작용이 적절히 이루어지는 것으로 확인되었다(Fig. 4(d)).

4. 결론

이번 연구에서는 세포배양 표면의 ECM 물질을

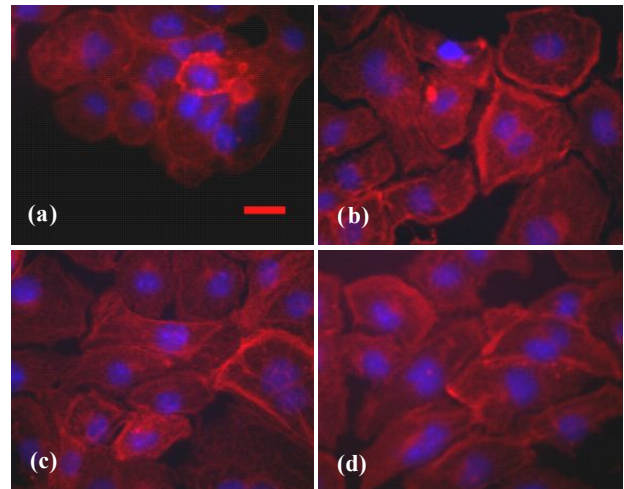


Fig. 4 Fluorescence images of HL-1 cells immunostained with phalloidin(red, F-actin), and DAPI(blue, nuclei) on different ECMs at day 4 (a) Non-treated (b) gelatin (c) fibronectin (d) fibronectin/gelatin solution. The scale bar is 20 μm

다르게 하여 HL-1을 4일간 배양하여 얻은 심근 세포에 Hoechst, EthD-1 형광 염색으로 생존률을 분석하고 phalloidin, DAPI 형광염색으로 HL-1의 형질을 관찰하였다.

이번 실험으로 HL-1의 성장에는 ECM이 반드시 필요하고, 생존률과 성장 속도가 ECM에 의해 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

Fibronectin으로 표면을 처리한 경우 세포의 표면에 대한 원활한 부착 및 세포의 증식 및 생존률이 높게 나타났다. 또한, 그 성장속도가 다른 종류의 ECM에 비해 빠르고, 생존률 또한 일반적으로 사용되는 FG solution으로 처리한 경우와 비교했을 때 좋은 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 추후 HL-1을 이용한 다양한 심근세포 관련연구에 기초 자료로 활용될 수 있으리라 기대된다.

후기

이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- (1) Hoi Ting Heidi Au, Bo Cui, Zane E. Chu, Teodor Veres and Milica Radisic, 2009, "Cell Culture Chips for Simultaneous Application of Topographical and Electrical Cues Enhance Phenotype of Cardiomyocytes," *Lab on a Chip*, Vol. 9 No. 4, pp. 564~575.
- (2) Sunwoo Lee, Joon-Chul Kim, Yuhua Li, Min-Jeong Son and Sun-Hee Woo, 2007, "Fluid Pressure

- Modulates L-type Ca^{2+} Channel via Enhancement of Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release in Rat Ventricular Myocytes," *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol.294 No.4, pp.C966~C976.
- (3) Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A. and Izzo, N. J. Jr., 1998, "HL-1 Cells: A Cardiac Muscle Cell Line that Contracts and Retains Phenotypic Characteristics of the Adult Cardiomyocyte," *PNAS*, Vol. 95 No. 6, pp. 2979~2984.
- (4) Hidago-Bastida, L.A., Barry, J.J.A., Everitt, N.M., Rose, F.R.A.F., BATTERY, L.D., Hall, I.P., Calycomb, W.C. and Shakesheff, K.M., 2006, "Cell Adhesion and Mechanical Properties of a Flexible Scaffold for Cardiac Tissue Engineering," *Acta Biomaterialia*, Vol. 3 No. 4, pp. 457~462.
- (5) Akhyari, P., Kamiya, H., Haverich, A., Karck, M. and Lichtenberg, A., 2008, "Myocardial Tissue Engineering: the Extracellular Matrix," *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, Vol 34 No.10, pp.229~241.