Korean J. Zool. 35:308-321, 1992

계배심근 근원섬유형성에 관한 면역형광, 면역전자현미경 및 전기영동 연구

하재청 · 김동수

부산대학교 자연과학대학 생물학과

심근세포는 골격근 세포와 더불어 세포의 분화기작을 이해하기 위한 좋은 모델이라 할 수 있다. 본 연구에서는 심근세포의 배양중에 일어나는 심근 근원섬유형성과정에 대한 이해를 위하여 SDS- 및 two-dimensional gel electrophoresis와 immunofluorescent 및 immunoelectron microscopy를 수단으로 이를 검토하였다. 배양과정에서 나타나는 주요한 단백질 중에서 SDS-PAGE에 의해 209 kDa와 53 kDa 및 46 kDa band가 각각 막분획 및 세포질 분획 단백질에서 배양과정동안에 가장 현저한 양상을 보였다. 특히 배양 3일과 4일의 양상에서 뚜렷한 변화를 나타내어 이들의 OD 값은 배양 96시간에서의 막분획에서 0.38(209 kDa)와 0.52(53 kDa) 및 배양 72시간에서의 세포질 분획에서 0.34(46 kDa)로 각각 최고치를 나타내었다. 또한 이차원 전기영동상의 양상에서도 세포질 및 막분획 단백질의 전반적인 전개양상이 배양 96시간에서 가장 두드러짐으로써 결국 배양 72시간 및 96시간대에서 심근 모세포의 분화와 관련된 일련의 단백질 합성과정이 가장 활발하다는 것을 알 수 있었다. 배양중에 발현되는 actin에 대한 형광현미경적 분석에 의해, actin은 세포내에서 불균등하게 분포하였고 근원섬유가 형성되는 시기인 배양 96시간에 세포외곽부에서 나타나는 다소 강한 염색성을 관찰할 수 있었다. 심근세포의 근원섬유는 전자현미경 관찰에 의해 primitive forms로 배양 96시간에 출현함을 알 수 있었으며 이 시기의 근원섬유의 형태는 여러 구성대(A, H and M bands)가 미약하나 I대는 비교적 뚜렷하였다. 따라서 심근세포의 근원섬유형성과정에서 관찰되는 뚜렷한 단백질양상의 변화와 근원섬유의 출현시기 및 구성과정간에는 중요한 관련성이 있으며 이러한 과정에서 actin은 세포질내에서 불균등한 분포를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

KEY WORDS: Actin, Cardiac myoblast, Differentiation, Myofibrillogensis

발생과 진화의 관점에서 횡문근섬유는 현저하게 보존적인 구조이다(Choi *et al.*, 1988; Fischman, 1986). 발생중의 세포는 여러 계통의 기간세포로 전환되는 결정 단계와 이 기간세포의 증식을 거쳐 각 조직의 특이한 세포로 다양화, 특수화되는 분화 단계를 거친다(Konisberg, 1982). 세포분열 및 세포분화기작에 관한 연구는 발암현상과 기관 및 조직의 발생과정 등을 이해하는 문제와 관련하여 현대생물학의 주요한 연구 과제가 되고 있다.

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 지방대 육성 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

근세포의 분화는 분화의 말기모델로서 널리 연구되어 왔다(Daubas *et al.*, 1981; Nguyen *et al.*, 1983). 세포분화를 연구하는 효과적인 방법 중 하나는 전구세포 또는 종양에서 유래한 세포를 배양함으로써 이루어진다. 근세포의 배양은 분화과정에서 나타나는 근모세포의 융합현상을 통하여 성장하는 근섬유의 형성과정과 관련된 근섬유 구성단백질에 대한(Shainberg *et al.*, 1971; Paterson and Strohman, 1972) 또는 유전자발현 등의 규명을 위해(Yaffe and Dym, 1973) 폭넓게 적용되어 왔다. 골격근 조직은 이러한 배양체계에 의해서 적용되어 왔지만 다른 유형의 조직에는 잘 적용되지 못하였다(Powell and Twist, 1976). 심근발생

을 위한 연속적인 조직배양모델은 널리 적용되고 있는 골격근에 대한 세포배양법과는 달리 잘 알려져 있지 않다. 태아, 분만 전후 및 성체의 심근세포발생에서 뚜렷한 단계가 형태학(Manasek, 1970; Sreter *et al.*, 1975), 생화학, 또는 면역학적(Claycomb, 1986) 및 최근에 분자적(Izumo *et al.*, 1985) 영역에서 연구되고 있다. 게다가 심장의 중요한 분비물인 atrial natriretic factor(ANF)의 발현이 심근발생동안 조절되는 것으로 알려졌다(Block *et al.*, 1986). 그러나 심근세포의 성숙 및 이들의 수축과 분비표현에 영향을 주는 조건에 대해서는 잘 이해되고 있지 않다. 물론 심근세포는 심장의 근육에서 분리되어 배양으로 유지될 수 있지만 이들 세포는 잘 증식하지 못하며 불완전한 발생양상을 나타내게 된다(Powell and Twist, 1976). 심근세포의 전구세포인 심근모세포에 대한 배양체계의 발달은 심근세포의 증식과 점진적 분화를 가능하게 하며 발생동안의 심근의 유전자발현(cardiac gene expression)에 대한 하나의 유용한 시험관모델(*in vitro* model)이 될 수 있다.

근세포분화에 대한 대부분의 *in vitro* 연구에서 세포융합 이전에 근섬유형성을 위한 다량의 myosin 축적과 myofibrils의 출현이 있음을 알 수 있고(Fischman, 1972), 또한 배양중인 근세포의 분화요인에 세포분주밀도 및 배양액의 조성과 같은 세포외부적 환경요인이 주요하게 작용한다고 보고되었다(Ha *et al.*, 1985). 심근세포는 골격근세포와는 달리 분화후에도 다핵의 근섬유를 형성하지 않고 단핵의 심근세포(cardiac myocytes)로 된다. 심근모세포 분화의 중요한 현상은 세포내부에 근수축(muscle contraction)에 관계되는 근원섬유(myofibrils)의 형성에 있다. 다른 여러 종(species)들에 있어서, 심장발생동안 일어나는 생화학적 현상간에는 관찰되는 중요한 차이가 있음이 보고되었고(Clark *et al.*, 1982; Syrovy, 1982), 이로 인해 결국 인간 심장근육의 조직배양에 대한 연구의 필요성이 강조되고 있다(Schultheiss *et al.*, 1990). 그러나 국내의 심근세포에 대한 전반적인 연구보고는 별로 없으며, 따라서 본 연구는 심근세포에 대한 기초과학적 연구의 일환으로 심근모세포를 배양하고 심근세포로 분화되는 과정 중에 일어나는 일련의 조직발생학적 현상 및 심근근원섬유형성과정(cardiac myofibrillogenesis)을 관찰하고자 면역학적 수단을 이용한 면역형광(immunofluorescent) 및 면역전자현미경법(immunoelectron microscopy)과 전기영동 분석(electrophoretic study)을 통한 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

세포배양

실험에서 사용된 계배는 부산 김해 소재 한신부화장에서 구입하였다. 심근조직은 11일된 계배로부터 무균적으로 적출한 후 잘게 자르고 효소용액(0.05% trypsin)으로 4°C에서 12시간 동안 처리하였다. Swany-filter에 신속히 통과시킨 후 얻어진 단일세포액은 37°C에서 39분간 preplate한 다음 수거하여 84% MEM, 10% horse serum, 5% embryo extract 및 1% penicillin-streptomycin으로 구성된 배지에서 5×10^5 cells/ml의 분주농도가 되게 희석한 다음 collagen으로 coat된 culture dish에 분주하여 1일 동안 배양후 5% horse serum을 함유하는 배지로 바꾸어 주었다.

