

배양 중 심장근육세포와 심장근육모세포주 H9c2세포의 세포사이결합의 형성

박정현, 강한솔, 박민철, 김대중, 한장희,
성훈기¹, 김주영², 송인환², 성언기², 이웅창²

강원대학교 의과대학 해부학교실.

¹해군 해양의료원, ²영남대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 허혈성 심장질환에 대한 세포이식의 시험관내 모델을 개발하기 위하여 신생 흰쥐에서 심장근육세포를 직접 분리하여 배양한 후 심장근육모세포주인 H9c2세포와 혼합배양하였다. 각각 기능적으로 세포의 동시박동(synchronous beating)이 일어나는지와 그와 밀접한 관련이 있는 구조적인 장치인 세포사이결합의 형성 및 세포골격단백과의 상관관계를 분석함으로써 심장재생과 관련된 심장근육모세포의 분화과정을 규명하고자 하였다. 배양 과정에서 심장근육세포와 접하고 있는 H9c2세포는 증식이 거의 일어나지 않았다. 심장근육세포들은 동시수축을 하였지만 H9c2세포와 접하고 있는 심장근육세포의 경우 그 수축력과 빈도가 감소되는 것을 알 수 있었다. 심장근육세포와 접하고 있는 H9c2세포는 심장근육세포의 수축에 따라 피동적인 움직임만 관찰되었고 자체의 수축은 일어나지 않았다. 심장근육세포와 H9c2의 세포막이 접하고 있는 부위에서의 F-actin의 분포는 각각의 세포를 단독 배양한 경우보다 감소하였다. 또한 세 종류의 세포사이결합들도 모두 그 부위에서는 뚜렷한 반응을 보이지 않는 반면, 인접한 심장근육세포들 사이에는 여전히 뚜렷한 세포사이결합을 형성하고 있었다. H9c2와 접하고 있는 심장근육세포 모두에서 가는근육미세섬유의 분포가 감소하였다. 또한 교통반점, 부착판, 부착반점 등 세 종류의 세포사이결합도 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험 결과를 통하여 심장근육모세포주인 H9c2는 심장근육세포와 혼합배양을 통하여 분화가 유도되지 않았고 심장근육세포와의 세포사이결합도 형성되지 않았다. 향후 분화와 관련된 전사인자들(Nkx2-5, GATA4, Tbx5, Tbx12, dHand 등)과 세포사이결합에 관련된 인자들의 발현을 조절하여 심장근육세포로의 분화를 유도하는 시도가 있어야 할 것이다. 본 실험은 다양한 심장질환에 대한 획기적인 치료방법으로 대두되고 있는 세포이식에 대한 기초자료로 향후 진행될 세포이식의 실험모델을 구축하는 데 바탕이 될 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : 심장근육세포, H9c2세포, 공동배양, 세포사이결합

서 론

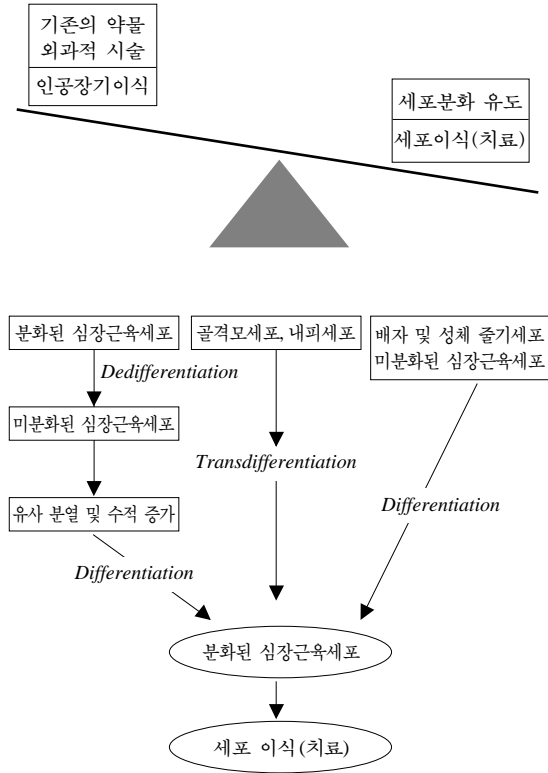
허혈심장질환(ischemic heart disease, IHD)의 치료에 있어 기존의 약물이나 내·외과적 수술방법으로는 치유에 한계가 있고 이를 대체할 수 있는 새로운 치료방법이 절실히 요구되고 있다. 최근 분자생물학과 관련 생명공학기술의 발달로 인하여 의학분

야의 발전이 더욱 가속화되었고, 심혈관계 질환에서도 질병발생의 기전을 규명할 뿐만 아니라 새로운 치료제의 개발을 통한 질병의 정복을 위해 많은 연구들이 진행되고 있다.

최근 생명공학분야의 큰 주제로 부상하고 있는 줄기세포(stem cell)나 심장근육이 아닌 미분화세포(undifferentiated cell)를 이용하여 허혈성 손상을 받은 심장근육층에 직접 주입하여 심장근육세포로 분화하게 만드는 이른바 ‘세포이식(cell transplanta-

교신저자: 박정현(강원대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: jhpark@cc.kangwon.ac.kr

허혈성 심장질환의 치료법의 연구경향



tion)'이 획기적인 치료법으로 각광을 받고 있다 (Condorelli 등 2001, Kehat 등 2001, Orlic 등 2001, Toma 등 2002). 그러나 현재까지의 세포이식과 관련된 연구결과에는 많은 제한점이 내재되어 있다. 우선 인체에서 세포이식의 대상이 되는 줄기세포나 미분화세포들을 확보하기가 쉽지 않고, 특히 배아에서 줄기세포를 얻어내는 것은 윤리적인 문제까지 야기시킬 수 있다 (Hescheler와 Fleischmann 2001). 그리고 줄기세포나 미분화세포가 심장근육세포로 분화하는 비율이 매우 낮고 그 기전에 대해서도 완전히 밝혀지지 않은 상황이다. 뿐만 아니라 심장근육조직은 다른 조직과 달리 규칙적이고 강한 수축을 지속적으로 하고 있어 세포이식을 시행할 경우 대부분의 이식된 세포는 기능적·구조적 조화를 이루지 못하고 괴사나 자연사의 과정으로 빠져들어 손실되게 된다. 따라서 줄기세포에서 심장근육세포

로 분화시키는 방법이 우선 확립되어야 하고 세포이식의 이상적인 모델을 구축하여 그 제한점들을 해결하는 것이 임상적인 적용에 선행되어야 할 것이다.

