

# 배양을 위한 심근세포 분리에 미치는 Trypsin, Collagenase와 Dimethyl Sulfoxide의 영향

영남대학교 의과대학 해부학교실  
박창우·이용창

## 서론

동물조직으로부터 살아있는 건강한 세포를 분리하는 것이 세포배양에서는 가장 중요한 단계이며 이를 위하여 지금까지 각종의 효소용액,<sup>1,2)</sup> 물리적 방법, 또는 항체<sup>3)</sup>를 이용한 분리방법 등이 사용되어 왔다. 그 중, 효소를 이용한 세포분리가 가장 보편적으로 사용되어 왔으며 trypsin, collagenase, elastase, pronase 및 hyaluronidase 등이 자주 쓰이는 효소이다. 이들 가운데에서 trypsin과 collagenase는 많은 연구자들에 의해 사용되어 왔으며<sup>4)</sup> 척추동물 심근세포의 분리에 특히 많이 쓰여지고 있다.

그러나 trypsin은 세포막의 bleb형성, leakage 유도,<sup>5)</sup> desmosome의 파괴<sup>6)</sup> 등 광범위한 세포손상을 일으키며 collagenase는 효과적인 inhibitor의 부재로 인한 지속적 세포손상을 일으키는 단점이 지적되고 있다.

한편, 세포배양용액에서 glycerin과 함께 세포보호제로 쓰여져왔던 dimethyl sulfoxide가 Friend erythroleukemia 세포에서 hemoglobin의 합성을 유도하는 것이 알려진<sup>7)</sup> 후 배양중 세포의 분화를 유도하는 약제로서 많은 연구가 되어오고 있다.<sup>8,9)</sup> 또한 dimethyl sulfoxide가 배양중세포의 분화뿐만 아니라 효소분리된 세포에 대하여 세포파손을 방지하고 보호하는 능력이 있다고 주장하는 보고가 있다.<sup>10,11)</sup>

저자는 trypsin과 collagenase를 사용하여 배양 심정세포를 분리하면서 이들 효소의 분리효과를 비교하고 여기에 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 이 약제가 세포분리 및 회복에 미치는 영향을 검토하고자 본 실험을 행하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

생후 3일된 Sprague-Dawley종 배서를 각 실험군마다 5마리씩 선택하여 vertical laminar flow hood 내에서 심신을 저출하여 4°C로 유지된 phosphate buffered saline으로 세척하고 10ml의 효소용액이 담긴 trypsinizing flask 넣어 소화시켰다. 사용한 효소는 0.1% trypsin (Fluka 사제)와 0.1% collagenase (Gibco 사제)였으며 dimethyl sulfoxide는 Fedia 사제의 5%용액을 사용하였으며 보육된 Dulbecco's minimum essential medium을 사용하여 세포배양을 하였다.

### 2. 실험방법

효소의 세포분리효과를 관찰하기 위하여 37°C의 trypsin 또는 collagenase로 소화분리를 하거나 4°C의 trypsin 또는 collagenase로 18시간 전처리한 뒤 37°C의 collagenase 또는 trypsin으로 소화분리를 하였으며 효소에 의한 세포분리에 미치는 DMSO의 효과를 관찰하기 위하여 위의 효소용액에 5%의 DMSO를 첨가하여 위와 같은 실험을 또한 행하였고 단기간 배양에 미치는 DMSO의 보호대지 분화촉진 효과를 관찰하기 위하여 효소만으로 분리한 세포를 DMSO 5%를 첨가한 배양액에 넣어 배양하였다.

소화분리 과정은 다음과 같다.

저출한 심실을 세척하여 PBS로 세척한 후 37°C의 효소액이 담긴 trypsinizing flask에 넣어 1분간 60회로 움직이는 shaking incubator에서 10분간 교반 소화시킨 후 상층액을 뽑아 1000 rpm에서 3분간 원심하여 cell pellet를 만들고 이를 배양액으로 세척한 후 인공유에 모래하였으므로 이러한 과정을 4회 반복하여 세포를 모으고 이들을 배양액으로 희석하여 생존율을 hemocytometer를 사용하여 trypan blue dye exclusion test로 측

정한후 배양을 하였다.

