

## 심근세포 및 내피세포의 분화에 미치는 *Dimethyl Sulfoxide*의 영향

영남대학교 의과대학 홍부외과학교실  
이동협 · 박이태 · 한승세

영남대학교 의과대학 해부학교실  
이 융 창

### 서 론

Dimethyl sulfoxide(이하 DMSO)는 glycerin과 함께 세포냉동술에서 세포보호제로 사용되어 왔다.

1950년에 Gonzles와 Luyet<sup>1)</sup>는 계배 심장을 액체 질소에 냉동후 소생시키는 것을 보관하였고 Kasten과 Yip<sup>2)</sup>은 DMSO를 이용하여 배양중의 심장세포를 분리냉동하여 다시 소생시키는 것을 보고하였다.

세포 냉동술에 이용되던 DMSO가 Friend erythroleukemia 세포에서 hemoglobin의 합성을 유도하는 것이 알려진 후<sup>3)</sup> 배양중의 세포의 분화를 유도하는 약제로서 많은 연구가 되어오고 있다.

Yenofsky등<sup>4)</sup>은 생쥐의 erythroleukemia 세포가 DMSO에 의해 분화가 촉진됨을 규명하였고, Wilczynska등<sup>5)</sup>은 Friend erythroleukemia 세포중 DMSO에 의해 분화가 유도되는 세포가 철사용이 증가함을 발표하였다.

이후 DMSO는 세포의 분화를 유도할 뿐 아니라 Waalkes와 Wilson<sup>6)</sup>은 간세포를 DMSO에 노출시킨 후 metallothionein 합성능이 증가한다는 것을 보고하였고 Muakkassah-Kelly등<sup>7)</sup>은 간세포의 장기 배양에서 DMSO가 세포 수명을 증가시켜 준다

고 하는 등 여러 효과를 보고하고 있다.

이와 같이 DMSO는 배양중 심장세포의 세포냉동술에 사용될 뿐만 아니라 다른 세포에서는 분화 유도제로서도 사용되어 왔다.

저자는 심장세포에 대한 DMSO의 분화효과를 조사하기 위하여 심근세포와 심장내피세포를 분리배양 정착시킨 뒤 DMSO를 처리하여 상기 세포들의 분화에 미치는 영향을 세포화학적으로 고찰코자 하였다.

### 재료 및 방법

생후 3일된 Sprague-Dawley종 백서의 심장에서 심실만을 적출하여 사용하였다. 심실에서 심장세포를 분리하는 방법은 이미 보고된 Kasten의 방법<sup>8)</sup>으로 하였다.

간략하면 Vertical laminar flow hood 내에서 심실만을 적출하여 4°C로 유지된 phosphate buffered saline으로 세척하고 4°C 0.1% trypsin(Gibco사제)으로 하룻밤 동안 처리하고 37°C 0.1% collagenase(Gibco사제)로 소화하여 세포를 분리하였다.

분리된 세포는 trypan blue를 이용한 dye exclusion test법<sup>9)</sup>으로 세포 생존률을 계산하고 세포수가 3~5×10<sup>5</sup>개/ml가 되도록 희석하여 micro cover

glass가 깔린 leighten tube에 배양하였다.

심근세포와 내피세포의 분리는 이미 보고된 Kas-ten의 방법<sup>8)</sup>에 의하여 분리 배양하였다.

세포배양은 37°C에 습기가 유지된 5% CO<sub>2</sub> 배양 기에서 하였다. 분리 배양된 세포는 심장배양액(modified Dalbeco's MEM)에 2일간 배양하여 세포분리시 발생하는 세포손상이 어느 정도 회복된 후 10% DMSO(Fedia사제)가 첨가된 심장배양액으로 1시간동안 배양한 후 DMSO가 없는 심장배양액으로 세척, 배양하였다. DMSO를 처리한 군을 실험군으로 하였고 DMSO를 처리하지 않고 계속 배양한 군을 대조군으로 하였는데 대조군에서도 실험군과 마찬가지로 심장배양액으로 동일하게 세척하여 조건을 같이 하였다. DMSO의 분화효과를 관찰하고자 6일동안에 매일 효소염색을 시행하였는데 이유는 대부분의 세포변화는 세포배양시작 이후 첫 주일내에 발생하기 때문이다.