심장근육세포에는 교통반점 (gap junction) 뿐만 아니라 부착판 (adherent junction)과 부착반점 (desmosome)도 분포하며 정상적으로 이들은 사이원반 (intercalated disc)에서 모두 나타나게 된다. 심장근육세포를 심장에서 효소를 이용하여 일차배양하면 배양시간에 따라 사이원반의 형성이 진행된다. 그 형성 과정에 따른 세 종류의 세포사이결합들의 상호작용과 출현시기 등에 관심이 집중되고 있다 (Zuppinger 등 2000). 이런 연구는 각 세포사이결합의 표지물질 (marker), 즉 Connexin43 (gap junction), N-cadherin (adherent junction), desmoplakin (desmosome) 등을 이용하여 연구되었다 (Angst 등 1997). 사이원반은 오래전부터 기계적인 지지기능을 한다고 널리 알려져 왔지만, 심장의 발생, 기능유지, 환경에 따른 적응 등과의 관련성이 알려지면서 부각되었다. 특히 최근에는 사이원반이 울혈심부전증 (congestive heart failure)이나 심근병증 (cardiomyopathy) 등에서 재형성 (remodelling) 과정에서 미세구조의 변화가 관찰됨에 따라 그 중요성이 증가하였다.

심장의 전기적 활성은 교통반점의 기능에 의존한다. 심장에서의 교통반점은 특수화된 막의 일부분으로서 물리적, 전기적, 대사적으로 심장근육세포 사이를 연결하는 통로의 역할을 한다. 교통반점은 두 개의 반통로 (hemichannel; connexon)로 이루어져 있고, 각 반통로는 6개의 코넥신 (connexin)으로 형성되어 있어 세포사이의 물질이나 이온의 교환을 위한 통로를 만든다. 그 통로에 의하여 세포의 분화, 발생, 대사적 항상성, 전기적 흥분전달에 관여하게 된다. 특히 전기적인 자극의 전달 장애를 초래할 경우 심한 부정맥을 형성하며 이는 허혈심부전증이나 비대형 심근병증 등에서 나타나는 부정맥의 원인을 제공한다 (Severs 1994, Sepp 등 1996). 종 (species)이나 배자의 발생단계에 따라 차이가 있지만, 설치류의 심장근육세포에는 여러 종류의 코넥신들이 분포하는 것으로 알려져 있지만 현재까지는 코넥신40, 43, 45 등이 밝혀져 있다 (Beyer 등 1987, Kanter 등

1992). Connexin43은 심혈관계통의 교통반점에서 가장 풍부한 코넥신으로 심방과 심실에서 모두 관찰되는 반면, 코넥신40은 특수화된 전도계통과 심방의 교통반점에 풍부하고, 코넥신45의 발현에 대해서는 잘 알려져 있지 않다(Saffitz 등 1995). Darrow 등 (1995)은 신생 흰쥐의 심근세포에서 코넥신43과 코넥신45의 분포를 확인하였고, 수명이 짧아 빨리 교체되며 따라서 심장의 재형성에도 관여할 것으로 보고하였다. 한편 교통반점의 구조적인 특성을 이용하여 세포막에는 투과성이 없고 단지 교통반점에만 투과성을 보이는 염색약물 (lucifer yellow, lissamine rhodamine, propidium iodide, DAPI)을 이용하여 세포사이의 교통반점의 수나 물질 이동속도 등을 측정하고 있다(Safranyos 등 1987, Elfgang 등 1995, Cao 등 1998). 그러나 이런 실험방법은 편차가 심하고 연구자의 경험에 의존하는 경향이 있다. 따라서 최근에는 세포막을 통과한 후 세포내에서 효소에 의하여 교통반점으로만 이동이 가능한 여러 가지 약물이 개발되었고, 유세포분석을 통하여 편차가 작은 결과를 얻음으로써 교통반점에 대한 연구가 보다 활발해졌다(Czyz 등 2000).

본 연구에서는 허혈심장질환에 대한 세포이식의 시험관내 모델을 개발하기 위하여 신생 흰쥐에서 심장근육세포를 직접 분리하여 배양한 후 심장근육모세포 세포주인 H9c2와 혼합배양하여 1) 심장근육세포와 심장근육모세포 각각에서 기능적으로 세포의 동시박동 (synchronous beating)이 일어나는지 유·무와 빈도를 관찰하고, 2) 동시박동이 일어난다면 그와 밀접한 관련이 있는 구조적인 장치인 세포사이결합 - 교통반점, 부착판, 부착반점-들의 형성 유·무와 세포골격단백질과의 상관관계를 분석함으로써 심장재생과 관련된 심장근육모세포의 분화과정을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험 동물로는 생후 3일 된 Sprague-Dawley 중의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다. 혼합배양을

위하여 사용한 H9c2세포주(ATCC)는 흰쥐의 심장에서 분리한 심장근육모세포로서 조건에 따라 골격근육세포나 심장근육세포로 분화한다고 알려져 있는 세포주이다. 심장근육세포와 H9c2세포는 모두 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco)에 배양하였으며 공통적으로 FBS (fetal bovine serum, Hyclone)를 10%로 첨가한 후 사용하였다.