냉(4°C) 효소액으로 잘 치치한 한 실험군에서는 PBS로 세척한 심장조직편을 10ml의 효소액이 담긴 trypsinizing flask에 넣어 4°C로 유지된 냉장실에 18시간 보관하였다가 다음날 전술한 소화분리 과정을 시행하였다.

### 3. 실험 군

#### 1) 세포분리에 대한 효소의 효용실험

(1) 37°C collagenase 만 처리한군(이하 C군으로 약칭함)

(2) 37°C trypsin 만 처리한군 (이하 T군으로 약칭함)

(3) 4°C trypsin으로 18hr 전처리후 37°C collagenase로 처리한군 (이하 TC군으로 약칭)

(4) 4°C collagenase로 18hr 전처리후 37°C trypsin으로 처리한군 (이하 CT군으로 약칭)

#### 2) 효소분리에 대한 DMSO의 효과실험

(1) 5% DMSO를 첨가한 37°C collagenase 만 처리한군 (이하 CD군)

(2) 5% DMSO를 첨가한 37°C trypsin만 처리한군 (이하 TD군)

(3) 5% DMSO를 첨가한 trypsin으로 18hr 전처리후 5% DMSO를 첨가한 37°C collagenase로 처리한군 (이하 TCD군)

(4) 5% DMSO를 첨가한 4°C collagenase로 18hr 전처리후 5% DMSO를 첨가한 37°C trypsin으로 처리한군 (이하 CTD군)

#### 3) 단시간 배양에 미치는 DMSO의 효과실험

(1) 효소분리된 세포를 DMSO 배양액에 10분간 배양한군

(1) 37°C collagenase 만 처리한후 분리한 세포를 5% DMSO가 첨가한 배양액에 10분간 배양한군 (이하 C1m군)

(2) 37°C trypsin 만 처리하여 분리한 세포를 5% DMSO가 첨가된 배양액에 10분간 배양한군 (이하 T1m군)

(3) 4°C trypsin으로 18hr 전처리한후 37°C collagenase로 처리하여 분리한 세포를 5% DMSO가 첨가된 배양액에 10분간 배양한군 (이하 T-C1m군)

(4) 4°C collagenase로 18hr 전처리한후 37°C trypsin으로 처리하여 분리한 세포를 5% DMSO가 첨가된 배양액에 10분간 배양한군 (이하 CT1m군)

(2) 효소분리된 세포를 DMSO배양액에 1일간

배양한군

(1) 37°C collagenase 만 처리하여 분리한 세포를 1일간 배양한군 (이하 C1d군)

(2) 37°C trypsin 만 처리하여 분리한 세포를 5% DMSO가 첨가된 배양액에 24시간 배양한군 (이하 T1d군)

(3) 4°C trypsin으로 18hr 전 처리한후 37°C collagenase로 처리하여 분리된 세포를 5% DMSO가 첨가된 배양액에 24시간 배양한군 (이하 TC1d군)

(4) 4°C collagenase로 18hr 전 처리한후 37°C trypsin으로 처리하여 분리된 세포를 5% DMSO가 첨가된 배양액에 10분간 배양한군 (이하 CT1d군)

3) 배조군 (1)항에 기술된 방법으로 얻어진 세포 생존율을 배조군으로 하였음)

능으로 나누었다.

4. 세포생존율 검사는 trypan blue를 이용한 dye exclusion test법으로 하였다.

5. 심근세포의 분리는 이미 보고된 Kasten<sup>20)</sup>의 방법으로 하였다.

## 실험성적

### 1. 세포분리에 대한 효소의 효율

심장세포의 생존율은 C군이 64%, T군이 75%, TC군이 75%, CT군이 65%였으며 세포수확량은 C군이  $1.5 \times 10^6$ 개, T군은  $2.5 \times 10^6$ 개, TC군은  $5.7 \times 10^6$ 개, CT군은  $5.6 \times 10^6$ 개였고 심근세포의 생존율은 C군은 55%, T군은 13%, TC군은 35%였다. 전체세포의 생존율과 세포수확량은 TC군이 가장 높았고 그다음이 CT군, C군 순이었고 T군이 가장 낮았다. 심근세포 생존율은 C군이 가장 높았고 그다음이 TC군, CT군의 순이었고 T군이 가장 낮았다(Table 1).