효소 염색으로 심근세포는 사립체의 표지효소인 succinate dehydrogenase를, 내피세포는 Golgi의 표지효소인 thiamine pyrophosphatase를 시행하였다.

Succinate dehydrogenase는 Nachlas method로 하였고 thiamine pyrophosphatase는 Lillie method로 하였다. 대조군으로서는 DMSO를 처리하지 않고 계속 배양한 군으로 하였다. 배양중의 세포의 형태를 관찰하기 위하여 도립현미경을 이용하였고 35mm 흑백 인쇄필름으로 촬영하였고 효소염색된 표본은 위상차 현미경을 이용하여 200~100X로 관찰하였고 35mm color slide 필름과 흑백인쇄필름으로 촬영하였다.

## 성 적

심근세포의 분화정도를 관찰하고자 배양중에는 도립현미경하에서 심근세포의 박동양상을 보았고 효소염색을 통하여 반응물질의 모양, 강도, 배열상태와 전반적인 세포의 모습을 관찰하였다. 심장내피세포의 분화정도를 알기 위해서는 도립현미경하에서 전반적인 세포의 성장속도와 형태를 관찰하였

고 효소염색을 통하여서는 반응물질의 강도와 세포의 성장을 연관지어 생각하였다.

반응물질의 강도는 ×400 위상차 현미경하에서 500개의 세포를 관찰하여 가장 빈번히 나타나는 반응강도를 가진 세포를 반응강도의 표준으로 삼았다.

Succinate dehydrogenase의 반응강도의 척도로서 반응파립이 세포전반에 걸쳐 균일하게 퍼져있는 상태를 약한 반응으로 하였고 반응파립이 덩어리를 형성할 때는 중등도의 반응으로 하였고 반응파립이 완전히 세포를 메워서 서로 구분되지 않는 정도의 반응을 강한 반응으로 하였다.

심장내피세포의 반응척도로서 반응물질이 거의 보이지 않을 때를 음성반응으로, 핵주위에 군데 군데 조금씩 나타날 때를 약한 반응으로, 핵을 모자형상으로 덮거나 혹은에 워쌀 때를 중등도의 반응으로 하였고, 중등도의 반응이 한 부분보다 많이 나타날 때를 강한 반응으로 하였다.

DMSO를 처리한 이후부터 대조군과 실험군을 구분하였는데 DMSO를 1시간 처리한 군을 실험군으로 하였고, 처리하지 않고 계속 배양한 군을 대조군으로 하였다.

DMSO를 처리한 직후를 대조군 0일, 실험군 0일로 표기하였고 하루가 지나면 대조군 1일, 실험군 1일로 표기하였다. 이러한 방식으로 DMSO를 처리한 후 6일째는 대조군 6일, 실험군 6일로 표기하였다.

## 1. 심근세포

DMSO를 처리하기 전인 배양중 1일째 세포는 작은 방추형의 모습을 하고 있고 아직 완전히 micro-cover glass가 젤쳐지지 않은 상태이어서 매우 두꺼워 현미경하에서 세포전체가 한 쪽에 일치하지 않았다.

배양 2일째가 되어 세포는 얇아져서 핵이 나타나고 핵에는 1~2개의 두은 핵이 있으며 사립체를 비롯하여 많은 세포 소기관들이 꽉 들어차 있어 검은 얼룩으로 보였다.



Fig. 1. Succinate dehydrogenase activity of myocardial cells at experimental group. Note the rod shaped reaction granules near the nucleus (arrow). 2-day culture.  $\times 1000$ . Phase-contrast photomicrograph.

