

## 근육모세포 배양에서 Proline Analogue와 Cytosine Arabinoside의 섬유모세포 제거 효과

연세대학교 의과대학 재활의학교실 및 근육병재활연구소

박윤길 · 김 진 · 신정식 · 문재호

= Abstract =

### Selective Removal of Fibroblast with Using Proline Analogue and Cytosine Arabinoside in Myoblast Culture

Yoon Ghil Park, M.D., Jin Kim, Ph.D., Jeong Sik Shin, M.S.  
and Jae Ho Moon, M.D.

*Department of Rehabilitation Medicine and Rehabilitation Institute of Muscular Disease,  
Yonsei University College of Medicine*

**Objective:** The phenomenon of fibroblast overgrowth is one of the major problems encountered during long-term culture such as myoblast culture. The first goal of the study is to determine the effects of proline analogue and cytosine arabinoside to reduce fibroblasts in myoblast culture. The second goal is to investigate whether the chemicals influence the growth and differentiation of myoblast.

**Method:** Muscle tissues were obtained from legs of healthy men, and then fibroblasts and myoblasts were isolated and cultured. Those mixed cells were divided into three groups; control group, proline analogue (cis-hydroxyproline) treated group and cytosine arabinoside (araC) treated group. We evaluated the effectiveness of cis-hydroxyproline and araC on selective removal of fibroblasts in culture. We have also determined if cis-hydroxyproline and araC could alter differentiation of myoblast in each group.

**Results:** The treatment with araC was effective to eliminate fibroblasts comparing to the control group ( $p < 0.05$ ) while there was no statistically significant difference between proline analogue and control group ( $p > 0.05$ ). Myoblasts of all three groups were differentiated into myotube.

**Conclusion:** Using araC, we could reduce a number of fibroblasts in myoblast culture where contamination and subsequent overgrowth with fibroblasts remained a problem.

---

**Key Words:** Myoblast, Fibroblast, Proline analogue, Cytosine arabinoside

---

접수일: 2001년 2월 5일, 게재승인일: 2001년 5월 16일

교신저자: 박윤길

본 연구는 1999년도 사회복지법인 한국근육병재단 연구비 및 2000년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

## 서 론

근육질환 중 뒤시엔느(Duchenne)형 근디스트로피는 점차적인 근력약화를 일으키며 성염색체에 의해 열성 유전되는 질환으로 X 염색체의 단완(Xp21)에 위치한 디스트로핀(dystrophin) 유전자의 변이에 의해 발생하며,<sup>3,10,27,32)</sup> 현재까지는 병의 진행과 합병증을 최소화하는 물리치료, 운동치료 및 호흡재활치료 등 재활의학적 치료가 주된 방법이고 근본 원인을 치료할 수 있는 치료법이 없는 실정이다.<sup>28)</sup>

그러나 최근에 병의 원인을 치료할 수 있을 것으로 여겨지는 근육모세포(myoblast) 이식법이 개발되어 동물실험을 통하여 어느 정도 효과를 확인하였는데 이 방법의 개요는 정상적인 근육모세포를 환자의 근육에 주입하면 이 정상 세포가 환자의 근육과 융합되어 디스트로핀 단백질을 생성하도록 유도하는 것이다.<sup>13,21,23)</sup> 그러나 배양과정 중 다른 세포, 특히 섬유모세포(fibroblast)의 과도한 성장이 큰 장애로 나타나며 더구나 정상 성인의 근육조직에서 얻어진 근육모세포의 배양은 태아 조직에서 유래된 세포와 비교하여 성장률이 현저히 떨어지는 상태여서 섬유세포의 증식이 상대적으로 더욱 빨라져 이를 분리하고 배양하는 것이 쉽지 않은 실정이다.

그동안 혼합 세포조직에서 섬유모세포를 제거하는 방법은 주로 섬유모세포가 다른 세포들에 비해 빨리 배양 접시에 부착되는 성질을 이용하거나 섬유세포의 성장을 제한하는 물질을 첨가하는 방법을 시도하였다.<sup>5,15)</sup> 또한 항원-항체 면역반응을 이용하여 선택적으로 섬유모세포를 제거할 수도 있으나 배양하려는 세포에 섬유모세포 수용체와 비슷한 구조의 항체 수용체가 공동으로 세포 표면에 존재할 경우 순수 분리에 제한점이 된다.<sup>1,18,25)</sup> 또한 최근에 개발된 fluorescence-activated cell sorter (FACS)를 이용한 방법은 정확도는 높으나 고가의 장비와 숙련된 기술이 필요하여 일반 실험실에서는 시행하기 어려운 점이 많다.<sup>24,31)</sup>

Kao와 Prockop<sup>15)</sup>은 chick embryo에서 분리된 섬유모세포에 proline analogue인 cis-hydroxyproline을 투여하여 섬유모세포의 procollagen 합성을 방해하여 증식을 억제하였다고 하였으며 Chaudhari와 Beam<sup>5)</sup>은 mouse의 세포를 대상으로 cytosine arabinoside를 이용

하여 섬유모세포를 제거하였는데 이들은 동물 세포를 대상으로 실험한 것이며 인체 조직에서 유래된 섬유모세포에 대한 연구는 드문 편이다. 또한 섬유세포의 제거를 위해 투여된 물질이 근육모세포의 증식과 분화에는 어떤 영향을 미치는 지는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 근육모세포의 순수 분리와 배양을 위해 섬유모세포 제거 방법으로 비교적 간단히 시행할 수 있는 proline analogue와 cytosine arabinoside를 이용하였을 때 섬유세포의 감소와 근육모세포의 증식에 대한 영향 및 이후 배양된 근육모세포가 정상적인 분화 과정을 거치는지 알아보려고 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1) 연구대상

건강한 성인 남자의 대퇴사두근에서 국소마취하에 약 1 g의 근육조직을 채취하였다. 공여자는 사전에 신체 검진과 혈액 검사를 통해 신경근육계 질환과 다른 감염성 질환이 없음을 확인한 후 기증 동의서에 서명을 한 후 참여하였다.

### 2) 연구방법

(1) 세포 분리 및 일차배양(primary culture): 채취된 근육 조직을 phosphate buffered saline (PBS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)에 넣어 세척한 다음 칼로 잘게 다져 20% dissociation solution (0.05% trypsin-0.53 mM EDTA, collagenase (IV), 1×PBS)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 동안 배양하여 세포를 분리하였다. 이후 trypsin 활동을 중지시키기 위해 15% fetal bovin serum (FBS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)를 포함한 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; GIBCO BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)에 넣은 후, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다.

(2) 이차배양(subculture)-근육모세포 및 섬유모세포의 배양: 침전된 세포에 10% FBS-DMEM 세포배양액과 gentamycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)을 첨가하여 부유시킨 후 T-25 culture flask (Falcon, Lincoln Park, NJ, U.S.A.)에 1×10<sup>6</sup>/ml의 세포수로 접종하였다. 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에

서 유지하였으며, 배양액은 일주일이 경과한 후 교환하였다.

단층배양 상태가 50% 이상이 되면 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)로 세포를 플라스크에서 분리시키고 10% FBS로 trypsin을 중화한 후 원심 분리하여 계대배양을 시행하였다. 일부 배양된 세포는 실험에 사용할 때까지 액체 질소에서 냉동보관 하였고, 다시 실험 할 때에는 세포를 녹여서 이차 계대배양한 세포를 사용하였다. 배양액은 이틀마다 교체하였다.

(3) 섬유모세포 제거: 섬유모세포를 제거를 위해 cytosine arabinoside (araC, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)와 proline analogue인 cis-hydroxyproline (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)을 투여하였다.

단층세포배양법으로 배양한 세포가 7~10일 경과하면서 T-25 culture flask에 약 80% 정도 증식되었을 때 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. 실험군에는 이차배양액 1 ml와 araC, cis-hydroxyprolin를 각각 10µl/ml, 150µg/ml의 농도로 첨가하였고 대조군은 이차배양액 1 ml에 gentamycin (50µg/ml)을 넣고 각각 배양액을 추가하여 전체 부피가 5 ml가 되게 하였다. 이 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 3일 동안 반응시킨 후, 1x PBS로 세척하였다. 이후, 섬유모세포의 증식억제정도를 살펴보기 위해 세포를 10% DMEM

을 첨가하여 다시 3일 동안 배양하였으며 섬유모세포와 근육모세포의 비율을 위상차 현미경을 이용하여 형태학적으로 분류하였다. 본 연구는 오차를 줄이기 위해 같은 실험을 3회 반복하였다.