### 2. 효소분리에 대한 DMSO의 효과

세포생존율은 TCD군이 42%로 가장 높았고, CTD군과 CD군은 각각 40%로 같았으며 TD군이 25%로 가장 낮았다. 세포수확량은 TCD군이  $0.8 \times 10^6$ 개로 가장 많았고 그다음이 CTD군의  $2.4 \times 10^6$ 개, TD군의  $1.3 \times 10^6$ 개 순이었고 CD군이  $0.9 \times 10^5$ 개로 가장 작았다. 심근세포의 생존율은 TCD군이 35%로 가장 높았고 CTD군과 CD군은 20%로 같았으며 TD군이 10%로 가장 낮았다(Table 2).

3. 단시간 배양에 미치는 DMSO의 효과

효소분리된 세포를 DMSO배양액에 10분간 배양한 뒤에 세포생존율은 TC1m군이 50%로 가장 높았고 그다음 C1m군이 40%, T1m군이 35% 순이었으며 CT1m군이 33%로 가장 낮았고 모든 군이 다같이 대조군에 비하여 20~30%정도 생존율이 저

하 되었다.

효소분리된 세포를 DMSO배양액에 1일간 배양한 뒤에 세포생존율은 TC1d군이 15%, C1d군이 14%로 비슷하였으며 CT1d군은 10%였고 T1d군이 5%로 가장 낮았다. 이들의 생존율은 대조군에 비해 50~60%가량 저하되어 있었다(Table 3).

Table 1. Viability of new-born rat heart cells dissociated with enzyme solution

Enzyme	total cell viability (%)	cell yeild	myocardial cell viability (%)
w. collagenase	64	$1.5 \times 10^6$	55
w. trypsin	50	$2.5 \times 10^6$	13
c. trypsin overnight +w. collagenase	75	$5.7 \times 10^6$	45
c. collagenase overnight +w. trypsin	65	$5.5 \times 10^6$	35

w : warm (37°C)    c : cold (4°C)

Table 2. Viability of new-born rat heart cells dissociated with enzyme solution supplemented with 5% DMSO

Enzyme	total cell viability (%)	cell yeild	myocardial cell viability (%)
w. collagenase	40	$0.9 \times 10^5$	20
w. trypsin	25	$1.3 \times 10^5$	10
c. trypsin overnight +w. collagenase	42	$0.8 \times 10^6$	35
c. collagenase overnight +w. trypsin	40	$2.4 \times 10^5$	20

w : warm (37°C)    c : cold (4°C)

Table 3. Viability of new-born rat heart cells dissociated with enzyme solution and cultured in liquid media containing 5% DMSO

Enzyme	control group viability (%)	10min group viability (%)	1 day group viability (%)
w. collagenase	65	40	14
w. trypsin	53	35	5
c. trypsin overnight +w. collagense	75	50	15
c. collagenase overnight +w. trypsin	63	33	10

w : warm (37°C)    c : cold (4°C)

control group: Cells harvested right after enzyme dissociation.

10min group: Cells were cultured for 10 minutes in the medium with 5% DMSO after enzyme dissociation and the viability was tested.

1 day group: Cells were cultured for 1 day in the medium with 5% DMSO after enzyme dissociation and the viability was tested.