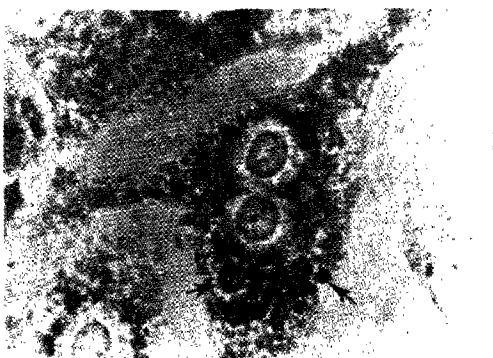


Fig. 2. Succinate dehydrogenase activity of myocardial cells at experimental group. Note the mass formation of reaction granules through the cell (arrow). 3-day culture.  $\times 1000$ . Phase-contrast photomicrograph.

그리고 많은 돌기들을 내어 microcover glass 바닥이나 다른 세포에 연결되는 것을 볼 수 있었다. 박동하는 세포들도 많이 있었는데 서로 속도가 달랐으며 이들 세포에서는 많은 세포 소기관을 가지고 있고 또한 많은 공포가 세포내에 존재하였다.

이상은 실험군과 대조군의 구분이 없기 때문에 일치하는 소견이다.

표 1에서 나타나는 바와 같이 심근세포의 박동양상은 대조군에서 실험군보다 빠른 시간내에 전체 배양세포가 일치하여 박동하였다.

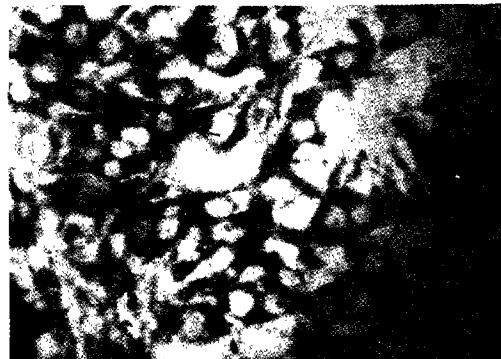


Fig. 3. Succinate dehydrogenase activity of myocardial cells at experimental group. Note the strong positive reaction (arrow), 8-day culture.  $\times 1000$ . Transmit photomicrograph.

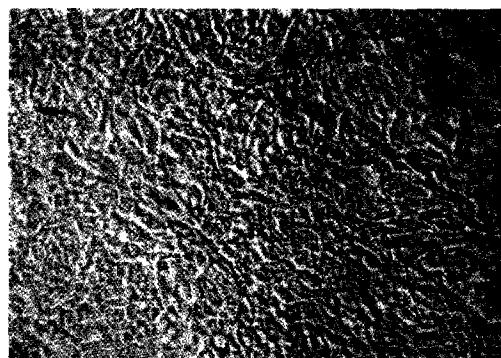
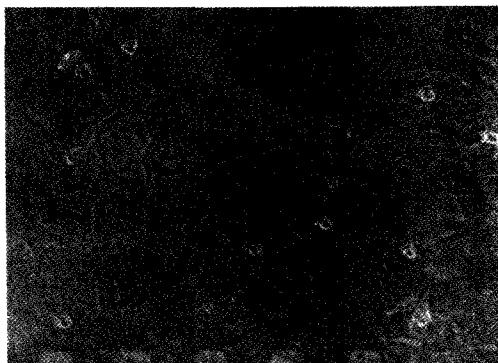


Fig. 4. At experimental group, myocardial cells, lls, leading to the formation of synchronized networks, become long and thin. 8-day culture.  $\times 200$ . Inverted photomicrograph.

이 때에는 박동하는 세포가 박동하지 않는 세포들 사이로 그물처럼 배열되어 있었다 (Fig. 4). 효소염색에서는 실험군과 대조군 보다 반응강도가 빠른 속도로 증가하였다 (Fig. 1~3).