세포의 전반적인 형태관찰은 도립위상차현미경 (Olympus)을 사용하였다. 세포사이결합 (intercellular junction)의 형성 유무는 면역염색으로 관찰하였다. 1차 항체는 anti-connexin43 Ab (Chemicon), anti-desmoplakin Ab (Serotec), anti-N-cadherin Ab (Biosciences) 등으로 표지를 하였고, 2차 항체 anti-rabbit IgG Texas Red (Jackson), anti-mouse IgG FITC (Becton Dickinson)로 염색하였으며 phalloidin-FITC 혹은 phalloidin-TRITC (Sigma)로 F-actin을 이중 염색 하였다. 전자현미경시약으로는 OsO₄, glutaraldehyde, propylene oxide 및 Poly/Bed 812, MNA, DDSA, DMP-30 (Polysciences), uranyl acetate (Sigma), lead citrate (Sigma)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 심장근육세포의 일차배양

생후 3일 된 흰쥐로부터 심실만을 모아 1 mm 두께로 잘게 썰어 4°C의 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 세척한 후 세포분리효소인 0.125% collagenase (Worthington Biochemical Co.)를 넣고 60~100회/분의 속도로 교반하였다. 처음 5분간 처리한 용액은 버리고 새로운 collagenase를 넣고 15분동안 처리한 후 상층액을 취하여 얼음 위에 저장하였고 이러한 일련의 조작을 4회 반복하였다. 각각을 원침하여 상층액을 제거하고, 남아있는 세포덩어리에 배양액인 FBS가 포함된 DMEM으로 충분히 섞어주었다. 세포수가 4 × 10⁵개/ml가 되도록 희석하여 배양용기에 옮겨 90분간 배양하였다. 배양용기의 부유액을 다시 모아 원침한 후 상층액을 제거하고, 남아 있는 세포덩어리를 10⁵개/cm²가 되도록 희석하여 배양용기에 배양하였다.

2) 단독배양과 혼합배양

각각 일차배양한 심장근육세포와 H9c2세포는 각각 다른 배양용기에서 배양하였다. 혼합배양을 위해서는 먼저 배양 중인 H9c2세포를 trypsin-EDTA로 분리한 후 배양 2일 된 심장근육세포에 1:1의 비율로 첨가하고 2일간 배양하며 그 변화를 도립위상차 현미경과 디지털카메라로 관찰하였다.

3) 세포사이결합 표식자를 이용한 면역형광염색

단독배양과 혼합배양한 세포를 인산완충용액으로 세척한 후 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하였다. 다시 인산완충용액으로 2회 세척하고 0.05% Triton-100을 이용하여 투과성을 증진시켰다. 0.1% Bovine serum albumin이 첨가된 인산완충용액에 넣고 2시간동안 상온에서 처리한 후, 1차 항체를 처리하여 37°C 배양기에서 2시간동안 반응시켰다. 1차 항체는 anti-connexin43 Ab와 anti-desmoplakin Ab는 1:200으로 희석하여 사용하였고, anti-N-cadherin Ab는 1:12.5로 희석하였다. 2차 항체 anti-rabbit IgG Texas Red, Anti-mouse IgG FITC를 1:1000으로 희석하여 염색하였으며, actin의 분포와의 상관관계는 phalloidin-FITC 혹은 phalloidin-TRITC (Sigma)로 이중염색하여 공초점현미경 (confocal microscope, Olympus)으로 관찰하였다.

4) 전자현미경 표본제작

인산완충용액으로 세척한 후 2.5% glutaraldehyde로 전고정하고 1% OsO₄에서 후고정하였다. 에탄올로 순차적인 탈수과정을 거친 후 propylene oxide로 치환하였다. 포매제인 epoxy resin에 포매하여 60°C 배양기에서 48시간 중합하였다. 완전히 중합된 표본을 적당한 크기로 다듬어 다이아몬드칼을 이용하여 80 nm 두께의 절편을 만들었다. 절편들은 uranyl acetate와 lead citrate에 이중염색을 하여 투과 전자현미경 (H-7000B, Hitachi)으로 관찰하였다.

결 과

1. 세포의 형태 변화

신생 흰쥐에서 분리한 심장근육세포는 배양 6시

간 이후 배양용기에 부착하여 세포질돌기를 뺀고 있었다. 핵은 세포의 중앙에 위치하였고 핵안에서 핵소체가 뚜렷하게 관찰되었다. 세포안에서 세포의 장축과 평행하게 달리는 실 모양의 다발이 관찰되었고 세포의 수축에 따라 그 분포가 변하였다. 세포의 수축은 불규칙적이었고 수축 강도도 다양하게 나타났다. 배양 24시간에는 세포의 수축이 규칙적이었고 무리마다 동시수축 (synchronous contraction)이 나타났다 (Fig. 1A). H9c2세포는 세포의 수가 적을 경우 다각형의 불규칙한 모양을 취하며, 단층을 형성하는 경우 방추형으로 관찰되었다. 핵 주위에 검은 과립들이 분포하며 세포의 가장자리는 검게 나타났다 (Fig. 1B).

심장근육세포와 H9c2세포의 혼합배양의 경우, 이미 일차배양한 심장근육세포만을 배양용기에 심은 후 24시간이 경과하여 H9c2를 첨가하였다. H9c2세포는 첨가된지 1~2시간 만에 배양용기에 부착하였고 세포질돌기를 뺀고 있었다. 혼합배양 24시간 후 독립적인 세포무리를 형성하는 심장근육세포는 크기가 다소 증가하였으며, 세포질돌기들이 이웃세포들로 뺀으며 세포사이의 결합도 형성하였다. 심장근육세포의 수축은 규칙적이었고 점차 수축과 이완에 따른 세포의 길이 차이가 심해졌고, 수축횟수가 늘어나는 것을 알 수 있었다. 그러나 세포의 증식은 일어나지 않았다. 심장근육세포와 접촉이 없는 H9c2세포도 정상적인 증식을 하여 점차 그 수가 증가하였다.

심장근육세포와 접하고 있는 H9c2세포는 단독배양시 관찰되던 세포 형태를 유지하였지만 증식은 거의 일어나지 않았다. 심장근육세포들은 동시수축을 하였지만 H9c2세포와 접하고 있는 심장근육세포의 경우 그 수축력과 빈도가 감소되는 것을 알 수 있었다. 심장근육세포와 접하고 있는 H9c2세포는 심장근육세포의 수축에 따라 피동적인 움직임은 관찰되었으나 자발적인 수축은 일어나지 않았다 (Fig. 1C).

2. 세포사이결합의 형성

심장근육세포와 H9c2세포를 각각 단독배양 하였을 때 정상적인 심장조직에서 잘 발달되어 있는 세

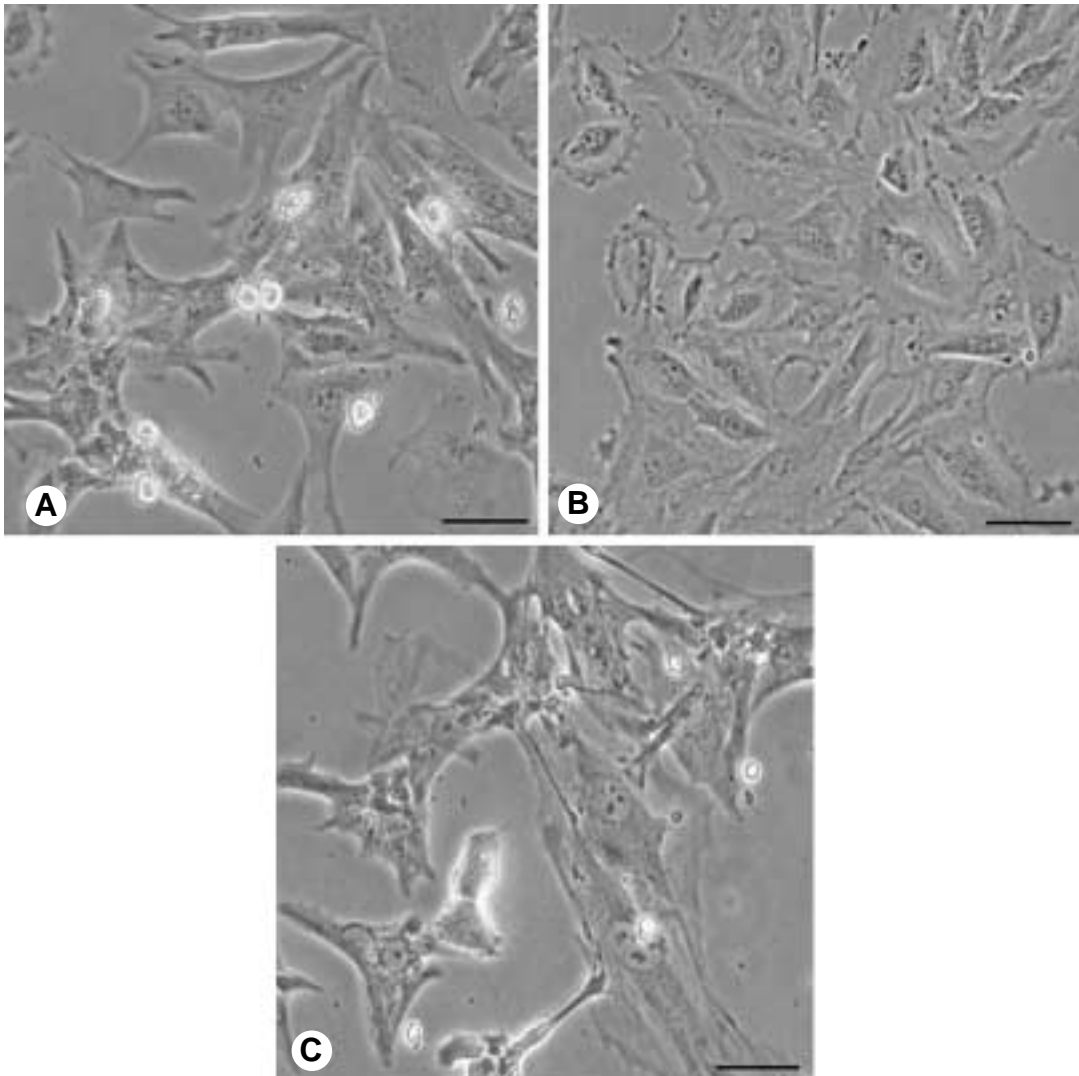


Fig. 1. Phase-contrast photomicrographs of cultured neonatal rat cardiomyocytes (A), H9c2 cells (B) and co-culture (C) ($\times 400$). In co-culture, cardiomyocytes are contact with H9c2 cells by cytoplasmic processes (arrowhead). Scale bar : $40 \mu\text{m}$.

포사이결합들인 교통신접, 부착반점, 부착판의 분포를 확인한 후 혼합배양에 따른 변화를 관찰하였다. 각 세포사이결합의 표식자인 connexin43(교통신접), desmoplakin(부착반점), N-cadherin(부착판) 등에 대한 항체를 사용하였으며 F-actin 분포와의 상관관계는 phalloidin-FITC 혹은 phalloidin-TRITC로 이

중염색하여 관찰하였다.

심장근육세포에서 부착판과 부착반점은 세포와 세포사이의 세로축의 양쪽 끝에 경계를 따라 뚜렷한 선모양의 강한 반응이 나타났고 세포들이 접하고 있는 가쪽면에도 작은 덩어리 형태의 반응이 산재해 있었다. 교통신접은 세포의 가쪽면에서 주로

반점(dot)의 형태로 나타났으나 그 분포는 부착판이나 부착반점보다 흩어져 있었다. Phalloidin 염색을 한 결과 세포의 세로축을 따라 F-actin이 다발로 배열되어 있는 것을 알 수 있었고, 가로무늬(striation)도 뚜렷이 관찰되었다. H9c2는 심장근육세포에서 관찰되던 세 종류의 세포사이결합들이 모두 관찰되지 않았고, F-actin은 세포의 세로축을 따라 배열되어 있었으나 그 굵기가 가늘고 발달 정도가 심장근육세포보다는 미약하였다. 가로무늬의 관찰도 어려

웠다(Fig. 2).

심장근육세포와 H9c2세포의 세포막이 접하고 있는 부위에서 F-actin의 분포는 각각의 세포를 단독 배양한 경우보다 감소하였다. 또한 세 종류의 세포사이결합들도 모두 그 부위에서 뚜렷한 반응을 보이지 않는 반면, 인접한 심장근육세포들 사이에서는 여전히 뚜렷한 세포사이결합을 형성하고 있었다(Fig. 2).

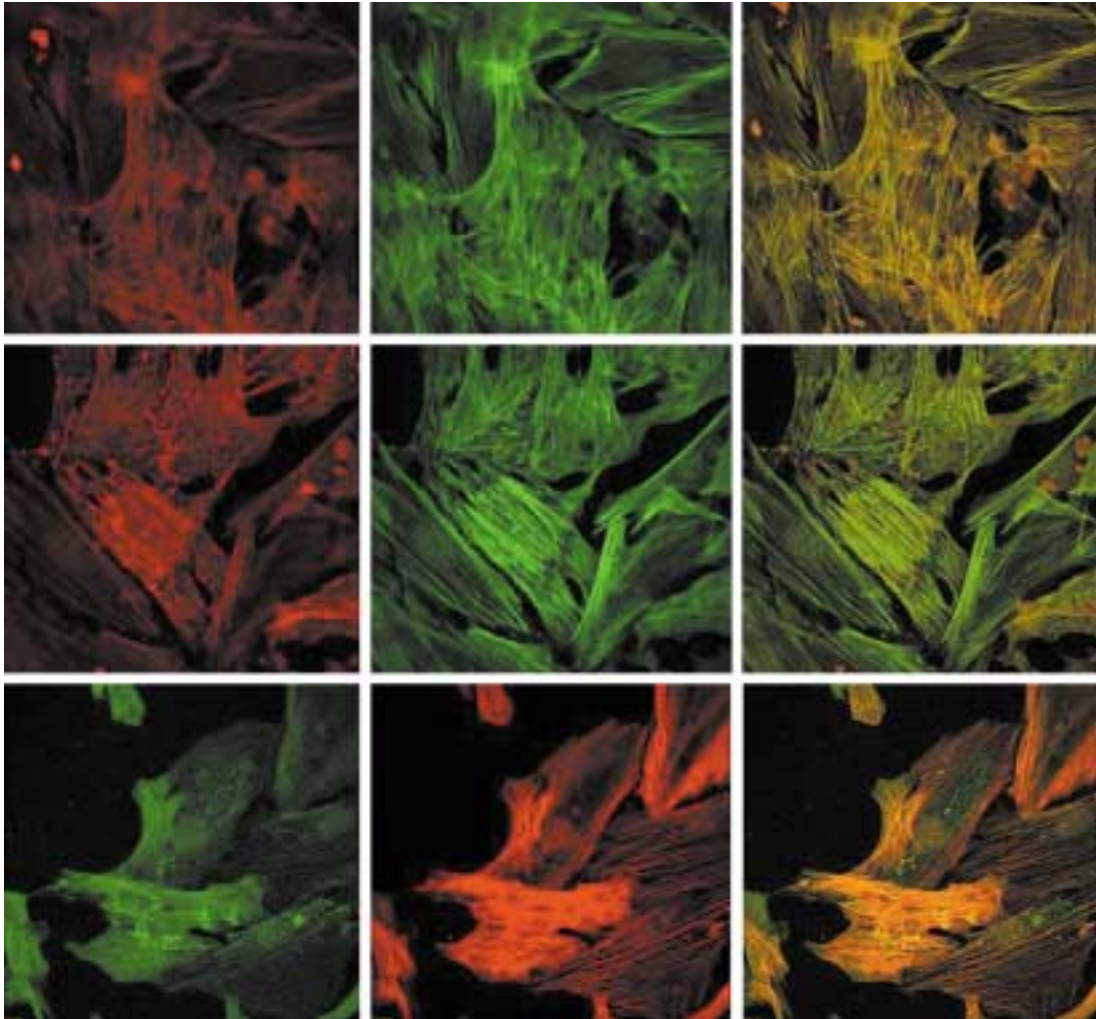


Fig. 2. Co-localization of connexin 43 (gap junction), desmoplakin (desmosome), N-cadherin (adherent junction) with F-actin in neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells co-culture. Scale bar : 20 μ m.

3. 투과전자현미경소견

정상 심장근육세포에서 핵소체가 핵속의 중앙에 위치하고 핵막 주위에는 층판상의 골지복합체가 발달되어 있었다. 또한 사립체는 밀집된 형태로 나타

났으며 근육원섬유(myofibril)가 발달된 부분에서 세로축을 따라 분포하였다. 사립체 능선은 바탕질의 전자밀도가 높아 뚜렷하지 않았다. 근육원섬유는 핵과 사립체의 무리가 있는 부위를 제외한 세포의 대

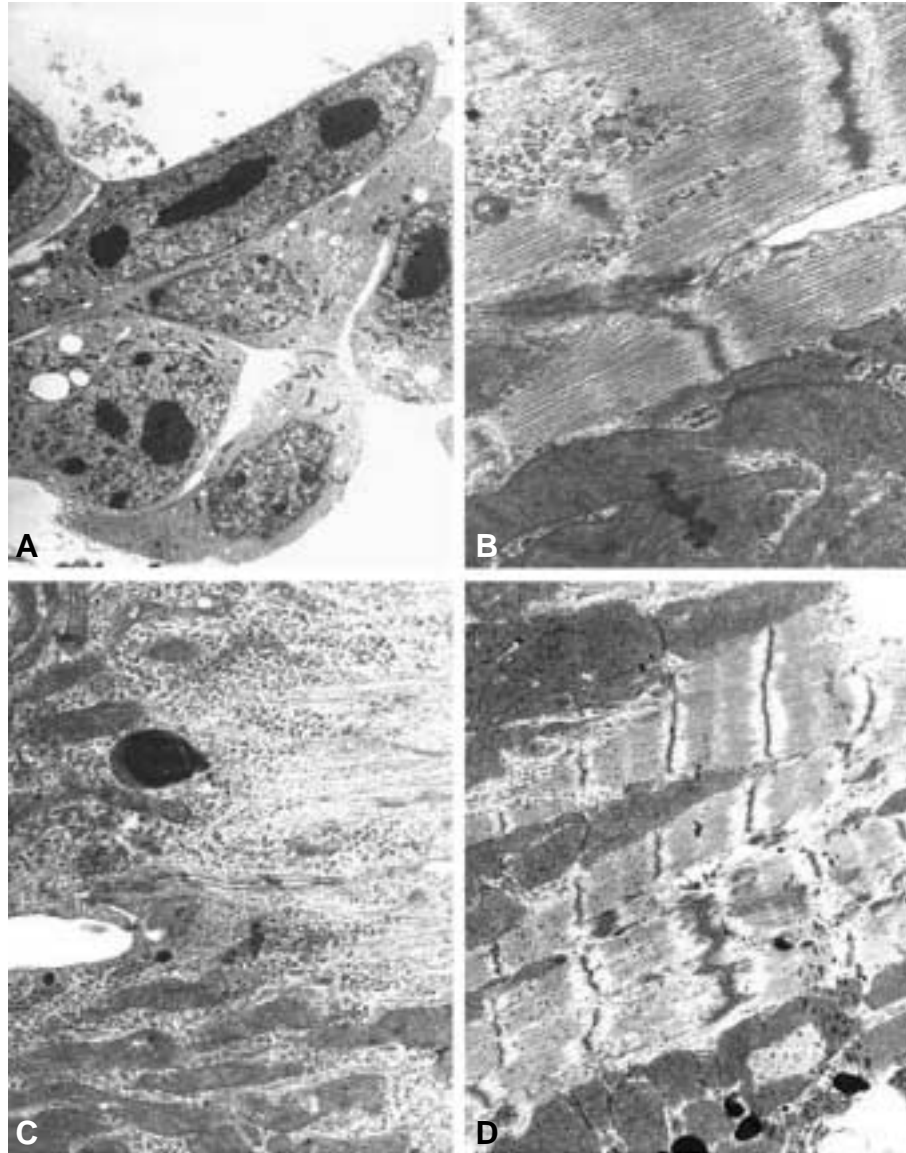


Fig. 3. Electron micrographs of cultured H9c2 cell and neonatal rat cardiomyocyte. There is no junctional complex in H9c2 cell (A). Whereas, gap junction (B), desmosome (C), adherent junction (D) in cardiomyocyte are shown apparently. These intercellular junctions are characteristic in cardiomyocytes. Scale bar : 1 μ m.

부분을 차지하고 있었다. 마디끝격막(Z line)은 근육 원섬유를 가로지르며 가로축으로 겹게 나타났고 이웃하는 마디끝격막과 함께 근육원섬유마디(sarcomere)의 경계를 이루고 있었다. 가는근육미세섬유(actin myofilament)와 굵은근육미세섬유(myosin myofilament)는 근육원섬유 속에 긴축으로 나란히 배열되어 있었고, 근육미세섬유들의 중복 여부에 따라 생기는 밝은띠(I band), 어두운띠(A band), 투명띠(H band)들도 뚜렷하였다. 이웃하는 심장근육세포와의 간극에는 사이원반이라는 연접복합체가 관찰되었는데 이것은 심장근육세포에서만 나타나는 특징적인 소견이다. 풍부한 가는근육미세섬유가 사이원반에 붙는 장소인 부착판은 전자밀도가 높아 겹게 나타났다. 일정한 수축활동하에서 심장근육세포들이 서로 떨어지지 않게 세포막을 연결하는 부착반점은 원반(plaque)모양의 전자밀도가 높은 구조물로 구성되어 있었다. 교통반점은 다른 종류의 세포 사이결합들과 다르게 접하고 있는 세포막 사이에 연결다리(bridges)가 있어 다른 세포사이결합과 특징적인 차이를 나타내었다(Fig. 3).

H9c2세포는 타원형의 핵과 작은 핵소체를 가지며 세포내에 세포소기관의 발달이 전반적으로 미약하였다. 세포질 내에 사립체는 세포질 안에서 흩어져 있었고 가는 다발을 이루고 있는 미세섬유는 세포의 세로축을 따라 주행하였고 세포의 가장자리에서도 관찰되었다. 심장근육세포에서 관찰되었던 세포 사이결합들은 뚜렷하지 않았고, 단지 이웃세포와 접하는 부위에 가는근육미세섬유들이 분포하는 정도였다.

H9c2세포와 접하고 있는 심장근육세포에서 가는근육미세섬유의 분포가 감소하였고, H9c2세포도 가는근육미세섬유를 관찰하기 어려웠다. 또한 교통반점, 부착판, 부착반점 등 세 종류의 세포사이결합들도 관찰되지 않았다.

고 찰

심장근육세포는 출생이후 대부분 분화가 끝난 상태이며 일부만 미분화 상태를 유지하고 있다. 따라

서 흰쥐 심장에서 분리·배양하는데 다소간의 제한점이 있다(McGill와 Brooks 1995). 특히 장기간 배양할 경우 섬유모세포나 내피세포의 증식에 의한 오염으로 심장근육세포만의 영향을 관찰할 수 없다. 본 실험에서는 배양 4일동안 관찰하였으며 혼합배양은 배양 2일째 기존 배양되고 있는 심장근육세포에 H9c2세포를 첨가하는 방법으로 실시하였다. 예비실험에서 심장근육세포와 동시에 배양용기에 심을 경우 부착력이 강한 H9c2세포는 먼저 안정화되어 많은 수의 심장근육세포가 손실되었다. 따라서 24시간의 간격을 두고 H9c2세포를 첨가하였다.

H9c2세포는 쥐의 심장에서 적출한 근육모세포주이다. 약제를 처리하거나 배지의 조성을 변화시킴에 따라 심장근육세포나 골격근세포로 분화한다고 알려져 있다(Ménard C 등 1999). 그러나 예비실험을 통하여 분화를 유도한 결과 그 효율이 매우 낮고, 일부 분화된 세포는 계대배양을 통하여 손실되는 등 여러 가지 문제점이 나타났다.

본 실험에서는 정상 심장근육세포와 혼합배양을 통하여 심장근육모세포주가 심장근육세포로 분화의 가능성 여부와 세포사이결합을 형성하여 구조적·기능적 통합 단위를 이루는지를 관찰하였다. 그리고 향후 다양한 원인으로 인한 심장조직의 손상에 대한 세포이식의 가능성을 알아보았다. 신생 흰쥐에서 분리한 심장근육세포는 배양 6시간 이후 간헐적인 수축을 시작하여 24시간 이후에는 규칙적이고 수축력도 강한 것을 관찰할 수 있었다. 또한 무리를 지어 분포하는 세포에서 수축횟수와 수축력이 동일한 '동시수축'을 관찰할 수 있었다. 일차배양한 심장근육세포의 독자적인 수축에 대하여 여러 가지 연구가 진행되었지만 아직까지 정확한 기전을 알지 못하고 있고 최근에는 칼슘이온의 농도변화에 초점을 맞추고 있다. Park 등(1998)의 보고에 의하면 일차 배양한 심장근육세포의 수축횟수는 분당 80~200회 정도로 다양하게 나타났으나 대체로 배양 3~5일에서 가장 활발하고 점차 감소하며, 수축력도 점차 약화된다. 심장근육세포는 정상적으로 세 종류의 중요한 세포사이결합들 -교통반점, 부착반점, 부착판-을 가지고 있다. 이들 결합들은 인접한 세포사이의 기계적·물리적 결합을 형성할 뿐만 아니라 전기적

신호 전달, 이온 및 신호전달물질의 교환 등 다양한 기능을 하고 있다. 일반적으로 심장근육세포는 조직에서 분리한 이후 일정한 세포 수축이 활발하게 일어나고 이웃하는 세포와 동시수축을 하는 시점을 안정화의 기준으로 삼는다. 따라서 심장근육세포가 안정화되는 배양 24시간 이후에 H9c2세포를 첨가하였고 단독배양과 혼합배양에 따른 상호간의 영향을 세포사이결합 및 세포골격단백질인 α -actinin의 분포 및 양적 증감을 통해 관찰하였다.

심장근육세포와 H9c2세포의 단독배양과 혼합배양의 차이점은 다음과 같다. 단독배양한 심장근육세포는 수축횟수와 수축력이 일정하였으며 다른 연구논문의 결과와 일치하였다(Park 등 1998). 세포사이결합에 대한 면역염색에서도 교통반점, 부착반점, 부착판 등이 뚜렷이 분포하였고 전자현미경으로 최종 확인하였다. F-actin은 세로축을 따라 강한 반응이 나타났으며 가로무늬도 관찰할 수 있었다. 반면 단독배양한 H9c2세포는 증식이 활발하게 일어나지만 세포의 수축현상은 일어나지 않았다. 세포사이결합은 모두 음성반응이 나타났고 F-actin은 세로축을 따라 실 모양으로 나타났으나 가로무늬는 관찰되지 않았다. 전자현미경상에서 특별한 세포수축단백의 배열을 관찰할 수 없었다.

혼합배양에서는 심장근육세포와 H9c2세포는 각각 독립적으로 무리를 형성하며 분포하였고 서로 인접한 부위에서는 심장근육세포의 수축에 따라 H9c2세포가 수동적으로 움직이고 있었다. 두 종류의 세포 사이에 기계적인 결합이 형성된 것으로 보이지만 세 종류의 세포사이결합에 대한 면역염색에서는 반응이 나타나지 않아 이들과는 다른 결합임을 알 수 있었다. F-actin의 염색에서는 대체로 두 종류의 세포가 접한 부위에 반응이 감소하거나 약하게 나타나는 것으로 보아 세포사이 결합, 세포돌기 및 세포 성장에 저해를 주는 것으로 생각된다. 또한 혼합배양 과정에서 H9c2세포 내부의 미세구조 변화를 관찰할 수 없어 분화가 유도되지 않는 것으로 생각된다. 이는 Murry 등(2002)이 심장근육세포와 골격근육모세포의 혼합배양에서 교통반점이 형성되지 않았음에도 불구하고 수동적인 동시수축이 일어나는 것과 같은 결과였다.

따라서 본 실험 결과를 통하여 심장근육모세포주인 H9c2세포는 심장근육세포와의 혼합배양을 통하여 분화 유도되지 않았고 기존세포와의 세포사이결합의 형성되지 않는 것으로 결론지었다. 본 실험은 다양한 심장질환에 대한 획기적인 치료방법으로 대두되고 있는 세포이식에 대한 기초자료로서 향후 진행될 세포이식의 실험모델을 구축하는 데 바탕이 될 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Angst BD, Khan LU, Severs NJ, Whately K, Rothery S, Thompson RP, Magee AI, Gourdie RG : Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res* 80 : 88-94, 1997.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA : Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 105 : 2621-2629, 1987.
- Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder SA, Hulser DF, Willecke K, Nicholson BJ : A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus oocytes*. *J Cell Sci* 111 : 31-43, 1998.
- Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, De Angelis MGC, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G : Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 98 : 10733-10738, 2001.
- Czyz J, Irmer U, Schulz G, Mindermann A, Hulser DF : Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. *Exp Cell Res* 255 : 40-46, 2000.
- Darrow BJ, Laing JG, Lampe PD, Saffitz JE, Beyer EC : Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 76 : 381-387, 1995.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K : Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129 : 805-817, 1995.

- Hescheler J, Fleischmann BK : Indispensable tools: embryonic stem cells yield insights into the human heart. *J Clin Invest* 108 : 363-364, 2001.
- Kanter HL, Saffitz JE, Beyer EC : Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins. *Circ Res* 70 : 438-444, 1992.
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L : Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108 : 407-414, 2001.
- Kanter HL, Laing JG, Beyer EC, Green KG, Saffitz JE : Multiple connexins colocalize in canine ventricular myocyte gap junctions. *Circ Res* 73 : 344-350, 1993.
- McGill CJ, Brooks G : Cell cycle control mechanisms and their role in cardiac growth. *Cardiovasc Res* 30 : 557-569, 1995.
- Ménard C, Pupier S, Mornet D, Kitzmann M, Nargeot J, Lory P : Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9c2 cardiac cells. *J Biol Chem* 274 : 29063-29070, 1999.
- Murry CE, Whitney ML, Reinecke H : Muscle cell grafting for the treatment and prevention of heart failure. *J Card Fail* 8 : S532-41, 2002.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bondine DM, Leri A, Anversa P : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Natl Acad Sci* 98 : 10344-10349, 2001.
- Park JH, Kim JY, Jeong SR, Lee YC : Ultrastructural injury and its mechanism of cultured cardiac myocytes under anoxia-reoxygenation. *Korean J Anat* 31 : 225-240, 1998.
- Saffitz JE, Davis LM, Darrow BJ, Kanter HL, Laing JG, Beyer EC : The molecular basis of anisotropy: role of gap junctions. *J Cardiovasc Electrophysiol* 6 : 498-510, 1995.
- Safranyos RG, Caveney S, Miller JG, Petersen NO : Relative roles of gap junction channels and cytoplasm in cell-to-cell diffusion of fluorescent tracers. *Proc Natl Acad Sci* 84 : 2272-2276, 1987.
- Sepp R, Severs NJ, Gourdie RG : Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 76 : 412-417, 1996.
- Severs NJ : Gap junction alterations in the failing heart. *Eur Heart J* 15 : 53-57, 1994.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD : Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105 : 93-98, 2002.
- Zuppinger C, Schaub MC, Eppenberger HM : Dynamics of Early Contact Formation in Cultured Adult Rat Cardiomyocytes Studied by N-cadherin Fused to Green Fluorescent Protein. *J Mol Cell Cardiol* 32 : 539-555, 2000.

Abstract

Formation of Intercellular Junction between Cardiomyocyte and H9c2 Cell Line in Co-Culture

Jeong Hyun Park, Han Sol Kang, Min Cheol Park, Dae Joong Kim,
Jang Hee Hahn, Hoon Ki Sung¹, Joo Young Kim², In Hwan Song²,
Eon Gi Sung², Yung Chang Lee²

Department of Anatomy, College of Medicine, Kangwon National University,

¹Korean Naval Medical Center, ²Department of Anatomy, College of Medicine, Yeungnam University

Recently, new treatments for human heart disease such as ischemia, infarction, cardiomyopathy, coronary heart disease have been developed. transplantation various kinds of cells from skeletal muscle, endothelium, mesenchyme, hemopoietic tissue to injured area after infarction were challenged. It's so called 'Cell Transplantation'. This therapeutic strategy already adopted and got a good result in clinical trial. But several limitations are still remained, including ethics, donor cell numbers, side effects, therapeutic efficiency.

In this research, we investigated the formation of intercellular junction and synchronous contraction between cardiomyocyte and H9c2 cell line in co-culture to establish experimental model in vitro for cell transplantation. For this purpose, two kinds of cells, primary cultured cardiomyocyte and H9c2 (cardiomyoblast cell line) were used. Cultured cardiomyocytes had repetitive contraction-relaxation pattern along longitudinal axis both in single and co-culture. But their contractions were slower, less regular, less strong in co-culture than in cardiomyocyte culture only. H9c2 cells did not contracted actively themselves, but moved toward cardiomyocyte passively coincided with contraction. In contact region between two kinds of cells, there was no signal after immunocytochemical staining labeled with connexin43 (gap junction), desmoplakin (desmosome), N-cadherin (adherent junction) even though they had membrane contact. Moreover, F-actin and striation were less developed.

These results suggested that co-culture system interfere with remodelling of contractile apparatus, intercellular junction formation as well as contraction-relaxation. Furthermore cardiomyocyte could not induce H9c2 cells differentiation into cardiomyocyte. Therefore, much more research would be essential for clinical application of cell transplantation and this study would be the basic source for further study of new therapy of myocardial disease and building up in vitro model.

Key words : Cardiomyocyte, H9c2 cell, Co-culture, Intercellular junction