단백질 분리 및 정량

전기영동분석을 위한 심근세포의 세포질 단백질은 배양세포를 cell scraper로 긁어 수거한 후 sonicator(W 384, USA)로 파쇄한 다음 15,000 × g에서 45분 동안 원심분리하여 획득한 상징액을 사용하였다. 한편 막 단백질의 분리를 위해 심근세포의 막분획에 0.05% sodium deoxycholate 용액을 가한 후 sonicator로 30초간 처리한 다음 이를 분석에 사용하였다. 단백질함량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법으로 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 측정하였다.

전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli(1970)의 방법을 약간 변형하였다. Slab gel 분석에는 LKB 전기영동장치를 사용하였으며 5-12.5%의 linear gradient gel을 gradient gel former(LKB)

로 조제한 후 각 well 당 50 μg의 단백질을 가하여 10°C에서 15 mA/slab로 4시간 동안 영동시켰다. 이차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법에 따라 isoelectrofocusing을 4% tube gel에서 실시한 다음 2D-PAGE로서 5-15%의 slab gel에 전개시켜 이차원적 전기영동상을 구하였다. Gels은 0.2% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 7% acetic acid로 탈색한 다음 570 nm에서 TLC scanner(Shimadzu)를 사용하여 bands의 density를 조사하는 한편 이차원 전기영동상의 spots 양상을 비교, 검토하였다.

면역형광염색

18 mm^2 크기의 coverslips상에 배양된 심근세포를 회수하여 PBS에 수세한 후 4% paraformaldehyde 용액으로 고정하고 methanol로 2분간 처리한 다음 면역염색을 하였다. 비특이적 결합을 막기 위해 1% BSA로 block한 후 1 : 300으로 희석한 actin 항체(anti-actin polyclonal antibody, Sigma)로 1시간 동안 염색한 다음 생쥐의 IgG에 대한 항체에 FITC를 결합시킨 형광 probe를 1 : 100의 농도가 되게 0.3% triton X-100으로 희석하여 200 μl/slip되게 가한 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 면역염색이 끝난 후 배양 slips을 50% glycerol(in PBS, pH 8.6)로 봉입한 다음 Olympus BH-2 형광현미경하에서 관찰 및 촬영하였다.

면역전자현미경 관찰

Colloidal gold용액은 Bendayan(1984)의 방법에 따라 제조하였다. 1% chlorauric acid를 끓이면서 1% sodium citrate를 가한 후 10분간 가열한 뒤 200 mM K_2CO_3로 pH를 6.9에 맞추었다. 5 vol.의 gold 용액에 1 vol.의 Protein A를 잘 섞고 100,000 × g에서 1시간 동안 원심분리하여 red pool을 취한 뒤 gold buffer(0.02% PEG in PBS, pH 7.2)에 부유시켜 이를 580 nm에서 흡광도가 0.2가 되도록 조정한 뒤 이를 15 nm 크기의 probe로서 사용하였다.

초박절편은 배양세포를 수거하여 4% paraformaldehyde와 0.2% glutaraldehyde로 고정하였다. 고정된 시료는 수세 및 탈수 후 epoxy resin에 포매하고 이 blocks를 초박절편기(LKB 2188 Ultratome NOVA)를 사용하여 60-80 nm의 두께로 자른 후 nickel grid에 회수한 다음 1 : 10(v/v)으로 희석된 actin 항체(polyclonal, Sigma)를 30 μl 씩 grids에 가하여 2시간 동안 면역염색하였다. TBS(pH 7.2)로 grids를 수세한 다음 PAG complex 용액을 100 μl/grid되게 가하였다. 최종, grids는 TBS로 2회씩 수세한 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색(Millonig, 1961)한 후 투과전자현미경(JEOL-100SX)으로 80 KV에서 관찰하였다.

결 과

심근세포배양

심근모세포의 분화과정을 알아보기 위하여 배양 12시간에서 5일까지의 양상을 검토하였다. 심근모세포는 배양후 12시간에 배양면에 부착하여 분열상을 나타내었으며 fetal cardiac myocyte는 잘 관찰되지 않았고(Fig. 1A) 배양 24시간에서 비교적 활발한 세포분열이 시작되어 전형적인 근모세포의 증식이 관찰되며(Fig. 1B) 이후 증식하는 세포들은 배양면상에 정렬되어 가고(Figs. 1C, 1D) 특히 배양 4일의 심근세포는 세포가 크고 세포질내에 짙은 과립을 소유하는 분화양상을 보였다(Fig. 1E). 배양 5일에서는 배양 4일의 양상과 광학현미경적으로 큰 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 1F). 본 연구의 세포배양에서는 심근모세포가 배양 4일에 가장 뚜렷한 분화양상을 나타내는 것으로 관찰되었다. 또한 근수축단백질을 생산하지 않는 크고 편평한 모양의 cardiac fibroblasts는 세포배양전의 preplating에 의해 효과적으로 제거되어 배양과정 중의 이들의 증식은 잘 관찰되지 않았다.

단백질 합성양상

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)와 two-dimensional electrophoresis를 이용하여 심근세포의 분화과정 동안에 일어나는 세포질 및 막 단백질의 주요한 양상을 조사하였다. Fig. 2는 심근세포의 세포질 분획에 대