반응파립의 형태는 반응강도와 거의 일치하여 나타났는데 실험군 0일에서는 이미 간상파립인데 비하여 대조군 0일에서는 여전히 원형의 파립형태를 보이고 있었고 간상파립은 핵주위에서 잘 나타났다 (Fig. 1).

반응파립의 배열형태는 대조군에서는 전세포의



**Fig. 5.** Six day culture of endothelial cells at control group. This culture forms partial multilayer.  $\times 200$ . Inverted photomicrograph.

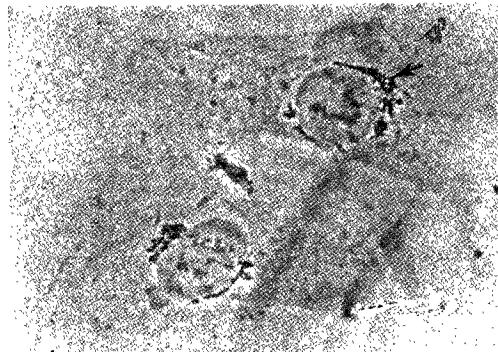


**Fig. 6.** Six day culture of endothelial cells at experimental group. As compared with control, this culture doesn't form monolayer. Note the size of cells being larger than the control.  $\times 200$ . Inverted photomicrograph.

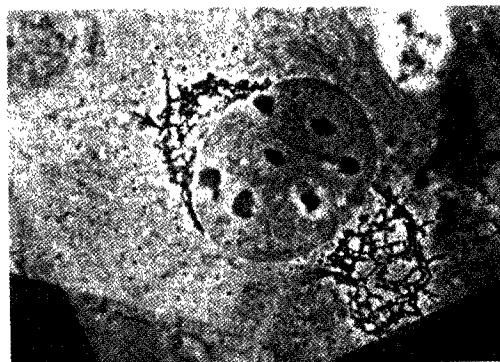
동시 박동이전인 대조군 1일에서 이미 규칙적으로 배열되기 시작하여 시간이 지남에 따라 더욱 규칙적으로 배열되었고 실험군에서는 대조군에 비하여 불규칙한 배열형태를 나타내었다.

## 2. 심장내피세포

대조군에서는 활발한 세포증식에 의하여 대조군 2일에서 전체 microcover glass가 완전히 한층의 세포들로 덮히게 되었고 대조군 4일부터는 세포들이



**Fig. 7.** Thiamine pyrophosphatase activity of endothelial cells at experimental group. Note the distribution of the enzyme in the Golgi network to one side of the nucleus (arrow). 5)day culture.  $\times 1000$ . Phase-contrast photomicrograph.



**Fig. 8.** Thiamine pyrophosphatase activity of endothelial cells at experimental group. Note the stronger reaction and larger cell than the control. In this cell type, the Golgi system is filamentous and complex (arrow), 8-day culture.  $\times 1000$ . Phase-contrast photomicrograph.

중첩되기 시작하였다 (Fig. 5). 이에 반하여 실험군에서는 DMSO를 처리한 후 많은 양의 세포가 떨어져 나가 소실되어 처음부터 세포수가 희석되었고 시간이 지나서도 완전한 한층의 세포층을 이루지 못하였고 세포증식이 대조군처럼 왕성하지 못하고 실험군 6일에서는 세포의 크기가 매우 커져 있었다 (Fig. 6).

효소반응의 강도에서는 실험군에서 대조군보다 비교적 강한 반응을 유지하였으나 실험군 0일은 음

성반응을 나타내었다 (Fig. 7~8).

실험군 0일에서는 세포의 분리배양 직후의 모습과 같이 세포질의 가장자리가 매우 농축되고 접혀져 있었다. 이는 실험군 2일에서 완전히 없어졌다. 그리고 시간이 지남에 따라 세포의 증식능력은 대조군 보다 멀어지고 세포의 크기가 대조군에 비하여 커졌다.

대조군에서는 세포수가 많아짐에 따라 세포들이 중첩되는데 이때에는 세포크기가 작아지고 중첩된 세포들중 윗층의 세포들은 세포질 가장자리가 농축

되어 질게 보였다.