### 고 찰

백지 심장세포의 분리에 쓰이는 trypsin과 collagenase의 효율을 비교하고 이들의 효력과 함께 dimethyl sulfoxide가 세포분리 회복 과정에 미치는 효과를 조사하였다.

collagenase만 사용하여 세포분리를 하였을때 세포생존율이 64%, 세포수확량이  $1.5 \times 10^6$  개인데 비하여 trypsin만 사용하였을때의 세포생존율이 50%이고 세포수확량이  $2.5 \times 10^6$ 개인 것은 이수 비조적인 것으로 생각되며 이는 Kono<sup>2)</sup>와 Cavanaugh<sup>25)</sup> 등의 결과와 유사한 것을 알 수 있다. Trypsin 처리군의 생존율도 낮을뿐 아니라 세포수확율이 collagenase 처리군의 약 1/6 밖에 되지않는 것은 trypsin에 의한 세포막의 bleb 형성, leakage<sup>16)</sup> 등의 직접적 손상과 세포막에 대한 흡착 (adsorption)<sup>9)</sup>, endocytosis를 통한 세포파괴 등의 원인에 의한 것으로 생각되며 trypsin 처리군의 심근 세포의 생존율이 현저하게 낮았기(13%)에서 특히 그 영향을 중대함을 관찰할 수 있었다.

Moscona 등<sup>2)</sup> Poste<sup>1)</sup>는 세포를 이러한 비특 제작하면 adsorption된 효소의 desorption이 많이 일어나다고 하였으나 이는 이미 효소에 의해 약화되어 있는 세포막을 오히려 더 더치게 할 수도 있는 것으로 관찰할 일이 아니라고 생각된다.

효소에 의한 심근세포의 손상은 전술한 것 외에 desomosome<sup>2)</sup> gap junction 및 intercalated disc의 파괴<sup>26)</sup>에 의한 세포막의 개방 그에따른 세포질의 유출, 효소 등 이물질의 유입에 기인한 세포파괴 등 이외에도 효소분리과정에서 일어나는 근육세포내 수축단백의 혼련<sup>27)</sup>등을 들 수 있다.

특히 효소의 연속사용한 실험군에서 차기군 trypsin내에서 밤을 세운후 37°C의 collagenase로 처리한 군이 4°C collagenase처리후 37°C trypsin으로 처리한 군보다 세포생존율, 세포수확량 및 심근세포생존율 모두가 양호한 성적을 보인 것은 주목할만한 결과이다.

Collagenase보다 세포회복효과가 강한 trypsin을 4°C로 유지함으로써 효소활성을 억제하고 그의 침투효과가 늦어짐으로서 적차히 조직사이로 스며들게 한뒤 세포흡성이 약한것으로 보이는 collagenase로 처리함으로써 많은 생존세포를 수확할 수 있었던 것으로 생각되며 이는 백지심근세포를 인접하는 단백질이 trypsin과 collagenase에 각각 민감한 다른 종류의 것으로 형성되어 있다는 Kono<sup>2)</sup>

의 결과 그 전제가 일치하는 것으로 보인다. 문 실험의 결과로 보면 trypsin-collagenase 연속처리도 얻을 수 있는 생후 3일된 백지 심신의 생존세포수는 각 실험동물당 약 100만개 정도 얻을 수 있으며 이 수치는 앞으로의 연구에 좋은 자료가 될 수 있을것으로 생각된다.

DMSO는 액체진소속에 세포를 냉동보존함에 많이 쓰이는 aprotic solvent이다.<sup>20) 22)</sup> 이 물질은 선치류의 leukemic cell에서 hemoglobin의 함량을 유도하여 이들 세포가 환구분화 되도록하며<sup>21)</sup> 또한 세포의 기체분자에 작용하여 단백 mosaic virus의 표백단백을 분리시키는데<sup>23)</sup> 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup>

효소분리과정에서의 그 이후 분리된 세포에 미치는 DMSO의 효과를 관찰하기 위하여 행한 문 실험에서 5%의 DMSO를 효소용액에 섞어서 세포를 분리하였을때 4°C trypsin 처리후 37°C의 collagenase로 처리한 군에서 세포 생존율은 trypsin군을 제외한 다른 군과 비슷한 42%였으나 세포수확량과 심근세포 생존율에서는 이터군에 비해 훨씬 높은 수치를 나타내어 DMSO를 첨가하지 않은 실험군에서 보다 건반적 수치는 낮았으나 DMSO군에서는 가장 효율적인 것으로 나타났다. 37°C trypsin 처리군은 DMSO 첨가하지 않은 군에서의 같이 세포생존율, 세포수확량 및 심근세포생존율 모두가 가장 낮은 것을 보아 여기서는 trypsin의 세포회복효과가 DMSO의 저해 효과와 병행함을 볼 수 있었다.