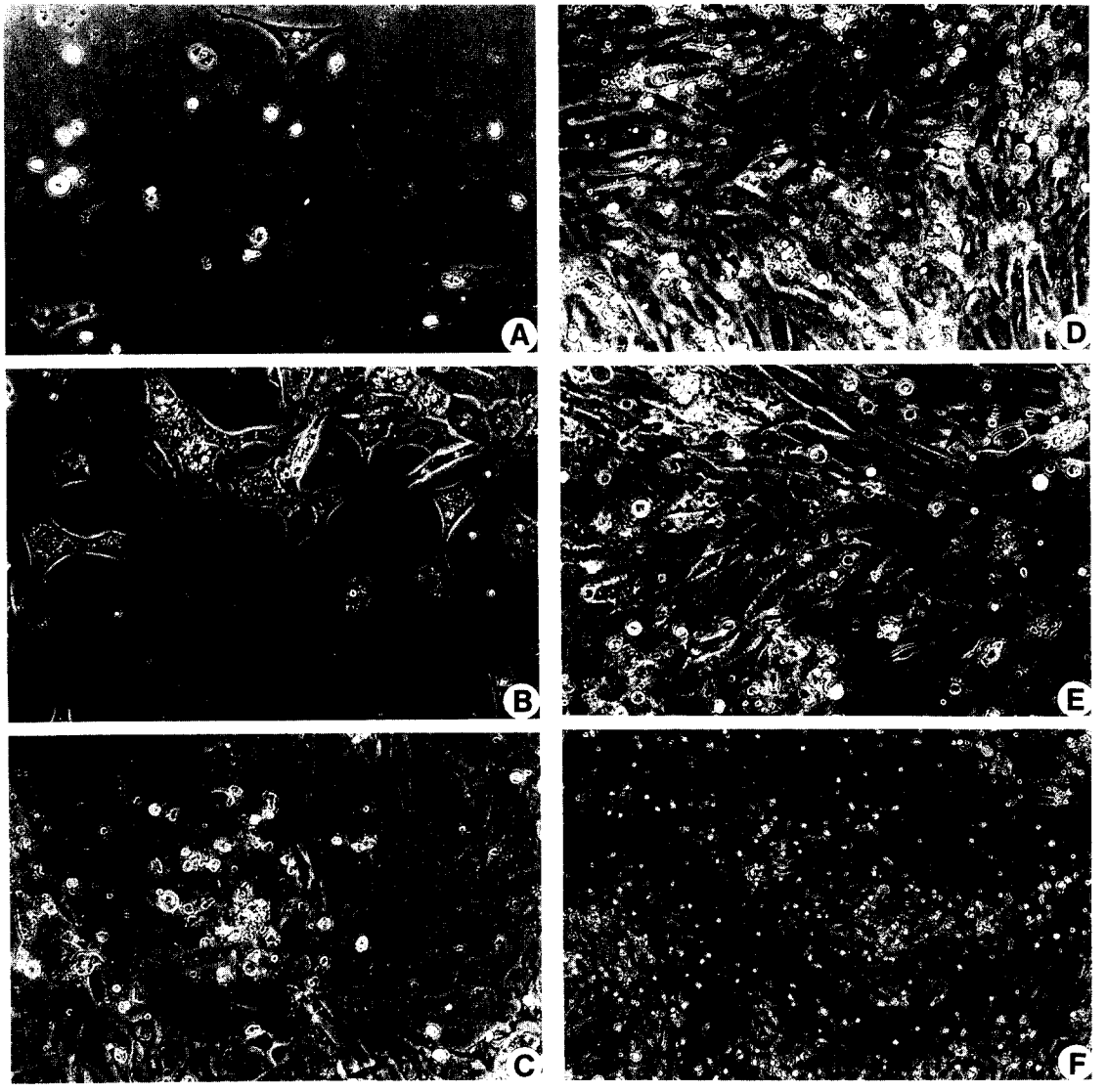

Fig. 1. Phase-contrast microphotographs showing chick cardiac myoblast differentiation *in vitro*. Cultured cells were photographed at the intervals of 24 hr after initial plating; 12 hr (A), 24 hr (B), 48 hr (C), 72 hr (D), 96 hr (E), and 120 hr (F). Long and short arrows indicate primitive cardiac myocyte and proliferating cardiac myoblast, respectively. (× 200).

한 전기영동상을 densitometric scanning 결과와 함께 나타낸 것이다. SDS-PAGE에 의한 세포질 분획에 대한 전기영동상에서 배양 12시간의 lane은 bands가 거의 검출되지 않았으나(Fig. 2A) 배양 24시간에서 뚜렷한 단백질의 합성양상이 나타나기 시작하였으며 특히 분자량 46 kDa의 단백질이 우세하게 검출되었다(Fig. 2B). 이 band의 OD값은 배양 24시간의 양상에서 0.20으로 다른 bands에 비하여 높은 pick를 나타내었으며 이후 배양이 진행됨에 따라 OD값은 점차 증가하여 배양 72시간에서 0.34로 최고치를 보였고 배양 96시간에서도 비슷한 정도의 OD값(0.32)을 나타내었다(Figs. 2C-E). 한편 이러한 양상은 배양 120시간에서 달라져 전반적인 단백질의 picks 양상이

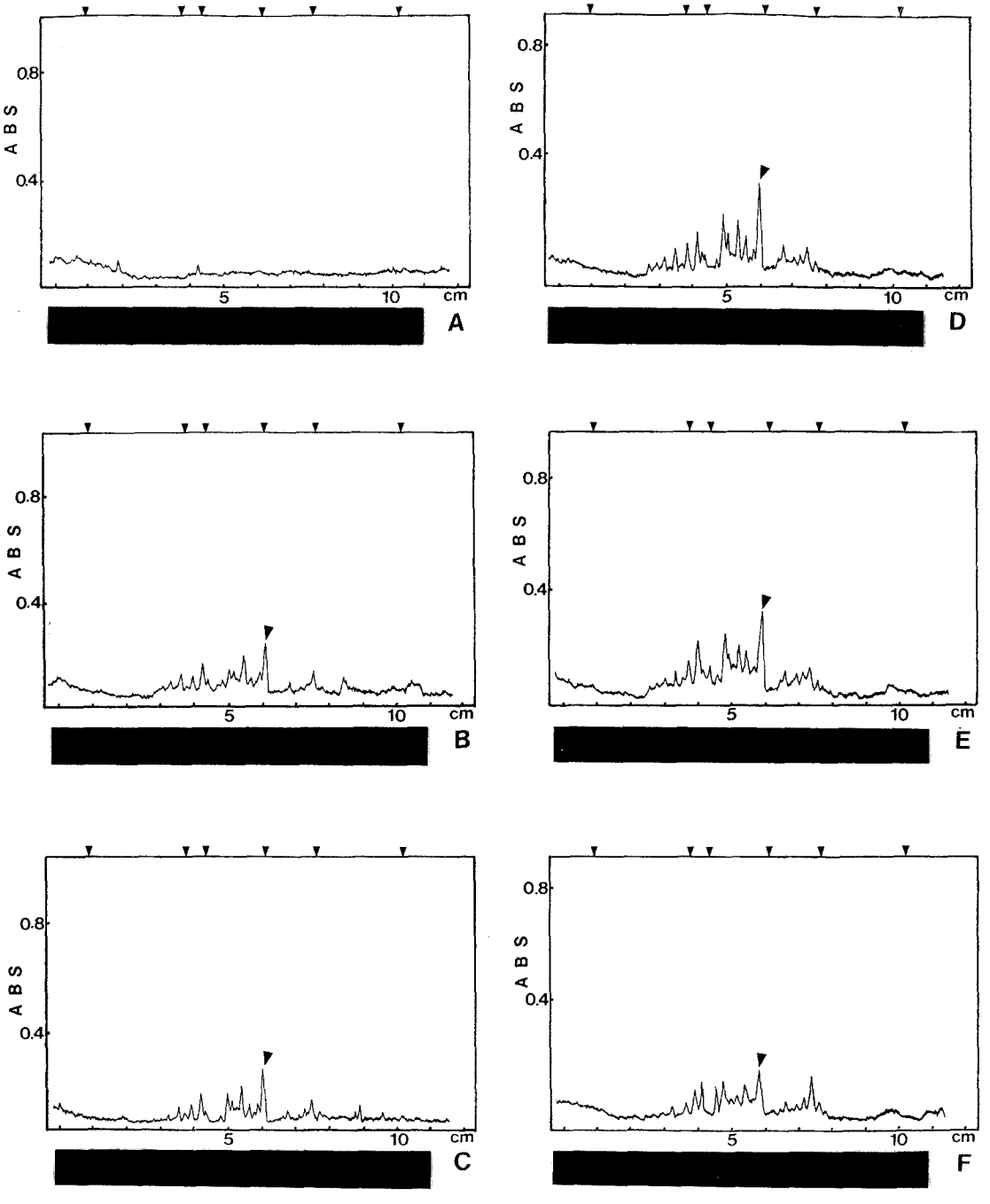

Fig. 2. Densitometric scanning of 5-12.5% gradient SDS-PAGE of the cytosolic fraction from cultured cardiac myoblasts. Arrow denotes 46 kDa protein. A, 12 hr; B, 24 hr; C, 48 hr; D, 72 hr; E, 96 hr; F, 120 hr culture after initial plating. Arrows on the top of each graph indicate M. W. standard (205, 77, 66, 45, 30, 17.2 kDa from the left).