## 고 칠

심장세포를 효소와 기계적인 힘을 병합 사용하여 세포를 분리하는 방법은 이미 보고되어 있고,<sup>8)</sup> 배양중의 심근세포와 내피세포의 특징도 밝혀져 있다.<sup>9,10)</sup>

세포는 배양중에 대개 생체에서의 특징을 나타내게 되고 또한 시간이 지남에 따라 점차 분화해간다.

Table 1. Variations of beating and reaction intensity of succinate dehydrogenase in rat myocardial cells in tissue culture after exposure to dimethyl sulfoxide.

Day in culture	Synchronized beating		Reaction intensity	
	Control	Experimental	Control	Experimental
0	NS ①	NS	+	+
1	PS ②	NS	+	++
2	S ③	NS	+	++
3	S	PS	+	+++
4	S	S	++	+++
5	S	S	++	+++
6	S	S	++	+++

①: myocardial cells showed no synchronized beating.

②: myocardial cells showed partial synchronized beating.

③: myocardial cells showed synchronized beating.

+++ : strong positive reaction.

++ : moderate positive reaction.

+: weak positive reaction.

- : negative reaction.

Table 2. Variations of cell monolayers and reaction intensity of thiamine phosphatase in rat endothelial cells in tissue culture after exposure to dimethyl sulfoxide

Day in culture	Cell monolayers		Reaction intensity	
	Control	Experimental	Control	Experimental
0	NM <sub>o</sub> ①	NM <sub>o</sub>	+	-
1	NM <sub>o</sub>	NM <sub>o</sub>	+ - ++	+
2	M <sub>o</sub> ②	NM <sub>o</sub>	+	++
3	M <sub>o</sub>	NM <sub>o</sub>	+	++
4	PM <sub>u</sub> ③	NM <sub>o</sub>	++	+++
5	PM <sub>u</sub>	NM <sub>o</sub>	++	+++
6	M <sub>u</sub> ④	NM <sub>o</sub>	++	+++

①: cell monolayer was not formed.

②: cell monolayer was formed.

③: partial cell multilayers were formed.

④: cell multilayers were formed.

이를 기초로 하여 DMSO의 심근세포와 심장내피세포에 대한 분화 유도효과를 살펴 보았다.

## 1. 심근세포

심근세포 배양 중에 생체에 따라 마찬가지로 자발적으로 수축을 한다. 그리고 시간이 지남에 따라 세포내에는 근세섬유와 사립체가 증가하고 근세섬유는 세포의 장축방향으로 일정하게 배열하여 생체의 심근세포를 닮게 되고 근세섬유에 맞추어 사립체도 점차 긴 막대형상으로 배열하게 된다.

그리고 세포전체의 모습은 매우 길어지는 경향이 있다.<sup>9)</sup> 그리고 심근세포의 박동은 세포의 분리배양 시 발생하는 근세섬유의 파괴를 재구성하고 재생산하는 것과 일치한다.<sup>11)</sup>

표 1에서 실험군이 대조군에 비하여 사립체의 양도 많고, 세포의 형태도 더욱 분화된 형태이나 근세섬유의 배열이 불규칙적이었고, 수축능력도 감소하였다.

DMSO가 심근세포에 대하여 분화유도제로서 작용하여 세포의 형태를 길게 하고 사립체의 양을 증가시켰으나 근세섬유의 파괴와 수축능력을 감소시켰다.

DMSO는 cytoplasmic microfilaments를 세포막으로부터 떨어져 나가도록 하는 역할이 있으며 세포의 운동성을 감소시킨다.<sup>12)</sup> 이러한 사실이 세포막과 연결된 근세섬유의 분리를 초래하여 심근세포의 수축능력은 감소시켰을 것으로 사료된다.