이 실험결과로 미루어 보면 DMSO는 세포의 효소분리과정에서 세포의 보호효과를 인정할 수 없을뿐 아니라 효소에 의하여 손상된 세포막을 통하여 DMSO가 세포에 침투하고 그 결과 세포손상, 파괴정도 가 증대되는 것을 알 수 있다. 또한 효소분리후 제작을 하였으나 완전히 제작하지 않은 것이 DMSO가 세포막의 투과성을 높이고 세포표면의 cell coat 형성을 방해하여<sup>24)</sup>세포의 회복을 방해 하리라는 것을 생각할 수 있다.

세포가 효소용액에 의해 분리되고 난 뒤 배양과정에 들어갔을때 DMSO의 효과를 보기 위하여 행한 실험에서는 배양액에 5%의 DMSO를 첨가하여 여기에 세포를 단기간 배양하면서 관찰하였다. 분리된 세포를 DMSO배양액에 10분간 배양한 실험에서 세포생존율은 4°C trypsin처리후 37°C collagenase로 처리한 군에서 50%로 가장 높았으며 37°C trypsin군과 4°C collagenase처리후 37°C collagenase처리군이 각각 35% 및 33%로 비슷하였

으며 이들 세포생존율이 보통 배양액에 비해 약 20% 낮아진 것이 DMSO배양액에 단 10분간 노출된 결과라는 것을 생각하면 분리된 세포에 대한 DMSO의 손상효과가 대단히 큰을 알 수 있다.

DMSO배양액에 1일간 배양한 심근 trypsin 처리지후 37°C collagenase 처리군이 15%의 세포생존율을 보인 뒤에 37°C trypsin 농은 5%진으로 낮아져서 배양액에 비해 1/10로 줄어 들었음을 볼 수 있고 더욱 분해작용은 1/5에서 1/6로 줄어 들면서 거의 대부분의 세포가 파괴되고 없어졌으며 남아있는 세포도 작상이 활발히 진행되는 건강한 세포가 아니라 위축된 상태의 세포가 대부분이었음을 감안할때 모든 세포가 괴사과정애 있는 것으로 간주되었다.

위의 결과로 미루어 볼때 DMSO는 백서 심근세포를 효소분리하는 과정 및 분리 직후에는 세포보호 효과가 없으며 오히려 손상효과를 가지므로 따라서 세포의 분해속도는 이 기간동안에는 기대할 수 없을 것으로 간주된다.

### 요 약

백서심장조직을 trypsin과 collagenase 두가지의 효소를 사용하여 분리하면서 각 효소의 분리효과와 두가지 효소의 복합적 세포분리효과를 조사하였으며 이와 동시에 dimethyl sulfoxide가 세포 분리과정 및 단기간 배양중에 세포에 미치는 효과를 조사한 결과를 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. 백서심장조직에서 세포를 분리할때 4°C trypsin 18시간 처리지후 37°C collagenase 처리한 군에서 세포생존율 세포수확량 및 심근세포 생존율이 가장 높았다. 즉 단일 효소 처리보다는 효소 복합연속 처리가 더 효율적이었다.

2. 37°C trypsin만으로 세포분리를 하였을때 세포생존율과 수확량이 가장 낮았다.

3. 백서심장세포의 분리과정과 초기 배양 과정에서 세포회복이나 보호에 대한 DMSO의 효과는 인정되지 않았으며 오히려 세포파괴 효과가 높음을 알 수 있었다.

### 참 고 문 헌

1. Poste, G. : Tissue dissociation with proteolytic enzymes. *Exp. Cell Res.*, 65 : 359-367, 1971.
2. Kono, T. : Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal

- tissues. *Biochem. Biophys. Acta*, 178:393-396, 1969.
3. Speicher, D. W., and McCarl, R. L. : pancreatic enzyme requirements for the dissociation of rat hearts for culture. *In Vitro*, 10 : 30-41, 1974.
4. Hefley, T. J., Stern, P. H., and Brand, J. S. : Enzymatic isolation of cells from neonatal calvaria using two purified enzymes from *clostridium histolyticum*. *Exp. Cell Res.*, 149 : 227-236, 1983.
5. Beug, H., Gerisch, G., and Müller, E.: cell dissociation: Univalent antibodies as a possible alternative to proteolytic enzymes. *Science*, 173: 742-742, 1971.
6. Levinson, C., and Green, J. W.: Cellular injury resulting from tissue disaggregation. *Exp. Cell Res.*, 39: 307-317, 1965.
7. Overton, J.: Fate of desmosomes in trypsinized tissue. *J. Exp. Zool.*, 168 : 293-214, 1968.
8. Friend, C., Sher, W., Holland, J. G., and Sato, T.: Hemoglobin synthesis in murine virus induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 68: 378-382, 1971.
9. Lyman, G., Preisler, H. D., and Papahadjopoulos, D.: Membrane action of DMSO and other chemical inducers of Friend leukemia cell differentiation. *Nature (London)*, 262: 360-363, 1976.
10. Nicolaieff, A., Lèveurjer, G., and Hirth, L. : Electron microscopy and infectivity studies of the action of dimethyl-sulfoxide on two strains of tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 22: 43-53, 1974.
11. Fukui, Y.: Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of Dictyostelium. *J. Cell Biol.*, 76: 146-157, 1978.
12. Fukui, Y., and Katsumaru, H.: Nuclear actin bundles in Amoeba Dictyostelium and human HeLa cells induced by dimethyl sulfoxide.

- Exp. Cell Res., 120: 451-455, 1979.
13. Fukui, Y., and Katsumaru, H.: Dynamics of nuclear actin bundle induction by dimethyl sulfoxide and factors affecting its development. *J. Cell Biol.*, 84: 131-140, 1980.
  14. Terasawa, T., Miura, Y., and Masuda, R.: The mechanism of the action of DMSO on the hemo synthesis of quail embryo yolk sac cells. *Exp. Cell Res.*, 133: 31-37, 1981.
  15. Obinata, A., Tamaka, K., Kuwada, M., Hirano, H., and Endo, H.: Reversible inhibition by DMSO of hydrocortisone induced keratinization of chick embryonic skin. *Exp. Cell Res.*, 138: 135-145, 1982.
  16. Yenofsky, R., Cereghini, S., Krowczynska, A., and Brawerman, G.: Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cell induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell Biol.*, 3: 1197-1203, 1983.
  17. Ferrero, D., Gallo, E., Lanfrancone, L., and Tarella, C.: Functional and phenotypic characterization of two HL 60 clones resistant to dimethyl sulfoxide. *Exp. Cell Res.*, 120: 451-455, 1979.
  18. Beaumont, C., Deybach, J., Grandchamp, B., DaSilva, V., deVerneuil, H., and Nordmann, Y.: Effects of succinylacetone on dimethyl sulfoxide mediated induction of heme pathway erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.*, 154: 474-484, 1984. *Exp. Cell Res.*, 154: 474-484, 1984.
  19. Wileczynska, A., Ponka, P., and Schulman, H. M.: Transferrin receptors and iron utilization in DMSO-inducible and uninducible Friend erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.*, 154: 561-566, 1984.
  20. Waalkes, M. P., and Wilson, M. J.: Increased synthetic capacity for metallothionein in cultured liver cells following dimethyl sulfoxide pretreatment. *Exp. Cell Res.*, 169: 29-30, 1987.
  21. Goldman, R.: Modulation of transglutaminase activity in mononuclear phagocytes and macrophage-like tumor cell lines by differentiation agents. *Exp. Cell Res.*, 168: 31-43, 1987.
  22. Katsuta, H., and Takaoka, T.: Cultivation of cells in protein and lipid-free synthetic media. *Methods Cell Biol.*, 6: 1-42, 1973.
  23. Kasten, F. H.: Mammalian myocardial cells. In: *Tissue Culture Methods and Applications*. Acad. press, N. Y. 72-81, 1973.
  24. Thompson, L. H., and Baker, R. M.: Isolation of mutants of cultured mammalian cells. *Methods Cell Biol.*, 6: 210-281, 1973.
  25. Cavanaugh, D. J., Berndt, W. O., and Smith T. E.: Dissociation of heart cells by collagenase. *Nature*, 200: 261-262, 1963.
  26. Moscona, A., Trowell, O. A., and Willmer, E. N.: *Methods*, In: E. N. Willmer (ed), *cells and Tissues in Culture, Methods, Biology, and physiology*, Vol. 1, Acad. Press, London, 1965, pp. 19-98.
  27. Gross, W. O., Müller, C. A. M., and Schlotman, E. H. M.: Loss of differentiation features in trypsin separated heart muscle cells. *Ant. Embryol.*, 151: 341-350, 1977.
  28. Cassiman, J.J., and Bernfield, M. R.: Transformation induced alterations in fibroblast adhesion: Masking by trypsin treatment. *Exp. Cell Res.*, 91: 31-35, 1975.
  29. Avruch, J., Price, H. D., Martin, D. B., and Carter, J. R.: Effect of low levels of trypsin on erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 291: 494-505, 1973.
  30. Lagunoff, D., Chi, E. Y., and Wan, H.: Effects of chymotrypsin and trypsin on rat peritoneal mast cells. *Biochem. Pharmacol.*, 24: 1573-1578, 1975.
  31. Trinkaus, V., and Gipson, I. K.: Role of calcium and calmodulin in hemidesmosome formation in vitro. *J. Cell Biol.*, 98: 1565-1571, 1984.
  32. McNeil, P. L., Murphy, R. F., Lanni, F., and Taylor, D. L.: A method for incorporating macromolecules into adherent cells. *J. Cell Biol.*, 98: 1556-1565, 1984.

33. Holtzman, D., and Agin, D.: Effect of trypsin on resting potential of frog muscle. *Nature*, 205: 911-912, 1965.
34. Carstensen, H. E.: In vitro test of heart muscle Viability. *Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg.*, 9: 200-205, 1975.
35. Polinger, L. S.: Separation of cell types in embryonic heart cell cultures. *Exp. Cell Res.*, 63: 78-82, 1970.
36. Reichel, H.: The effect of isolation on myocardial properties. *Basic Res. Cardiol.*, 71: 1-6, 1976.
37. Dion, L. D., and Gifford G. E.: Retinoic acid induces a G<sub>1</sub> cell cycle block in HeLa cells (40806). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 163: 510-514, 1980.
38. Strickland, S., and Sawey, M. J.: Studies on the effects of retinoids on the differentiation of teratocarcinoma stem cells in vitro and in vivo. *Devel. Biol.*, 78: 76-85, 1980.
39. Yen, A., and Chiao, J. W.: Control of cell differentiation during proliferation. *Exp. Cell Res.*, 146: 87-93, 1983.
40. Allis, C. D., and Wiggins, J. C.: Histone rearrangements accompany nuclear differentiation and dedifferentiation in Tetrahymena. *Dev. Biol.*, 101: 282-295, 1984.
41. Drew, A. H.: Growth and differentiation in tissue culture. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 4: 46-56, 1923.
42. Ratner, D., and Borth, W.: Comparison of differentiating Dictyostelium discoideum cell types separated by an improved method of density gradient centrifugation. *Exp. Cell Res.*, 143: 1-13, 1983.

-Abstract -

## Effects of Trypsin, Collagenase and Dimethyl Sulfoxide on Dissociation of Rat Heart Cells

Chang Woo Park, and Yung Chang Lee

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

Newborn rat heart cells were dissociated using trypsin and/or collagenase to elucidate the dissociation efficiency of these two enzymes.

And the effect of dimethyl sulfoxide during and immediately after cell dissociation was also investigated to clarify the so-called protective activity of dimethyl sulfoxide on cell performance.

The results can be summarized as follows.

1. Cold trypsin 18 hours pretreatment followed by warm collagenase treatment resulted best cell viability and cell yield.

2. Single warm trypsin treatment gave the poorest result

3. Dimethyl sulfoxide did not seem to play any protective role during or immediately after rat heart cell dissociation.

It had very damaging effect on rat heart cells.