(4) 근육모세포의 분화 관찰: 세포수 측정 후 각각의 대조군과 실험군을 다시 7일간 배양하였고 이 후 10% FBS과 human insulin (1 IU/ml), 그리고 gentamycin이 포함된 DMEM을 넣고 7일 동안 다시 배양한 후 현미경으로 myotube로 변환되는 근육모세포의 분화를 비교 관찰하였다.

(5) 통계처리: 수집된 자료는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 비모수검정법인 Mann-Whitney test로 대조군과 두 실험군을 각각 비교하였다.

## 결 과

### 1) 세포 분리 및 배양

분리된 세포들은 접종한지 수십분 후부터 세포들이 배양접시바닥에 부착한 것을 관찰할 수 있었다. 근육모세포는 성장함에 따라 원형에서 방추형으로 변하면서 서로 연결되는 구조를 이루고, 반면에 섬유모세포는 원형에서 다각형 구조로 변하였다(Fig. 1). 이차배양 후 배양접시에 부착된 세포를 형태학적으로 분류하였을 때 근육모세포와 섬유모세포 두



Fig. 1. Phase contrast micrographs of a fibroblast (white arrow) and a myoblast (long black arrow). Two myoblasts are contiguous with each other (short black arrows)(×100).

**Table 1.** Effects of Cis-hydroxyproline and Cytosine Arabinoside on Proliferation of Fibroblasts and Myoblasts

Group	No. of cells ( $\times 10^4$ )
Control	11.20 $\pm$ 5.24
Proline <sup>1)</sup>	10.86 $\pm$ 4.20
araC <sup>2)</sup>	1.33 $\pm$ 0.75

Values are mean $\pm$ S.D.

1. Proline: cis-hydroxyproline, 2. araC: cytosine arabinoside

종류의 세포였으며 그 외의 세포는 거의 관찰할 수 없었다.

**2) Proline analogue와 araC가 섬유모세포 증식 억제에 미치는 영향**

이차배양에서 같은 양의 배양액을 각 flask로 분주하여 동일한 수의 세포로 대조군과 실험군으로 나누어 실시하였는데 3회 실험값을 비교한 결과 배양액 1 ml 당 세포 숫자의 평균은 대조군에서  $11.2 \times 10^4$ /ml, proline analogue로 처리한 군은  $10.2 \times 10^4$ /ml, araC로 처리한 군은  $1.3 \times 10^4$ /ml이었다(Table 1). 또한 섬유모세포와 근육모세포와의 비는 각각 대조군 79 : 21, proline analogue로 처리한 군 77 : 23, araC로 처리한 군 49 : 51로 나타났다(Fig. 2).

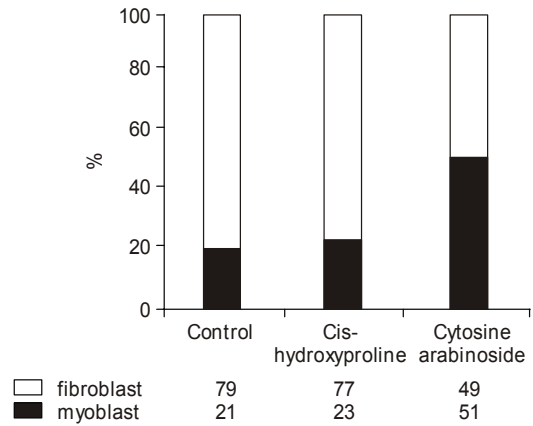
대조군과 두 실험군을 각각 통계적으로 비교하면 대조군과 proline analogue로 처리한 군간에는 차이가 없지만( $p > 0.05$ ), 대조군과 araC로 처리한 군간에는 의미 있는 차이가 있었다( $p < 0.05$ ). 따라서 araC가 전체 세포 숫자도 감소시키지만 섬유모세포를 근육모세포보다 더 선택적으로 억제하는 것으로 나타났다.

**3) Proline analogue와 araC가 근육모세포 분화에 미치는 영향**

두 시약 모두 처리 후에 insulin을 투여하여 myotube를 형성하는지 관찰한 결과 두 군 모두에서 분화가 일어났다(Fig. 3).

**고 찰**

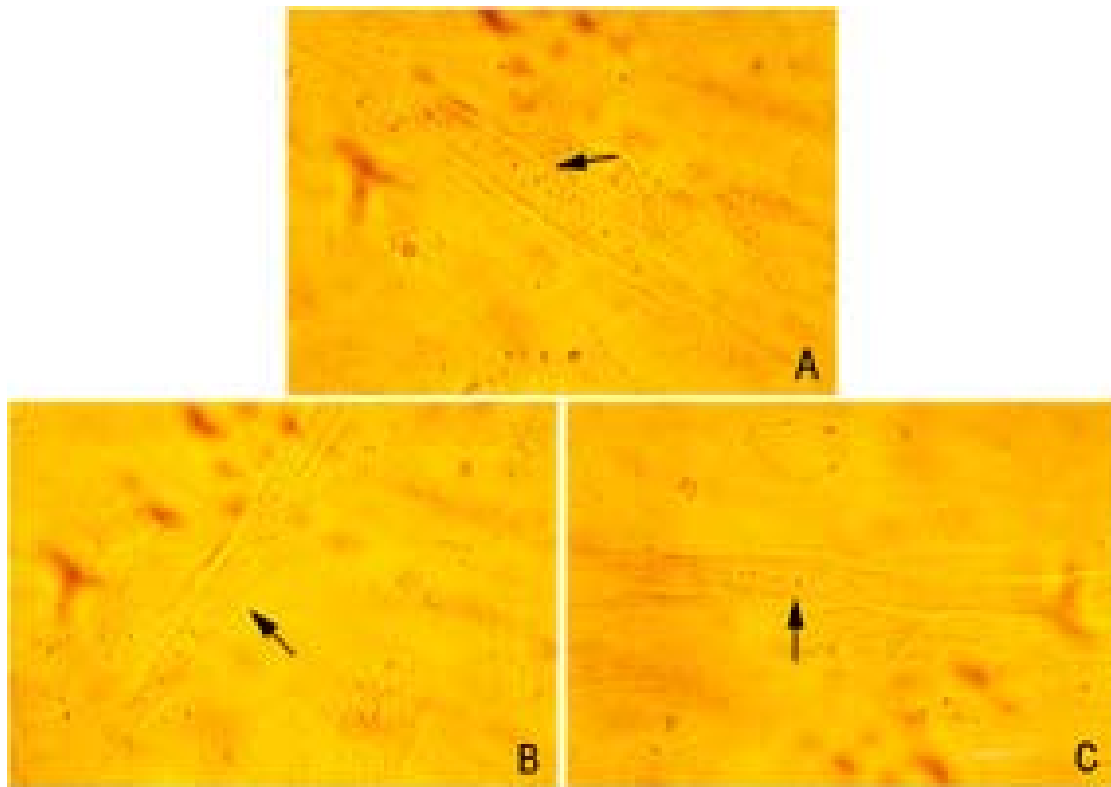
최근에 뒤시엔느(Duchenne)형 근디스트로피를 포함한 근이영양증 환자의 치료를 위해 유전자 치료와



**Fig. 2.** Ratio of fibroblast and myoblast on cell growth.

간세포(stem cell) 이식 및 조직 배양을 이용한 치료 등이 활발히 연구되고 있으며 이와 더불어 근육모세포(myoblast) 이식법이 향후 실현 가능한 치료법으로 여겨지고 있는데 동물 및 임상실험에서도 주입된 근육모세포가 디스트로핀을 생성하고 근력을 증진시키는 것으로 보고된 바 있다.<sup>8,9,12,14,16,17,19,30</sup> 그러나 이 방법은 아직까지는 이식 후 세포 확산도의 저하와 면역거부 반응 등 여러 가지 제한점이 있으며,<sup>4,6,7,11,20,26,29</sup> 이를 극복하기 위한 방법 중의 하나가 실험실에서 순수한 다량의 근육모세포 배양과 면역거부 반응의 억제이다. 따라서 근육모세포의 순수배양은 근육세포이식의 기초이며 실험실 연구의 중요한 단계이다. 그러나 생체 조직에서 채취된 근육조직에는 여러 가지 다른 세포들이 존재하며 특히 섬유모세포는 다른 세포들보다 빠르게 증식하여 근육모세포의 성장을 방해한다. 이는 다른 조직의 세포를 배양하는데도 마찬가지로 여서 그 동안 여러 가지 방법으로 섬유모세포의 성장을 억제하는 방법을 연구하였으나 간편하면서도 경제적인 방법을 찾는 것이 쉽지 않은 상황이었다.

선택적으로 섬유모세포의 증식을 억제하는 한 가지 방법으로 proline analogue인 cis-hydroxyproline을 투여하게 되면 섬유모세포가 procollagen 합성시 세포 내에 혼합되어 procollagen이 triple helical을 형성하는 것을 방해하게 되고, 이로 인해 섬유모세포가 배양접시 바닥에 붙지 못하게 되어 성장할 수 없게 된다. 이 방법을 세포배양에 이용한 보고가 있었으



**Fig. 3.** Differentiation of myoblast into myotube (arrow) in control group (A), cis-hydroxyproline treated group (B) and cytosine arabinoside treated group (C)(×400).

며 섬유모세포의 억제 효과는 cis-hydroxyproline의 용량에 비례한다고 하였다.<sup>15)</sup> 그러나 본 연구에서는 이와 비슷한 용량에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 없었는데 이는 섬유모세포가 유리된 chick embryo와 인체 조직간의 차이에 의한 것으로 생각된다.

Cytosine arabinoside (araC)은 DNA polymerase inhibitor로 작용하며 백혈병 치료제로도 임상에 응용되는데 일반적으로 섬유모세포는 다른 세포에 비해 성장 속도가 빠르기 때문에 배양 초기에 이 물질을 첨가하여 비교적 섬유모세포를 더 많이 제거할 수 있다는 보고가 있다.<sup>22)</sup> 그러나 이 물질은 섬유모세포 뿐만 아니라 근육모세포를 포함한 다른 세포의 증식도 억제시키게 되는데, 본 실험 결과도 전체 세포수가 대조군에 비하여 88.4% 감소하였다. 그러나 근육모세포의 비율은 대조군 21%에 비해 51%로 상승하여 섬유모세포가 더 선택적으로 제거되었음을

알 수 있다.

섬유모세포의 선택적 제거 외에도 본 실험에서는 섬유모세포를 제거하기 위해 처리한 시약이 근육모세포의 성장과 분화에 영향을 주는지 확인하기 위해, 섬유모세포 제거 후 insulin을 첨가하고 FBS를 배양액에서 제거한 후, myotube로 분화하는지를 위상차 현미경을 통해 관찰한 결과 모든 군에서 분화가 이루어져 근육모세포 자체에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 좀더 정확한 판정을 위해 myotube 단백질의 정성적인 분석과 수축 상태 등 기능적 평가가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구에서는 cytosine arabinoside (araC)를 이용하여 섬유모세포를 제거할 수 있었으나 근육모세포의 순수 배양을 위해서는 향후 좀더 효과적인 방법이

필요할 것으로 생각되며 이 물질이 근육세포로 분화 과정에 영향을 미치는지는 형태학적인 관찰 외에 다각적인 평가가 필요할 것으로 여겨진다.

### 참 고 문 헌

- 1) Abboud CN, Duerst RE, Farntz CN, Ryan DH, Liesveld JL, Brennan JK: Lysis of human fibroblast colony-forming cells and endothelial cell by monoclonal antibody(6-9) and complement. *Blood* 1986; 68(6): 1196-1200
- 2) Alamedine HS, Dehaupas M, Fardeau M: Regeneration of skeletal muscle fibers from autologous satellite cells multiplied in-vitro. *Muscle Nerve* 1989; 12: 544-555
- 3) Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonak I, Ozawa E, Sugita H: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 1989; 333: 861-863
- 4) Beauchamps JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA: Quantitative studies of efficacy of myoblast transplantation. *Muscle Nerve* 1994; 18(Suppl.): 261
- 5) Chaudhari N, Beam KG: Fibroblasts fuse with myotubes developing in culture. In: Griggs R, Karpati G, editors. *Myoblast transfer therapy*, 1st ed, New York: Plenum Press, 1990, pp131-137
- 6) Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M: Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* 1996; 19: 853-860
- 7) Guerette B, Asselin I, Skuk D, Entman M, Tremblay JP: Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: Increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant* 1997; 6: 101-107
- 8) Gussoni E, Pavlath PK, Lancot AM, Sharma K, Miller RG, Steinman L, Blau RM: Normal dystrophin transcripts detected in DMD patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992; 356: 435-438
- 9) Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM: The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* 1997; 3: 970-977
- 10) Hoffman EP, Brown J, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928
- 11) Huard J, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpati G: Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 949-958
- 12) Huard J, Bouchard JP, Roy R, Malouin F, Dansereau G, Labrecque C, Albert N, Richards CL, Lemieux B, Tremblay JP: Human myoblast transplantation: preliminary results of four cases. *Muscle Nerve* 1992; 15: 550-560
- 13) Huard J, Labrecque C, Dansereau G, Robitaille L, Tremblay JP: Dystrophin expression in myotubes formed by the fusion of normal and dystrophic myoblasts. *Muscle Nerve* 1991; 14: 178-182
- 14) Huard J, Roy R, Bouchard JP, Malouin F, Richards CL, Tremblay JP: Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplant Proc* 1992; 24: 3049-3051
- 15) Kao WW, Prockop DJ: Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell population. *Nature* 1977; 266(3): 63-64
- 16) Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D, Gledhill RB, Guttmann R, Holland P, Koch PA, Shoubridge E, Spence D, Vanasse M: Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1993; 34: 8-17
- 17) Law PK, Goodwin TG, Fang Q, Chen M, Li HJ, Florendo A, Kirby D, Bertorini T, Herred H, Golden G: Pioneering development of myoblast transfer therapy. In: Angelini C, Darrieli GA, Fontanan D, editors. *Muscular dystrophy research*, New York. Elsevier Science Inc., 1991, pp109-116
- 18) Linge C, Green MR, Brooks RF: A method for removal of fibroblast from human tissue culture systems. *Exp Cell Res* 1989; 185: 519-528
- 19) Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, Sahenk Z, Benson S, McAndrew PE, Rice R: Myoblast transfer in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *N Eng J Med* 1995; 333: 832-838
- 20) Merly F, Huard C, Asselin I, Robbins PD, Tremblay J: Anti-inflammatory effect of transforming growth factor-[beta]1 in myoblast transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 793-799
- 21) Morgan JE, Hoffman EP, Partridge TA: Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscle of the mdx mouse. *J Cell Biol* 1990; 111: 2437-2449
- 22) Park JK, Lee JS, Lee HH, Choi IS, Park SD: Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced single strand breaks is attributed to slower rejoining processes by DNA polymerase inhibitor, cytosine arabinoside in CHO-K1 cells. *Life Sci* 1991; 48(13): 1255-1261
- 23) Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP,

- Kunkel LM: Conversion of mdx myofibers from dystrophin negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; 337: 176-179
- 24) Partridge TA: Invited review: Myoblast transfer: A possible therapy for inherited myopathies? *Muscle Nerve* 1991; 14: 197-212
- 25) Singer KH, Scarce RM, Tuck DT, Whichard LP, Denning SM, Haynes BF: Removal of fibroblasts from human epithelial cell cultures with use of a complement fixing monoclonal antibody reactive with human fibroblasts and monocytes/macrophages. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 166-170
- 26) Smythe GM, Hodgetts SI, Grounds MD: Immunology and the future of myoblast transfer therapy. *Molecular Therapy* 2000; 1(4): 304-313
- 27) Sugita H, Arahata K, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, Ishihara T, Nonaka I, Ozawa E: Negative immunostaining of Muscular Dystrophy (DMD) and mdx muscle surface membrane with antibody against synthetic peptide fragment predicted from DMD cDNA. *Proc Jpn Acad* 1988; 64: 37-39
- 28) Thomas MA, Fast A, Bach JR: Rehabilitation of the patients with diseases of the motor unit. In: Delisa JA, Gans BM, editors. *Rehabilitation medicine: Principles and practice*, 3rd ed, Philadelphia: Lippincott Company, 1998, pp1564-1568
- 29) Tremblay JP, Guerette B: Myoblast transplantation: a brief review of the problems and of some solutions. *Basic Appl Myol* 1997; 7: 221-230
- 30) Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A, Richards CL: Results of a blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant* 1993; 2: 99-112
- 31) Webster C: Isolation of human myoblasts with the fluorescent-activated cell sorter. *Exp Cell Res* 1988; 174: 252-265
- 32) Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AH, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG: The Duchenne muscular dystrophy gene is localized in the sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988; 333: 466-469
-