그리고 실험군 0일에서 핵주위에 간상파립이 특징적으로 나타나는 것은 세포막에서 떨어진 핵주위에서 근세섬유의 배열상태가 파괴되지 않았음을 나타낸다고 생각하였다.

## 2. 심장내피세포

심장세포 배양에서 세포의 성장은 환경에 따라 영향을 많이 받는데 그 요소로써는 세포 분리방법, 배양세포의 농도, 배양액의 성분, 사용동물의 나이 등이다.<sup>13)</sup> 이 중 배양세포의 농도에서 비교적 낮은 세포농도에서는 세포증식이 촉진되고 세포분화는 억

제되며, 높은 세포농도에서는 세포증식이 억제되고, 세포분화가 촉진된다. 그리고 10% DMSO는 세포의 접착력과 운동성을 잃게 하는데 DMSO를 제거하고 나면 원상태를 회복할 수 있다.<sup>12)</sup>

위의 사실로 실험군의 심장내피세포는 세척을 하는 중에 많이 떨어져 소실되어 세포수가 적어졌을 것이며, DMSO가 microcover glass에 부착된 세포질 가장자리에 작용하여 세포막을 바닥으로부터 일부 떨어지게 하여 접혀져 있는 부분이 생겼을 것으로 사료되었다.

심장내피세포의 왕성한 증식능력에 의해 대조군은 여러 층의 세포층을 형성하여 아주 높은 세포농도를 보였고 따라서 세포의 크기는 작아지고 여러 층의 세포층중 윗층의 세포는 완전히 펼쳐지지 못하고 세포질 가장자리가 놓축되어 나타난 것이다. 이러한 왕성한 증식능력을 가진 심장내피세포가 실험군에서는 증식능력이 감소하고 오히려 세포의 크기가 커짐으로써 microcover glass를 메웠다.

세포분화의 마지막은 보통 세포증식의 억제와 관련이 있다<sup>14)</sup>라는 것을 생각할 때 DMSO의 분화유도효과를 추측할 수 있었다. 그리고 실험군 0일을 제외하고 실험군에서는 대조군보다 효소반응이 강한 것도 DMSO의 분화유도효과를 잘 뒷받침하는 것으로, 심장내피세포의 충분히 분화된 기능 즉, 능동수송과 교원섬유의 합성을 수행하기 위하여서는 Golgi가 증가되었고 반응이 강하게 나타났다.

실험군 0일에서 음성반응을 보인 것은 세포막과 아주 밀접하게 연결된 Golgi가 DMSO에 의해 손상받은 세포막을 복구하기 위하여 모두 사용되어 고갈되었기 때문이라고 여겨졌다.

그리고 대조군 6일에서는 반응이 강해진 것은 세포농도가 높아져 분열보다는 분화의 기능이 활발해졌다는 것을 암시하여 배양을 더욱 진행하여 세포농도를 높여나가면 생체에서와 같은 모습과 기능의 심장내피세포를 얻을 수 있을 것으로 기대되었다.

## 요약

효소와 기계적인 힘을 이용하여 얻어진 심장세포

를 심근세포와 내피세포를 분리하여 48시간 배양한 후 양군으로 나눠서 관찰하였다.

실험군은 배양중에 10% DMSO에 1시간 처리하였고 DMSO를 처리하지 않고 계속 배양한 것을 대조군으로 하였다. DMSO효과를 관찰하기 위하여 도립현미경 하에서 세포의 형태, 수축능력, 증식 능력 등을 관찰하였고, 심근세포에서는 succinate dehydrogenase 반응으로 사립체의 증감을 대조군과 비교하였고, 심장내피세포에서는 thiamine pyrophosphatase의 반응으로 Golgi의 양을 대조군으로 비교하였다.

실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1. DMSO에 의하여 심근세포는 분화된 형태로 모양이 길어졌고 사립체의 증가에 의해 succinate dehydrogenase의 반응이 대조군보다 강하게 나타났다.

2. DMSO에 의해 심근세포는 근세섬유의 파괴와 혼란이 초래되었고 이로 인하여 수축능력이 감소되었다.

3. 심장내피세포는 DMSO에 의해 세포증식이 감소되고 고유기능이 강조되어 Golgi의 표지효소인 thiamine pyrophosphatase의 반응이 대조군보다 강하였다.

4. 심장내피세포는 DMSO의 세포접착력 소실과 운동성 소실작용에 의해 배양중 많은 세포의 손실이 초래되었다.

## 참 고 문 헌

- Gonzales, F., and Luyet, B. : Resumption of heart-beat in chick embryos frozen in liquid nitrogen. *Biodynamica.*, 7 : 1-5, 1950.
- Kasten, F. H., and Yip, D. K. : Reanlmaton of cultured mammalian myocardial cells during multiple cycles of trypsinization-freezing-thawing. *In vitro*, 9(4), 246-252, 1974.
- Friend, C., Sher, W., Holland, J. G., and Soto, 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.
- Yenofsky, R., Cereghini, S., Krowczynska, A., and Brawerman, G. : Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiated by exposure to dimethyl sulfoxide. *Molecular and Cellular Biology*, 3(7) : 1197-1203, 1983.
- Wilczynska, 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.
- Waalkes, M. P., and Wilson, M. J. : Increased synthetic capacity for metallothionein in cultured liver cells following dimethyl sulfoxide. *Pretreatment*, *Exp. Cell Res.* 169 : 25-30, 1987.
- Muakkassah-Kelly, S. F., Bieri, F., Bentley, F. W., and Stäubli, W. : Long-term maintenance of hepatocytes in primary culture in the presence of DMSO : Further characterization and effect of nafenopipera peroxisome proliferator. *Exp. Cell Res.* 171 : 37-51, 1987.
- Kasten, F. H. : Mammalian myocardial cells. In *tissue culture methods and application*. Acad. Press. N. Y. 72-81, 1973.
- Kasten, F. H. : Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cells in culture. *Acta. Histochem.*, 9 : 775-805, 1971.
- Kasten, F. H. : Rat myocardial cells in vitro : Mitosis and differentiated properties. *In vitro*, 8(3) : 128-149, 1972.
- Cristofalo, V. J., and Holeckova, E. : Cell impairment in aging and development. Plenum. Co., New York, 99 : 389-420, 1975.
- Fukui, Y., and Katsumaru, H. : Dynamics of nuclear action bundle induction by dimethyl

- sulfoxide and factors affecting its development. *J. Cell Biol.*, 84 : 131-140, 1980.
13. DeHann, R. L. : Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. *Develop. Biol.* 16 : 216-249, 1967.
14. Yen, A., and Chiao, J. W. : Control of cell differentiation during proliferation. *Exp. Cell Res.*, 146 : 87-93, 1983.

— Abstract —

## Effects of Dimethyl Sulfoxide on the Differentiation of Myocardial and Endothelial Cells

Dong Hyup Lee, Yee Tae Park, and Sung Sae Han

*Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery  
College of Medicine, Yeungnam University  
Taegu, Korea.*

Yung Chang Lee

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

To elucidate the effects of dimethyl sulfoxide on myocardial and endothelial cells in culture, the cells were exposed to 10% dimethyl sulfoxide in culture medium for 1 hour at 48 hours after cell isolation.

The general morphology and the cytochemical reaction of marker enzymes for mitochondria and Golgi complexes were investigated.

The results were summarized as follows.:

1. DMSO induced elongation and narrowing of the cells and increase of mitochondrial reaction in myocardial cells.
2. DMSO induced destruction and disruption of myofibrils in myocardial cells resulting in increase of contractile activities.
3. In the endothelial cells, DMSO suppressed proliferative activities but thiamine pyrophosphatase reactions were enhanced indicating increase of Golgi complex activity.
4. DMSO seemed to hamper with the adhesiveness and motility of the endothelial cells causing the decrease of the number of cells in vitro.