

전기자극 조건에 따른 근육 세포에 미치는 영향과 반응

서형우¹ · 신현영^{2,4} · 이현주³ · 태기식¹ · 김민석^{2,4,5}

¹건양대학교 의공학부, ²대구경북과학기술원 뉴바이올로지학과, ³건양대학교 물리치료학과,
⁴대구경북과학기술원 웰에이징연구소, ⁵대구경북과학기술원 로봇공학과⁵

Effect and Response of Skeletal Muscle Cells on Electrical Stimulation Condition

Hyung Woo Seo¹, Hyun Young Shin^{2,4}, Hyun-Ju Lee³, Ki-Sik Tae¹ and Minseok S. Kim^{2,4,5}

¹Dept. of Biomedical Engineering, Konyang University, Daejeon, Korea

²Department of New Biology, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology (DGIST), