

세포외 기질 물질의 물리·화학적 영향에 따른 심근세포(HL-1)의 성장 연구[§]

홍윤미* · 최성균* · 김선민*[†]

* 인하대학교 기계공학과

Physical and Chemical Effects of Extracellular Matrix on the Growth of Cardiomyocytes (HL-1)

Yoonmi Hong*, Seongkyun Choi* and Sun Min Kim*[†]

* Dept. of Mechanical Engineering, Inha Univ.

(Received May 30, 2011 ; Revised September 23, 2011 ; Accepted September 27, 2011)

Key Words: Extracellular Matrix(세포외 기질 물질), Cell-ECM Interaction(세포와 기질간 상호작용), Cardiomyocyte(심근세포), HL-1 Cell Line(HL-1 세포주)

초록: 본 연구에서는 세포의 성장속도, 배양표면 부착, 체내 특이성을 유지에 중요한 요소인 세포외 기질 물질에 따른 심근세포주(HL-1 cell)의 성장, 생존률 및 표현형 등을 분석했다. 서로 다른 5 가지의 세포외 기질 환경을 조성하여 세포 성장에 미치는 영향에 대하여 분석했다. 세포외 기질 물질이 처리된 배양 표면의 물리적인 형태는 원자현미경을 통하여 분석했으며, 세포의 표면부착, 성장 및 증식과 생존률 및 표현형은 역상형광현미경 및 면역염색법을 통해 분석했다. 본 연구를 통하여 서로 다른 세포외 기질 물질이 세포의 부착 및 성장 속도에 영향을 미치며, 심근세포의 특이성을 나타내는 단백질의 형성에도 차이를 보이는 것을 확인했다.

Abstract: The extracellular matrix (ECM) is a key factor affecting cell growth and adhesion to the culture surface, and it is also important for maintaining the innate characteristics of cells. Here, we describe the effects of the ECM on cardiomyocyte (HL-1 cell line) growth, viability, phenotype, and contractile ability. Five different ECM materials were investigated to analyze their effects on the cell growth. The physical morphology of the ECM-coated surfaces was scanned with an atomic force microscope (AFM), and the attachment, growth, proliferation, viability, and phenotype of the cells were analyzed using fluorescence immunostaining and an inverted phase contrast microscope.

1. 서론

체내 혹은 체외에서의 세포의 성장은 세포간의 상호작용, 세포와 세포 배양 표면간의 물리, 화학적 상호작용 및 공급되는 영양분이나 의약제제, 세포 배양 온도 등 다양한 자극 및 배양 환경에 의해 영향을 받는다.⁽¹⁾

특히 체외에서 세포를 배양하는 경우 체내 환경을 유사하게 모사하여 배양 세포가 체내에서의 특성을 유지할 수 있도록 하는 것이 매우 중요하다.^(2,3)

세포의 체내 특성을 유지하는 방법에는 세포나 조직이 그 형질을 유지할 수 있도록 도와주는 지지체(Scaffold)에 세포를 배양^(4,5)하거나, 미세채널^(6,7)이나 미세패턴^(8,9) 위에 세포를 배양하여 성장 형태를 제어하는 방법, 세포의 성장을 돕는 세포외 기질 단백질(Extracellular Matrix, 이하 ECM)을 세포 배양 표면에 미리 처리⁽¹⁰⁾하여 그 배양을 용이하게 하는 방법 등이 있다.

특히, 표면에 부착하여 자라는 세포의 경우, ECM 은 세포의 성장뿐만 아니라 세포의 부착과 세포 생존, 분열, 증식, 형질, 대사 및 기능에 영향을 주기 때문에 세포에 따라 적합한 세포외 기질 물질로 배양 표면을 처리하여 주는 것이 중요하다.⁽⁹⁻¹¹⁾

§ 이 논문은 2011년도 대한기계학회 바이오공학부문 춘계 학술대회(2011. 4. 28.-30., 포항공대) 발표논문임

† Corresponding Author, sunmk@inha.ac.kr

© 2011 The Korean Society of Mechanical Engineers

세포 배양에 쓰이는 ECM 은 주로 collagen, fibronectin, gelatin, laminin, alginate, cellulose 등의 순수 생물체제 단백질⁽¹¹⁾과 polyester, polylactone, polyurethane 등의 합성물, 생분해성 합성고분자 물질인 PLGA (Polylactic-co-glycolic acid), PGA (Polylactic acid)⁽¹²⁾ 등이 있다.

본 연구에서는 서로 다른 5 가지 ECM (collagen 수용액, fibronectin 수용액, gelatin 수용액, laminin 수용액, gelatin/fibronectin 혼합액(HL-1 세포주, 이하 HL-1, 배양에 추천되는 ECM))로 배양 표면을 처리한 후 표면을 원자현미경(Atomic Force Microscope, AFM)으로 분석했고, 심근세포(HL-1)를 4 일간 배양한 후 ECM 에 따른 HL-1 의 성장을 여러 가지 면역염색을 통하여 그 증식과 생존률 및 형태 등을 비교, 분석했다.

2. 실험

2.1 시약

(a) 세포배양액

- Dulbecco's phosphate-buffered saline (Ca- Mg free) (DPBS), Peniciline-streptomycin, L-ascorbic acid, L-glutamine (Invitrogen, San Diego, CA, USA)
- Claycomb medium, fetal bovine serum (FBS) (Sigma, St. Louis. MO, USA)

(b) 세포 외 기질 물질

- Fibronectin, laminin (Sigma, St. Louis. MO, USA)
- Gelatin (Difco, Waltham, MA, USA)
- Collagen I (Invitrogen, San Diego, CA, USA)

(c) 면역염색

- Cytotoxicity assay kit (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA)
- Tetramethylrhodamin B isothiocyanate (TRITC)-phalloidin, mouse anti-connexin43, hoechst 33258, DAPI goat anti-rabbit IgG-FITC (Sigma, St. Louis. MO, USA)

2.2 ECM 의 제조

본 연구에서는 다섯 가지의 ECM(collagen, fibronectin(이하 FN), gelatin, laminin, gelatin/ fibronectin mixture)을 세포 배양 표면에 처리했다.

각 ECM 은 세포배양에 사용되는 일반적인 희석농도로 준비하였으며 간략히 설명하면 다음과 같다. Collagen 은 습식 고압 멸균 소독한 cell culture grade 의 증류수에 5µg/mL 의 농도로 희석했다. Gelatin 수용액은 cell culture grade 의 증류수에 0.02 % gelatin

(w/w) 을 넣고 습식 고압 멸균 소독하여 얻어냈다. 1%의 FN 을 습식 고압 멸균 소독한 cell culture grade 의 증류수에 5µg/ mL 가 되도록 희석한 FN 수용액을 사용했다. Laminin 또한 collagen, FN 과 동일한 방법으로 cell culture grade 의 증류수에 1µg/mL 가 되도록 희석했다. Gelatin/fibronectin 혼합수용액은 준비한 gelatin 수용액에 FN 을 199:1 의 비율로 혼합했다. 또한, ECM 처리를 하지 않은 표면에서의 HL-1 의 성장을 비교하기 위해 DPBS 로 빠르게 1 회 세척한 표면을 negative control 로 사용했다.

2.3 세포 배양

각 ECM 은 1ml 씩 35mm petri-dish 에 나누어 온도 37°C, 이산화탄소 농도 5% 의 습식 인큐베이터에서 12 시간 이상 처리했다.

계대 배양된 HL-1 은 petri-dish 표면에 배양했고, 세포 초기 농도는 3×10^5 cells/ ml 이다.

87% claycomb media, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, 1% norepinephrine, 1% L-glutamine 으로 구성된 배지를 사용했으며, 세포는 4 일간 온도 37°C, 이산화탄소 농도 5% 의 습식인큐베이터에서 배양했다.

2.4 원자 현미경(Atomic Force Microscope) 표면 측정

ECM 처리된 표면을 분석하기 위해 원자현미경(Dimension 3100, Veeco, USA)을 사용했으며, 18×18 mm cover glass 에 위에 설명한 방법과 동일하게 ECM 처리를 한 후 35mm petri-dish 에 넣어 37°C, 이산화탄소 5%의 습식인큐베이터에서 12 시간동안 처리했다. ECM 처리 후 남은 ECM 을 제거하고, 여분의 습기를 37°C 로 유지되는 대류 오븐에서 2 시간 동안 건조시켰다. 이후 ECM 으로 처리된 표면을 원자현미경으로 분석했다.

2.5 면역염색

HL-1 을 4 일간 배양한 petri-dish 를 37°C 의 DPBS 로 빠르게 2 회 세척한 후 paraformaldehyde solution (3.7% in DPBS)로 15 분간 고정했다. 이후 DPBS 로 3 회 세척 후, permeabilization solution (1% BSA and 0.3% Triton-X 100 in DPBS)으로 15 분간 blocking 했다.

배양된 세포는 filamentous actins (F-actin) 분석을 위해 TRITC-phalloidin (1:200 in DPBS)로 2°C 에서

12 시간 동안 염색했고 connexin 분석을 위해 anti-connexin 43 (1:1000 in DPBS) 으로 25°C 에서 1 시간 동안 처리한 후, FITC-secondary antibody (1:40 in DPBS)로 실온에서 1 시간 동안 처리했다. 또한, 세포 핵 관찰을 위해 DAPI(1:5000 in DPBS)로 실온에서 2 분간 처리했으며, 각 단계 후에는 DPBS 로 3 회씩 빠르게 세척했다.

염색된 세포는 mounting medium containing antifade reagent 로 처리하여 관찰했으며, 역상 형광 현미경 (Ti-U, Nikon, Japan)으로 분석했다.

2.6 세포 증식과 생존률 분석

배양 세포를 4 일간 매일 1 회씩 37°C DPBS 로 빠르게 세척하여 핵에 반응하는 Hoechst (1:1000 in DPBS, blue fluorescence)와 죽은 세포에 선택적으로 염색되는 EthD-1 (4mM, red fluorescence)으로 인큐베이터에서 15 분간 염색했다.

배양 4 일차에는 세포의 최종 생존률을 분석하기 위해 살아있는 세포를 선택적으로 염색하는 calcein AM (2mM, green fluorescence) 과 죽은 세포를 선택적으로 염색하는 EthD-1 으로 15 분간 처리하고 역상 형광 현미경으로 촬영하고, 1280 × 1024 pixel 의 다섯 영역을 임의로 선택하여 세포 수를 ImageJ (NIH, USA)를 이용하여 분석했다.

3. 결과 및 논의

3.1 ECM 표면 형태

ECM 처리된 표면을 AFM 으로 관찰한 결과를 Fig. 1 에 나타내었다. Collagen 수용액으로 처리된 표면(Fig. 1(a))은 -1.571nm ~ +2.061nm(±0.313nm)의 구조가 아주 조밀하게 생긴 것을 확인했다. FN 으로 처리된 표면(Fig. 1(b))은 ± 높 이 를 형성하였으며, 이는 다른 ECM 에 비하여 상대적으로 높이가 크고 간격이 큰 나노구조가 비교적 규칙적으로 배열되어 있음을 알 수 있다.

Laminin 수용액(Fig. 1(e))으로 처리된 표면에 형성된 나노구조는 -3.372nm ~ +5.280nm (± 0.856nm)으로 collagen 처리 표면에 형성된 구조의 분포와 조밀도는 유사하지만, 높이는 FN 처리된 표면에 형성된 나노구조와 유사했다. Gelatin 수용액 (Fig. 1(d))으로 처리된 표면에 형성된 나노구조의 높이는 -1.340nm ~ +2.333nm (±0.291nm)로 collagen 처리된 표면의 나노구조와 비슷한 높이를 보이지만 그 분포에 있어 control (Fig. 1 (f)) 표면에 형성된 -0.966nm ~ +0.516nm (±0.170nm)의 나노구조

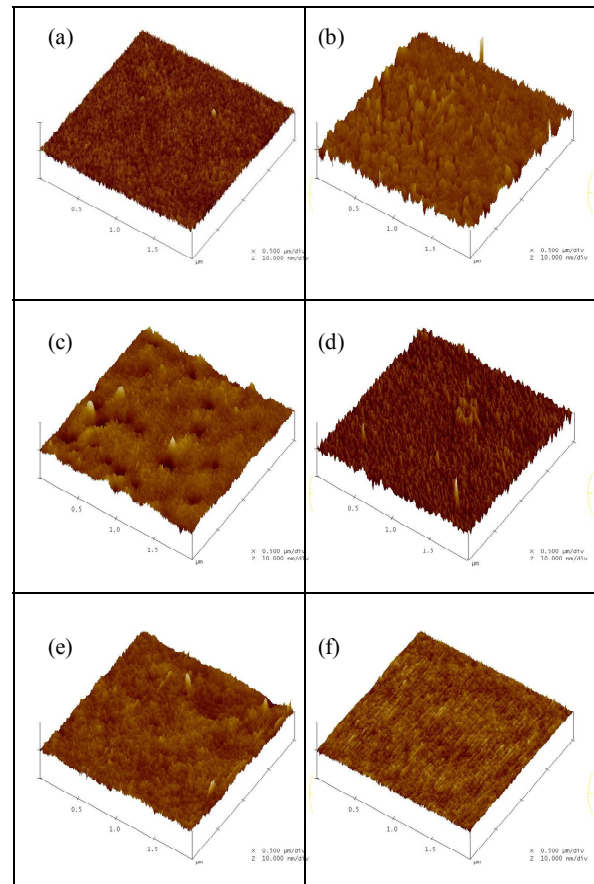


Fig. 1 3D morphological images of extracellular matrix (ECM) treated surfaces scanned by atomic force microscope (AFM). (a) 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of collagen, (b) 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of fibronectin, (c) composite of 0.02% gelatin and 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin, (d) 0.02% of gelatin (e) 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of laminin, (f) control. The scales are X=2 μm , Z=10nm

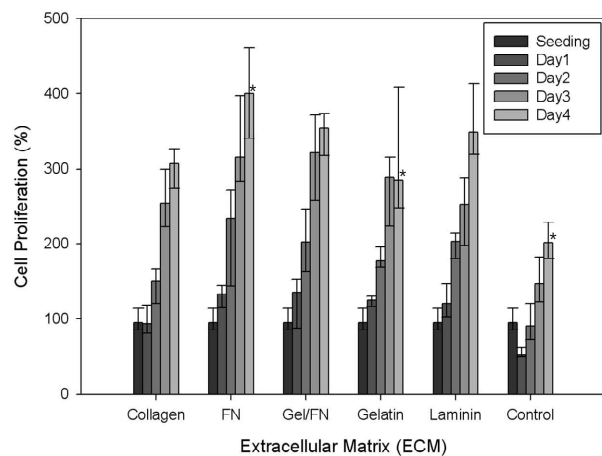


Fig. 2 Cell proliferation for 4 days. The analyzed area is 1280*1024 pixels. The initial cell density is 3 $\times 10^5$ cells/ml that is regarded 100%. (Student paired T-test, n=5, *, p<0.02)

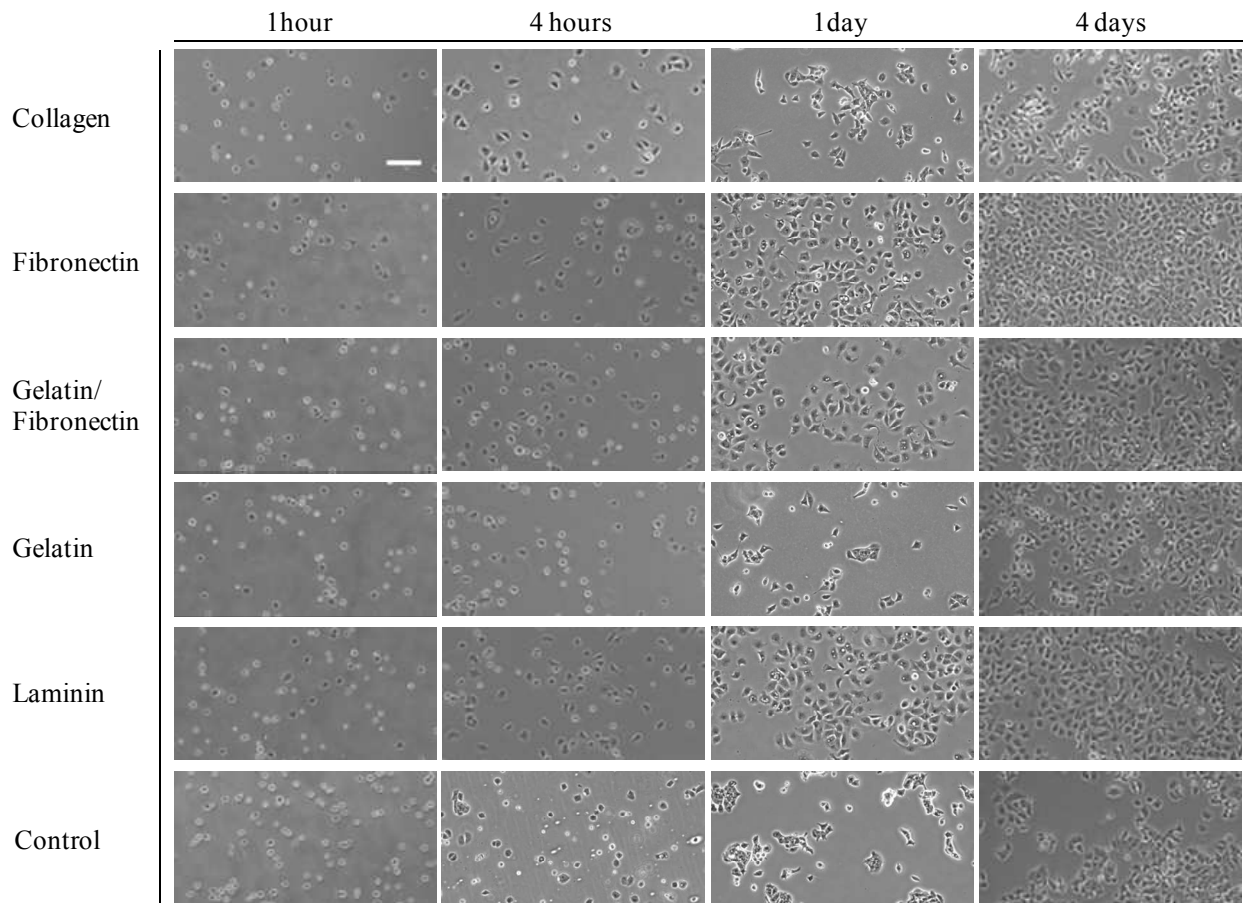


Fig. 3 Phage contrast images of HL-1 cells cultured on different surfaces at different times. (a) $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of collagen, (b) $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of fibronectin, (c) composite of 0.02% gelatin and $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin, (d) 0.02% of gelatin (e) $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of laminin, (f) control. The initial cell density is 3×10^5 cells/ml, and the scale bar is $100\mu\text{m}$

와 크기차이를 발견하기 어려웠다. 반면, Gelatin/FN 혼합 ECM (Fig. 1 (c))의 경우 다른 ECM 과는 다르게 표면에 아래방향으로 작은 구멍들이 불규칙적으로 자리잡고 있다. 흑색과 백색으로 보이는 나노구조의 높이차가 $9.1445\text{nm} \pm 2.815\text{nm}$ 로 가장 컸으며, 그 외의 표면에서는 $-1.329\text{nm} \sim +1.261\text{nm} (\pm 0.353\text{nm})$ 의 나노구조가 고르게 분포했다. 여기서는 순수 생물체제 단백질 ECM 과는 다른 높이차가 큰 패턴이 발견되었는데 이는 이종의 ECM 간의 화학적인 반응에 대한 결과로 유추된다.

3.2 ECM 표면에서의 세포 부착 및 성장

세포 배양 후 HL-1 의 표면 부착을 분석한 결과 배양 1 시간후 FN 처리된 표면에 HL-1 의 부착이 가장 빨랐으며, laminin 또한 상당히 빠른 부착을 보였다. 세포 배양 후 4 시간 경과 후에는 대부분의 세포가 ECM 처리된 표면에 부착하였지만, gelatin 의 경우 control 과 비교했을 때 그 부착 정도가 비슷하거나 조금 떨어지는 양상을 보였다.

세포 배양 1 일차부터는 ECM 에 의한 증식이 분명하게 차이를 보이고, collagen 과 gelatin 의 경우 배지 교환시 미부착된 세포가 제거되면서 증식하고 있는 세포의 수가 다른 ECM 에 비해 현저하게 작았다. 세포 배양 4 일차에는 ECM 에 의한 영향으로 인해 FN 처리 표면에 배양된 세포의 성장 및 분포가 높았으며, laminin 과 gelatin/FN 혼합 ECM 으로 처리된 표면에 배양된 세포의 증식도 양호한 결과를 나타냈다.

Control 에서 배양된 HL-1 은 파종 후 표면에의 부착이 ECM 처리한 표면에과중한 세포보다 상대적으로 오랜 시간이 소요되었으며, 시간이 지남에 따라 그 성장이 표면에 고르게 부착하지 못하고, 군집을 이루어 성장하는 것을 확인할 수 있었다.

3.3 세포 증식과 세포 생존률

세포 파종후 4 일간 세포의 증식 및 생존률을 Hoechst 와 EthD-1 형광 염색으로 분석한 결과 각 ECM 의 HL-1 의 증식에 대한 영향을 알 수 있다

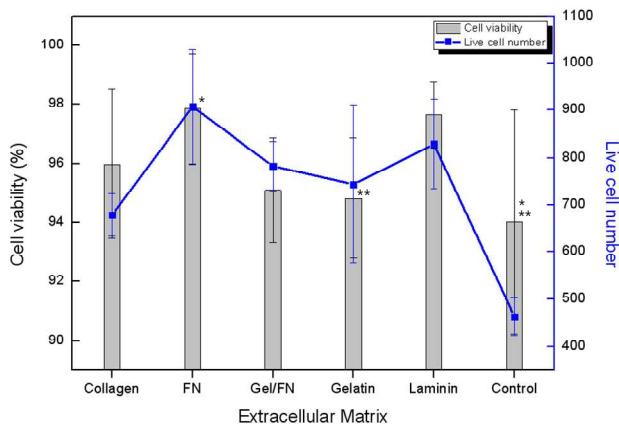


Fig. 4 Cell viability and live cell number after 4 days after seeding. (Student paired T-test, n=5, *, p<0.05, **, p<0.01)

(Fig. 2). 초기 세포 농도를 100%로 정의하고 각 관찰주기에 따라 세포의 증식을 분석하였다. Collagen, FN, gelatin 과 gelatin/FN 혼합 ECM 으로 처리된 표면에 배양된 세포의 경우 배양 2 일째에서 3 일째에 증식률이 크며, laminin 에서 자란 세포는 고른 증식 패턴을 가진다.

DPBS 로 세척한 표면에서 자란 세포는 seeding 1 일 후 세포의 수가 줄어들었음을 확인할 수 있는데, 이는 표면과의 약한 상호작용에 의해 세포가 바닥으로 미처 부착하지 못하고 부유하여 배지교체 및 세정과정 중 손실되었을 것으로 예상된다. FN 으로 처리된 표면에서 세포의 증식이 가장 활발하였고, laminin 과 gelatin/FN 혼합 ECM 이 비슷한 양상을 보였으며, collagen 과 gelatin, control 순이었다.

다음으로 세포의 생존률을 다음의 계산식으로 정의하여 분석하였다.

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{Live\ cell\ number}{Total\ cell\ number} \times 100 \quad (1)$$

세포 생존률 또한 FN 으로 처리된 표면에서 가장 높은 수치 (Fig. 4)를 보였으며, Laminin 이 그 뒤를 이었다. 다른 ECM 에 있어 증식과는 다르게 collagen 이 gelatin 이나 gelatin/FN 혼합 ECM 보다 높은 생존률을 나타냈다.

모든 실험군에서 90%이상의 세포생존률을 보였지만, 서로 다른 ECM 에서 배양된 HL-1 세포의 분열속도가 다르다는 것을 세포 증식 분석(Fig. 3)을 통해 알 수 있었고, 특히 control 의 경우 표면에 미부착 되었거나, 표면과의 약한 상호작용에 의하여

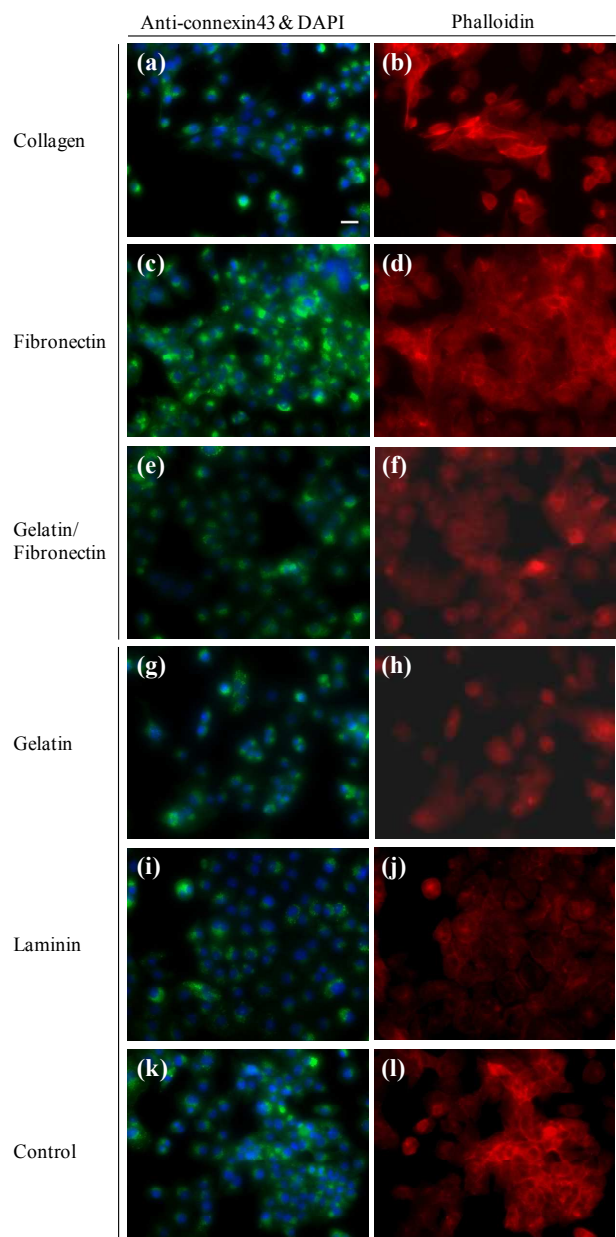


Fig. 5 Fluorescence images of HL-1 cells immunostained with anti-connexin43(green, connexin43) DAPI (blue, nuclei), and phalloidin(red, F-actin) on different ECMs at day 4. The scale bar is 20 μm

세포손실은 계산에 적용하지 않아 높은 생존률을 보인 것으로 예상된다.

3.4 면역염색 분석

Anti-connexin43 (세포간 상호작용 발현 분석) 과 phalloidin (심근섬유 근육단백질 발현) 면역염색으로 HL-1 의 표현형을 분석하였다. FN 으로 처리된 표면에 배양된 세포의 경우, 근육필라멘트 (F-actin)의 형성과 (Fig. 5(d))과 connexin43 단백질의 발현 (Fig. 5(c))정도로 보아 근육섬유의 형성과 세포간 상호작용이 뛰어난

것을 알 수 있다.

Laminin 의 경우 세포의 경우 증식 (Fig. 3)과 세포 생존률 (Fig. 4)의 은 양호하지만, 심근섬유의 형성 (Fig. 5(j)), 세포간 상호작용 (Fig. 5(i))이 약한 것으로 나타났다. Collagen 의 경우 심근섬유의 형성이 활발 (Fig. 5 (b))하나 세포간 상호작용이 약하다 (Fig. 5(a)).

Gelatin 은 다른 ECM 에 비해 증식한 세포의 수가 적고 세포간 간격이 크게 분포되어 있어 심근섬유의 형성이나 세포간 상호작용을 비교하기 어렵다.

Gelatin/FN 혼합 ECM 은 laminin 에 배양한 경우와 비교하였을 때, 증식과 생존률은 낮은 수치 (Fig. 3, 4)를 보였지만, 형질 발현 (Fig. 5(f))에 있어서 좋은 결과를 보였다.

Control 표면에서 HL-1 을 배양한 결과 세포간의 강한 결합 (Fig. 5(k))으로 인하여 근육섬유 단백질의 형성이 조밀하였으나 세포 배양 1 일 후의 증식 정도 (Fig. 3)로 미루어 보아 표면과의 결합이 잘 이루어지지 않음을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 서로다른 ECM 으로 처리된 세포배양표면에 HL-1 을 4 일간 배양하고 Hoechst, EthD-1 형광 염색으로 세포의 분열 및 증식과 생존률을 분석하였고 phalloidin, anti-connexin 43, DAPI 형광염색으로 HL-1 의 형질을 관찰하였다.

우선 ECM 처리표면의 물리적 형태를 AFM 으로 분석한 결과 각각의 ECM 으로 처리된 표면이 서로 상이한 나노구조를 형성하고 이는 세포성장애 물리적인 영향을 미칠것으로 예상된다.

본 연구를 통해 HL-1 의 성장에는 ECM 이 반드시 필요하고, HL-1 의 생존률과 성장 속도가 ECM 에 의해 각기 다른 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. ECM 으로 처리한 표면에서는 control 표면에 비해 세포의 성장속도가 빠르고, 세포증식 또한 고른 분포를 보였다.

FN 으로 표면을 처리한 경우 세포의 표면에 대한 원활한 부착 및 세포의 증식이 높게 나타났으며 심근섬유의 형성이 효과적으로 이루어짐을 알 수 있다. 또한, 세포의 성장 및 분열이 수직방향으로도 이루어지는 것을 현미경 관찰을 통해 확인했다. 이는 3 차원으로 제작된 챔버 또는 디바이스에서 심근세포를 배양할 때 효과적인 것이라고 예상된다.

Laminin 으로 표면을 처리한 경우 또한 세포가 표면에 부착하는 정도와 그 생존률이 높은 결과를 나타냈다.