다소 약하게 나타나는 경향을 보였으며(Fig. 2F) 특히 배양과정 내내 가장 우세한 pick로 나타난 46 kDa 단백질의 OD값은 0.18로 매우 감소되는 것을 관찰하였다. 막분획 단백질에 대한 SDS-PAGE 전기영동상에 있어서(Fig. 3) 배양 12시간의 양상은 세포질 분획의 양상에서 나타난 것과 유사하게 뚜렷한 picks를 관찰할 수 없었으나 분자량 53 kDa의 band는 약한 pick로 검출되어 0.10의 OD값을 나타내었다(Fig. 3A). 그러나 배양 24시간의 양상에서 크게 높아진 두개의 picks가 검출되었는데 이들의 분자량은 각각 209 kDa와 53 kDa이었으며 OD값은 각각 0.38과 0.39로 나타났다(Fig. 3B). 이들 중 209 kDa band의 OD값은 배양이 진행되는 동안에 비교적 일정하게 유지되어 배양 96시간의 양상에서도 0.38로 관찰되었다(Fig. 3E). 한편 53 kDa band의 OD값은 배양 12시간 이후 점차 증가하여 배양 96시간에서 최고치(OD = 0.52)를 보여 주었다(Fig. 3F). 그러나 이들 두 bands의 값은 배양 120시간의 양상에서 각각 0.23과 0.43으로 다소 감소되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3F). Fig. 4는 심근세포의 분화과정동안에 합성되는 세포질 분획 단백질에 대한 이차원 전기영동상으로(Figs. 4A-F) 배양의 진행 동안에 뚜렷한 변화를 나타내는 10개의 spots를 표시하고 비교하였다. Fig. 4A는 배양개시후 12시간이 경과한 양상으로 spots를 알아보기 힘든 미약한 단백질 양상을 나타내고 있다. 그러나 배양 개시후 24시간부터 다수의 뚜렷한 spots이 나타나기 시작하여 spot 5(57.3 kDa)와 spot 8(38.1 kDa)이 양적으로 뚜렷한 양상을 보였다(Fig. 4B). 분자량 57.3 kDa인 spot 4는 배양 72시간에서 크게 증가하였으며 이후 배양이 진행됨에 따라 전개되는 단백질의 양상은 배양 96시간에서 현저하여 spot 1(80.5 kDa), spot 3(58.6 kDa), spot 6(49.9 kDa) 및 spot 9(38.1 kDa) 등의 두드러진 spots가 관찰되었으며 특히 spot 2(70.3 kDa)는 양적으로 가장 우세하였다(Fig. 4E). 그러나 배양 120시간의 양상에서 나타난 것과 같이 spot 7(46.3 kDa)와 spot 10(31.5 kDa) 등을 포함하는 전반적인 spots 양상이 매우 감소되어 나타나는 경향을 보여주었다(Fig. 4F). 한편 막단백질에 대한 이차원 전기영동에 있어서의 주요한 spots 양상을 Fig. 5에 나타내었는데 세포질 분획의 양상과 유사하게 배양 12시간의 양상은 미약하였다(Fig. 5A). 그러나 배양 24시간에서 나타나기 시작하는 다수의 spots는 배양의 진행과 더불어 현저한 양상을 보여 배양 96시간에서의 spot 1(74.1 kDa), spot 2(71.1 kDa), spot 3(50.9 kDa), spot 4(48.6 kDa) 및 spot 5(32.5 kDa) 등의 단백질이 매우 두드러진 양상을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 5E).

근원섬유 및 actin의 양상

심근세포의 분화과정중에 발현되는 actin 분포를 형광현미경으로 관찰한 결과는 Figs. 5A-F에 나타내었다. FITC로 표지한 심근세포의 염색성은 배양 12시간에는 상당히 미약하여 잘 관찰되지 않았으나(Fig. 5A) 배양이 진행됨에 따라 뚜렷한 actin의 세포내 분포 및 이동성을 알 수 있었다(Figs. 5B-E). Actin은 배양 24시간에서 세포전반에 걸쳐 매우 미약하게 나타났고 핵주변부에서 다소 강하게 나타나는 시기는 배양 48시간이었으며 가장 강한 signal은 배양 96시간에서 관찰되었다(Fig. 5E). 이시기의 actin 분포양상은 세포질내 부분적인 강한 염색성을 보이며 특히 세포외곽부에서 다소 강한 signals이 관찰되는 것으로 보아 myofibrils이 주로 형성되는 곳(Lemanski, 1973)과의 관련이 있는 것으로 생각되었다. Fig. 5F에서 나타난 것처럼 actin의 signal은 배양 96시간의 것보다 다소 약하며 이러한 양상은 단백질에 대한 전기영동적 결과를 잘 뒷받침해 주었다. 그러나 발생중의 심장에서 관찰되는 심근세포의 근원섬유와 관련된 규칙적인 염색성(Shen and Lemanski, 1989)은 적었으며 이는 배양심근세포에 대한 보다 확연한 근원섬유형성 및 근절구성과정의 유도를 위한 적절한 배양체계의 필요성을 시사하고 있다. 또한 심근모세포의 분화과정중에 확연히 나타나는 actin의 이동적 양상은 actin mRNA의 translation 및 actin translocation과 다소 관계가 있음을 말해주는 것이다(Sundell and Singer, 1990). 전자현미경관찰에 의한 결과는 Figs. 6A-D에 기재하였다. Figs. 6A, B에서 나타나는 것처럼 배양 72시간까지는 뚜렷한 형태의 근원섬유구조를 볼 수 없었으며 다수의

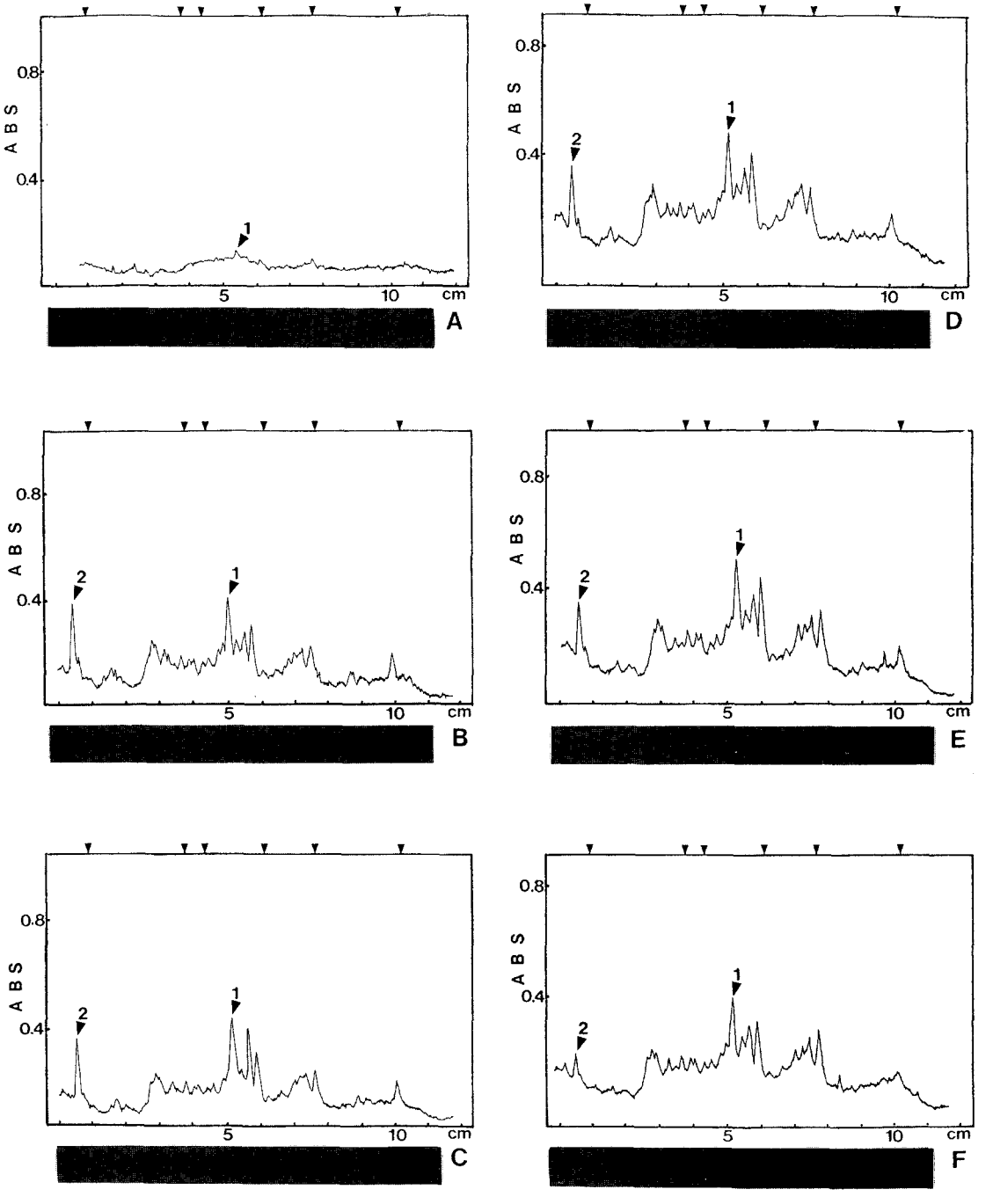

Fig. 3. Densitometric scanning of 5-12.5% gradient SDS-PAGE analysis of the membrane fraction from cultured cardiac myoblasts. Numbered arrow 1 (53 kDa) and 2 (209 kDa) denote major protein bands. A, 12 hr; B, 24 hr; C, 48 hr; D, 72 hr; E, 96 hr; F, 120 hr culture after initial plating. For M. W. std., see Fig. 2.

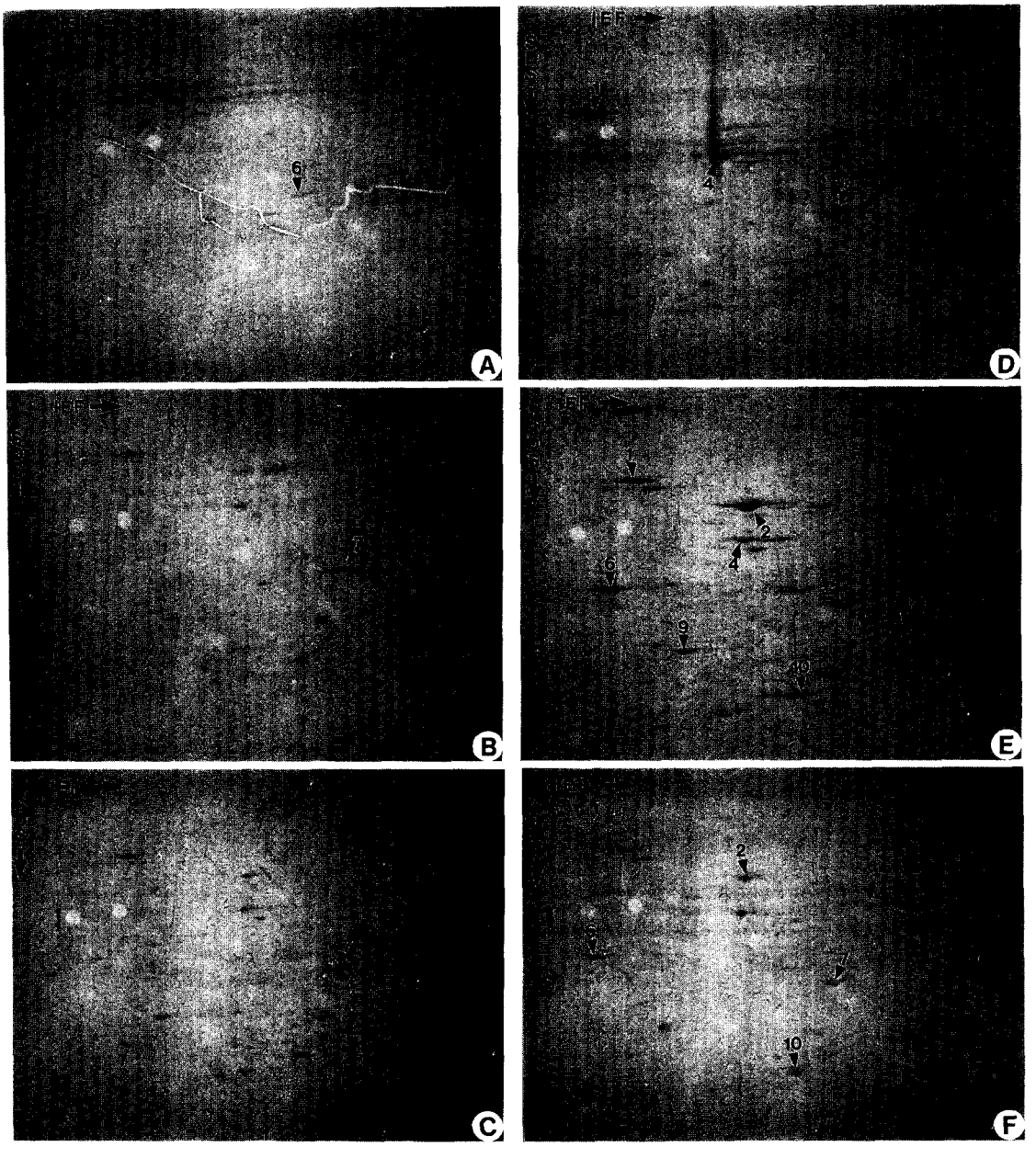

Fig. 4. Protein patterns revealed by 2-dimensional electrophoresis in the cytosolic fraction of cultured cardiac myoblasts. Numbered arrowheads (1 to 10) denote major distingishable spots. A, 12 hr; B, 24 hr; C, 48 hr; D, 72 hr, E, 96 hr; F, 120 hr of culture. Bars on the right side indicate M. W. standard (77, 66, 45, 30).

mitochondria와 함께 미세섬유상으로 세포질내에 분포하고 있었다. Primitive myofibrils의 등장은 배양 96시간에서 관찰되었으며 이 시기의 myofibrils의 형태는 다소 명확한 Z band를 나타내보였으나 다른 여러 band(A, H and I bands)는 잘 관찰되지 않았다(Fig. 6C). 배양 120시간 후의 심근세포에서는 배양 96시간의 양상과 비교하여 볼 때 큰 변화는 없었다(Fig. 6D).

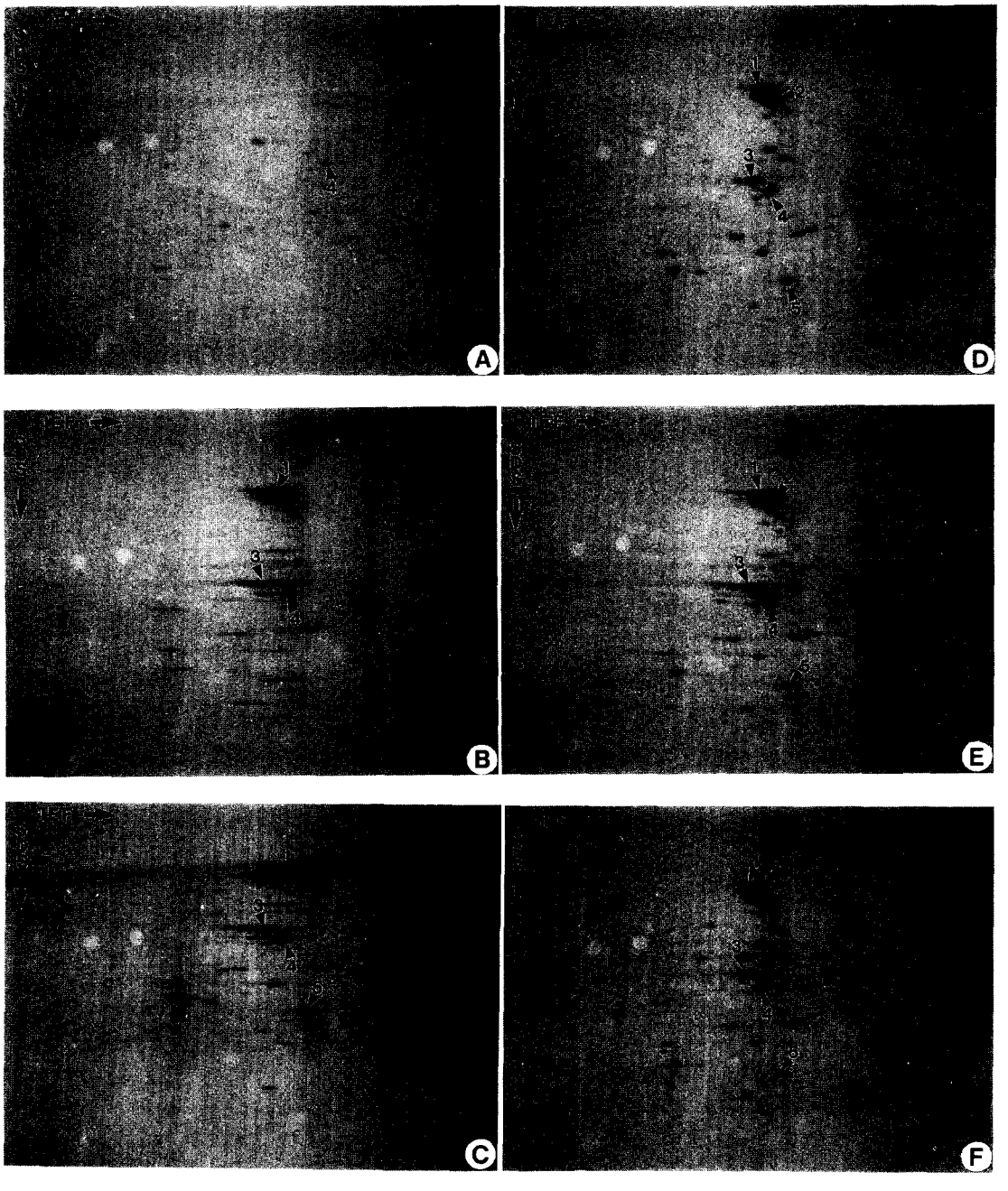

Fig. 5. Protein patterns revealed by 2-dimensional electrophoresis in the membrane fraction during cardiac myogenesis in culture. Numbered arrowheads (1 to 5) denote major distingushable spots. A, 12 hr; B, 24 hr; C, 48 hr; D, 72 hr, E, 96 hr; F, 120 hr of culture. Bars indicate M. W. std. (see Fig. 4).

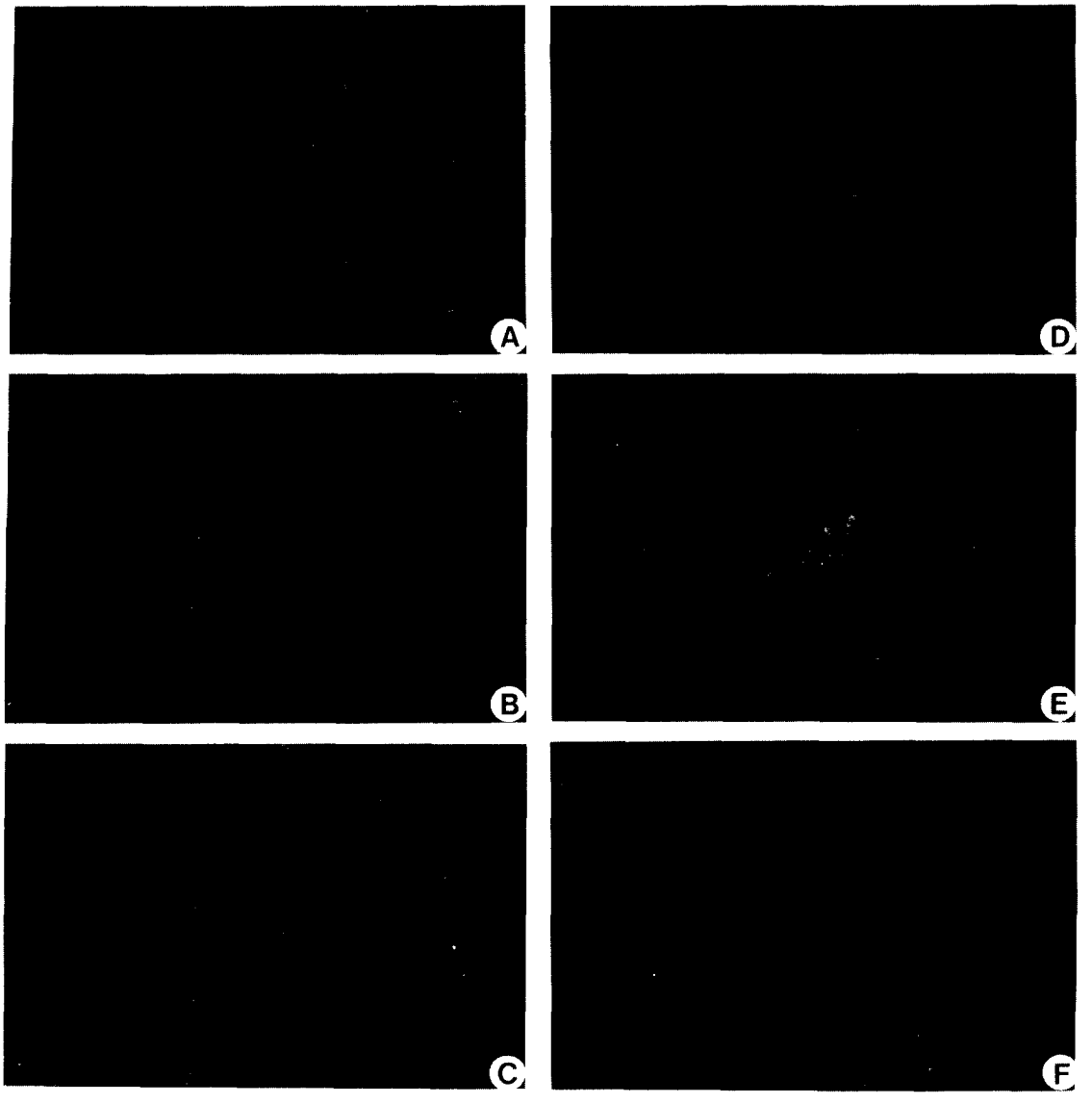

Fig. 6. Immunofluorescent micrographs on actin of cultured chicken cardiac myoblasts. Cells are cultured on coverslips and fixed in paraformaldehyde, then indirectly stained using FITC-conjugated secondary antibody. A-F: A (12 hr), B (24 hr), C (48 hr), D (72 hr), E (96 hr) and F (120 hr) in culture. Magnification, A-F: × 200.

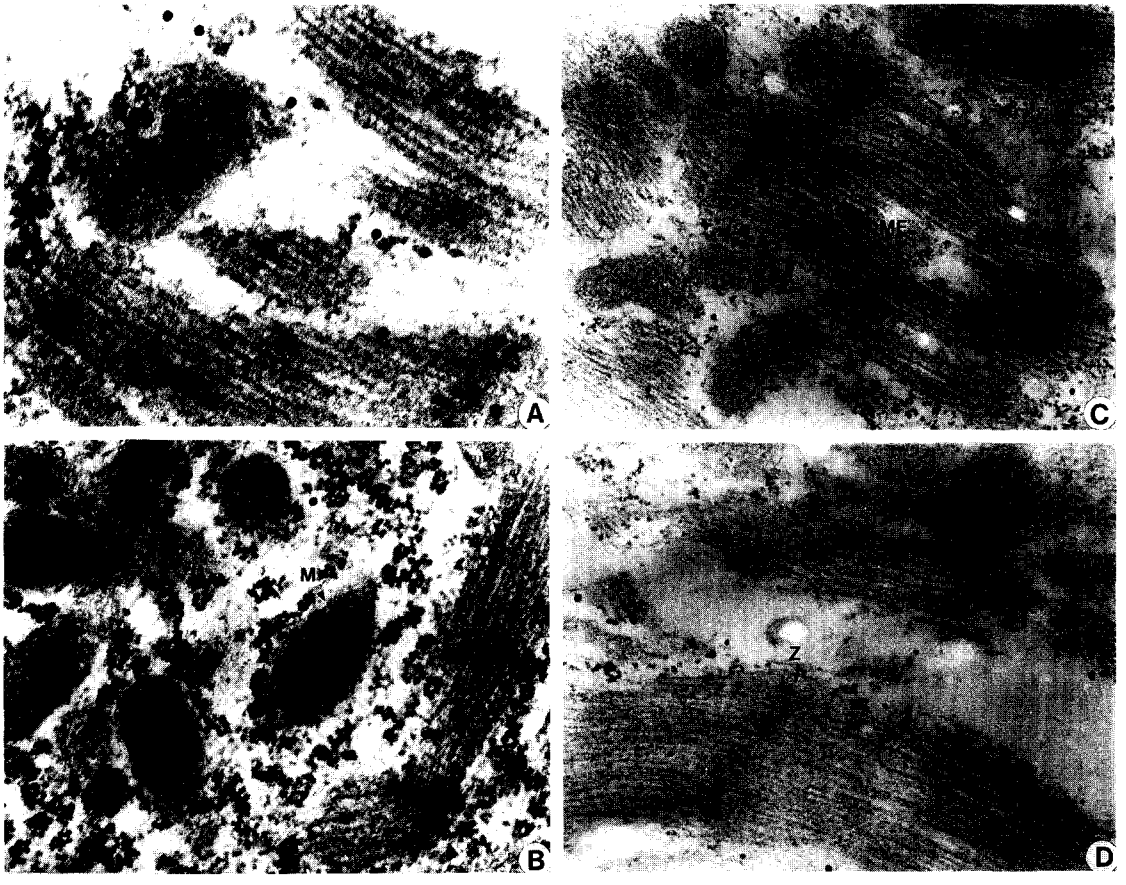

Fig. 7. Immunogold electron microscopy on cultured chicken cardiac myoblasts. A-D: A (48 hr), B (72 hr), C (96 hr), D (120 hr) in culture. The incomplete myofibrillar structure began to appear in 96 hr culture. The gold particles appear as black dots on the micrographs. M: Mitochondria, MF: Myofibril, Z: Z-band. Uranyl acetate and lead citrate counter — stain. Original magnification: × 50,000 (A), × 40,000 (B), × 25,000 (C), × 30,000 (D).

고 찰

분화된 근조직의 기능적 성분은 전구세포인 근모세포의 발생 및 분화동안 합성되는 여러 근수축 단백질이며 특히 근원섬유의 형성은 횡문근 조직에서 관찰되는 중요한 분화현상이다. Wang 등(1988)은 배양심근세포에서 근원섬유가 어떻게 형성되는가를 규명하기 위하여 titin, tropomyosin, myosin 등에 대한 여러 근 특이항체를 사용하여 면역형광법적 연구를 행하였으며, 또한 근원섬유형성을 조절하는 기작을 이해하려는 기도에서 *in vitro*체계에서 많은 연구자들이 다양한 pH, 이온강도(Harrington and Rodgers, 1984), 온도, 칼슘농도(Higuchi and Ishiwata, 1985) 및 sodium pyrophosphate의 존재(Reister *et al.*, 1986) 등의 여러 인자에 관해 연구, 보고하였다. 최근에는 myosin과 actin 등의 근원섬유구성요소가 근원세포의 분화과정에서 여하히 생합성 되어 가는가를 추구하기 위해서 면역세포화학적인 방법을 다수 이용하고 있다(Pedrose *et al.*, 1989; Mercier *et al.*, 1989; Gregory *et al.*, 1990).

심근발생을 위한 배양모델의 개발은 심근모세포의 성장 및 세포의 분화를 유도하기 위한 배양조건의 선택이라는 두가지의 기술적 문제를 나타낸다. Spizz 등(1986)에 의하면 높은 농도의 fetal

bovine serum과 chick embryo extract가 통상적으로 골격근 근모세포의 성장을 촉진하며 Kohtz 등(1989)은 4%의 horse serum으로 심근세포를 배양하여 효과적으로 분화를 유도한 바 본 연구에서는 흔히 근세포배양에서 사용되는 배지조성을 적용하여 chick embryo extract와 낮은 농도의 horse serum으로 심근모세포의 증식과 분화를 유도하였다. 근세포의 근원섬유형성과정에는 다수의 근세포특이단백질이 관여한다. Schultheiss 등(1990)에 의하여 심근세포에는 nonstriated (NSMFs) 및 striated myofibrils(SMFs)가 불균등하게 분포한다고 한다. 초기의 세포면역형광 및 전자현미경 연구는 신생 SMFs가 MHC thick filaments와 더불어 α-actinin Z-bands, thin filament α-actin 및 sarcomeric tropomyosin으로 구성되어 있다고 보고하였으며(Legato, 1972; Wang *et al.*, 1988), 본 연구에서는 actin 특이항체와 FITC로 배양심근세포를 면역염색하고 심근모세포(cardiac myoblast) 및 분화되는 심근세포(cardiac myocyte)에 대한 actin의 분포양상을 조사하여 심근모세포가 분화되는 과정에서 actin의 세포내 이동적 양상을 관찰할 수 있었다. Sundell 및 Singer(1990)에 의하면 계배의 섬유모세포(chicken embryo fibroblasts)에 있어서 actin mRNA는 세포배양과정동안 세포외곽으로 이주하여 정착한다고 하며 이 과정에서의 nascent polypeptide 및 actin translation의 역할을 소개하고 actin mRNA는 세포질내에서 특정영역에 분포하는 관련된 정보를 가진다고 보고하였다. 이러한 보고들과 함께 본 연구에서의 면역형광적 분석결과로 보아 비록 배양조건이 다소 다르나 심근세포의 분화과정 중에 나타나는 actin의 세포내 이동이 근 세포특이적 현상임을 시사하고 있다. 한편, Shen과 Lemanski(1989)는 axolotl이 근원섬유형성과정의 기작을 연구하는데에 훌륭한 유전적 동물모델이라 하고 개재섬유단백질(intermediate filament protein)인 desmin의 존재와 분포를 근원섬유형성의 측면에서 연구하였다. 그는 desmin과 vimentin으로 구성된 개재섬유(intermediate filaments)의 근원섬유로의 정렬(myofibril alignment) 과정에 대한 관련성을 성체 심근세포의 Z대 영역에서 근원섬유주위를 감싸는 desmin의 존재와 이 단백질이 정렬과정에서 나타나는 이유로 설명하였으나 세포배양을 모델로 하지 않았다. 본 실험에서 전기영동에 의해 나타나는 심근세포의 배양과정 중의 주요한 근특이 단백질들의 발현양상이 다른 보고들과 다른 것은 배양체계의 차이에 의한 것으로 생각되며, 본 실험의 세포배양에서 분화하거나 분화하지않은 어떤 심근모세포도 수축현상을 보이지 않는 것으로 보아 이는 배양에서의 심근모세포가 자발적 수축현상이 일어나기 전에 생체(*in vivo*)에서 수행되는 분화계획(differentiation program)을 수행함을 가리킨다. 배양개시후 12시간의 전기영동상에서 관찰되는 세포질 및 막단백질의 전반으로 낮은 단백질발현양상은 배양의 진행에 따라 증가하여 배양개시후 3일과 4일에서 현저한 증가를 보여주며, 특히 이 시기에 뚜렷한 양적 우세를 나타내는 소수의 단백질들이 본 연구에서의 전자현미경에 의해 관찰된 근원섬유가 출현하는 시기와 밀접한 관련성이 있음을 시사한다고 할 수 있다. 그러나 배양 120시간에서의 전반적 단백질양상이 다소 약하게 나타나는 것으로 보아 이러한 문제가 Claycomb(1976)에 의한 보고 또는 배양체계에 의한 문제 때문이라 생각되나, 심근세포의 분화기작 및 이에 대한 보다 깊은 이해를 위하여 심근세포의 continuous lines을 사용하고 이들의 분화과정 중에 발현되는 actin은 다른 여러분자들과 더불어 근세포 분화와 관계된 주요한 단백질 중 하나이다. 본 연구에서의 형광 현미경적 결과로 보아 actin은 근원섬유형성 이전에 세포에 축적되기 시작하여 점차적으로 근원섬유형성과정과 함께 재분포되어가는 것으로 추정되나 이러한 결과는 심근세포의 배양에 적용된 배양체계에 크게 의존하는 것으로 생각되며, 앞으로 심근분화 및 특이단백질에 대한 연구는 다양하고 연속적인 배양체계(continuous culture system)의 개발 및 심근세포의 발생과 관련된 가능한 예외성과 이들 변화를 촉진하는 분자적 현상 및 세포골격(cytoskeleton)과 mRNA의 상호작용에 관계되는 단백질의 기작에 대한 규명에 역점을 두어야 할 것이다.

인용문헌

Bendayan, M., 1984. Protein A-gold electron microscope immunocytochemistry: Methods, application and limitations. *J. Elec. Microscope Tech.* **1:** 243-270.

Block, K., J. Seidman, J. Naflilan, J. Fallon, and C. Seidman, 1986. Neonatal atria and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific secreting pathways. *Cell* **47:** 695-702.

Choi, J., T. Schultheiss, M. Lu, W. Franke, D. Bader, D. Fischman, and H. Holtzer., 1988. Founder cells for the cardiac and skeletal myogenic lineage. *In* : Cellular and Molecular Biology of Muscle Development. Alan R. Liss, Inc., New York.

Clark, W., R. Chizzonite, A. Everett, M. Rabinowitz, and R. Zak, 1982. Species correlations between cardiac isomyosins. *J. Biol. Chem.* **257:** 5449-5454.

Claycomb, W. C., 1976. Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **251:** 6082-6089.

Claycomb, W. 1986. Biochemical aspects of cardic muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **251:** 6082--6089

Daubas, P., D. Caput, M. Buckingham, F. A. Gros, 1981. Comparision between the synthesis of contractile proteins and the accumulation of their translatable mRNA during calf myoblast differentiation. *Develop. Biol.* **84:** 133-143.

Fischman, D. 1986. Myofibrillogenesis and the morphogenesis of skeletal muscle. *In* : Myology. McGraw-Hill Inc., New York, pp. 1-32.

Fischman, D. A. 1972. Developments of striated muscle. *In* : The structure and function of muscle. Acad. Press, New York, pp. 75-149.

Gregory, P., J. Gagnon, D. A. Essig, S. K. Reid, G. Prior, and R. Zak, 1990. Differential regulation of actin and myosin isoenzyme synthesis in functionally overloaded skeletal muscle. *Biochem. J.* **265:** 525-532.

Ha, D. B., Lee, C. C., Park, Y. C., Lim, W. K., and B. G. Yoo, 1985. The effects of fractions chick embryo extract on the fusion of cultured chick embryonic myoblast. *Korean J. Zool.* **28:** 179-193.

Harrington, W. F. and M. E. Rodgers, 1984. Myosin, *Annu. Rev. Biochem.* **53:** 35-73.

Higuchi, H. and S. Ishiwata, 1985. Disassembly kinetics of thick filaments in rabit skeletal muscle fibers: effects of ionic strength, Ca^{2+} concentration, pH, temperature, and cross-bridges on the stability of thick filament structure. *Biophys. J.* **47:** 267-275.

Izumo, S., B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi, 1985. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific member. *Science* (Wash. DC) **231:** 597-600.

Konigsberg, I. R., 1982. Progression through G1 and differentiation of muscle differentiation *in vitro*. Cambridge Univ. Press, ISBM, pp. 141-142.

Laemmli, U. K., 1970. Clevage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature* **227:** 680-685.

Legato, J., 1972. Ultrastructural characteristics of the rat ventricular cell grown in tissue-culture with special reference to sarcomerogenesis. *J. Mol. Cell Cardiol.* **4:** 209-317.

Lemanski, L. F., 1973. Heart developments in the Mexican salamander *Ambystoma mexicanum*. II Ultrastructure. *Am. J. Anat.* **136:** 487-526.

Lowry, D. H., N. J. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265-275.

Manasek, F., 1970. Histogenesis of embryonic myocardium. *Am. J. Cardiol.* **25:** 149-168.

Mercier, F., H. Reggio, G. Devilliers, D. Bataille, and P. Mangeat, 1988. Membrane cytoskeleton dynamics in rat parietal cells: Mobilization of actin and spetrin upon stimulation of gastric acid secretion. *J. Cell Biol.* **108:** 441-453.

Milloning, G., 1961. A modified precedure for lead staining of the thin sections. *J. Biophy. Biochem.* **11:** 936-939.

Nguyen, H. T., R. M. Medford, B. Nadal-Ginard, 1983. Reversibility of muscle differentiation in the absence of commitment: analysis of a myogenic cell line temperature-sensitive for commitment. *Cell* **34:** 281-293.

O'Farrel, P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250:** 4007-4021.

Patersan, B. M. and R. C. Strohmm, 1972. Myosin synthesis in cultures of differentiation chicken embryo skeletal muscle. *Develop. Biol.* **29:** 113-138.

Pedrosa, F., G. S. Butter-Brown, G. K. Phoot, D. A. Fischman, and L. E. Thornell, 1989. Diversity in experssion of myosin heavy chain isoforms and M-band proteins in rat muscle spindles. *Histochemistry* **92:** 185-194.

Reisler, E., P. Cheung, N. Borochov, and J. A. Lake, 1986. Monomeric dimers, and minifilaments of vertebrate skeletal myosin in the presence of sodium pyrophosphate. *Biochemistry* **25:** 326-332.

Schultheiss, T., Z. Lim, M. H. Lu, J. Murray, D. A. Fischman, K. Weber, T. Masaki, M. Imamura, and H. Holtzer, 1990. Differential Distribution of Subsets of Myofibrillar Proteins In Cardiac Nonstriated and Striated Myofibrils. *J. Cell Biol.* **110:** 1158-1172.

Shainberg, A., G. Yagil, and D. Yaffe, 1971. Alterations

of enzymatic activities during muscle differentiation *in vitro*. *Develop. Biol.* **25:** 1-29.

Shen, P. S. and L. F. Lemanski, 1989. Immunofluorescent, Immunogold, and Electrophoretic studies for desmin in embryonic hearts of normal and caradiac mutants Mexican Axolotls, *Ambystoma mexicanum*. *J. Morph.* **201:** 243-252.

Spizz, G., D. Roman, A. Atrauss, and E. Olson, 1986. Serum and fibroblast growth factor inhibit myogenic differentiation through a mechanism dependent on protein synthesis and independent of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **261:** 9483-9488.

Sreter, F., H. Balint, and J. Gergely, 1975. Structure and Functional changes of myosim during development. *Dev. Biol.* **46:** 317-325.

Sundell, C. L. and R. H. Singer, 1990. Actin mRNA localizes in the absence of protein synthesis. *J. Cell Biol.* **111:** 2397-2403.

Syrovy, I., 1982. Rat and Pig ventricular myosin during developments. *Mol. Physiol.* **2:** 329-333.

Wang, S. M., M. L. Greaser, E. Schultz, J. C. Bulinski, J. J. C. Lin, and J. L. Lessard, 1988. Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin, and myosin. *J. Cell Biol.* **107:** 1075-1083.

Yaffe, D. and H. Dym, 1973. Gene experssion during differentiation of contractile muscle fibers. *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37:** 543-548.

(Accepted May 30, 1992)

Immunofluorescent, Immunogold, and Electrophoretic Studies on Cardiac Myofibrillogenesis of Chick Embryos

Jae Chung Hah and Dong Soo Kim (Department of Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Skeletal and cardiac myoblasts are good models to understand the mechanism of cell differentiation. In the present study, we analyzed the cardiac myofibrillogenesis by measn of SDS- and two-dimensional electrophoresis, immunofluorescent and immunoelectron microscopy. The predominant proteins in differentiating cardiac myoblasts were 46 kDa in cytosolic fraction and 209 kDa and 53 kDa in membrane fraction. The OD values of 209 kDa and 53 kDa proteins were the highest in 96 hr culture as 0.38 and 0.52, respectively. Cytosolic protein of 46 kDa was most prominent in 72 hr culture with 0.34 OD. By the two-dimensional electrophoresis, the most prominent spot pattern was observed in 96 hr of culture. Therefore, it seems that differentiating cardiac myoblasts undergo distingushable protein systhesis between 72 hr and 96 hr culture. Immunofluorescent study showed the local distribution of actin. The most strong staining was observed in cell periphery in 96 hr culture which primitive myofibrils began to form. The appearance of myofibrils were recognized in 4 day culture by the immunoelectron microscopy. At the time, the myofibrils showed incomplete structures (poorly defined A, H and M bands) but I band was relatively well difined. According to these results, we know that there are an important relationship between protein synthesis and organization of myofibril during cardiac myofibrillogenesis *in vitro*, and during this process, actin is gradually translocated in its cytoplasm with the laps of culture.