Control 표면에서 자란 HL-1 은 ECM 이 존재하지 않으므로 세포와 표면간의 상호작용이 약하고, 이로 인해 세포간의 강한 상호작용에 의해 균집을 이루어

성장하는 것을 볼 수 있었다.

본 연구를 통하여 초기농도가 같은 세포를 배양하더라도 각 ECM 의 영향에 따라서 세포가 표면으로의 부착하는데 소요되는 시간 및 배양 시간에 따른 개체 수가 달라짐을 확인했다. 이는 ECM 에 따라 세포의 분화 속도 (Doubling time)가 달라지는 것을 의미하는 것이라고 할 수 있다. 또한, 서로 다른 ECM 위에서 배양된 세포는 F-actin 과 C43 단백질의 발현에도 차이를 나타냈다.

이러한 결과는 추후 HL-1 뿐만 아니라 다양한 심근세포 관련연구에 기초자료로 활용될 수 있으리라 기대된다.

후 기

이 논문은 2010 년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2010-0021066, NRF-2010-220-D00014)

참고문헌

- (1) Rosso, F., A. Giordano, M. Barbarisi, and A. Barbarisi, 2004, "From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering," *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 199, No. 2, pp. 174~180.
- (2) Huh, D., B.D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H.Y. Hsin, and D.E. Ingber, 2010, "Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip," *Science*, Vol. 328, No. 5986, pp. 1662~1668.
- (3) Jang, K.J. and K.Y. Suh, 2010, "A Multi-Layer Microfluidic Device for Efficient Culture and Analysis of Renal Tubular Cells," *Lab on a Chip*, Vol. 10, No. 1, pp. 36~42.
- (4) Hwang, C.M., Y. Park, J.Y. Park, K. Lee, K. Sun, A. Khademhosseini, and S.H. Lee, 2009, "Controlled Cellular Orientation on PLGA Microfibers with Defined Diameters," *Biomedical Microdevices*, Vol. 11, No. 4, pp. 739~746.
- (5) Wang, Y.J., X.T. Shi, L. Ren, Y.C. Yao, and D.A. Wang, 2010, "In Vitro Osteogenesis of Synovium Mesenchymal Cells Induced by Controlled Release of Alendronate and Dexamethasone from a Sintered Microspherical Scaffold," *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, Vol. 21, No. 8-9, pp. 1227~1238.
- (6) Sato, K., K. Mawatari, and T. Kitamori, 2008, "Microchip-Based Cell Analysis and Clinical Diagnosis System," *Lab on a Chip*, Vol. 8, No. 12, pp. 1992~1998.
- (7) Heidi Au, H.T., B. Cui, Z.E. Chu, T. Veres, and M. 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.
- (8) Kim, D.H., E.A. Lipke, P. Kim, R. Cheong, S. Thompson, M. Delannoy, K.Y. Suh, L. Tung, and A. Levchenko, 2009, "Nanoscale Cues Regulate the Structure and Function of Macroscopic Cardiac Tissue Constructs," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 107, No. 2, pp.565~570
- (9) Kim, D.H., P. Kim, I. Song, J.M. Cha, S.H. Lee, B. Kim, and K.Y. Suh, 2006, "Guided Three-Dimensional Growth of Functional Cardiomyocytes on Polyethylene Glycol Nanostructures," *Langmuir*, Vol. 22, No. 12, pp. 5419~5426.
- (10) Miskon, A., T. Ehashi, A. Mahara, H. Uyama, and T. Yamaoka, 2009, "Beating Behavior of Primary Neonatal Cardiomyocytes and Cardiac-Differentiated P19.CL6 Cells on Different Extracellular Matrix Components," *Journal of Artificial Organs*, Vol. 12, No. 2, pp. 111~117.
- (11) Akhyari, P., H. Kamiya, A. Haverich, M. Karck, and A. Lichtenberg, 2008, "Myocardial Tissue Engineering: the Extracellular Matrix," *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Vol. 34, No. 2, pp. 229~241.
- (12) Xiong, Y., Y.S. Zeng, C.G. Zeng, B.L. Du, L.M. He, D.P. Quan, W. Zhang, J.M. Wang, J.L. Wu, Y. Li, and J. Li, 2009, "Synaptic Transmission of Neural Stem Cells Seeded in 3-Dimensional PLGA Scaffolds," *Biomaterials*, Vol. 30, No. 22, pp. 3711~3722.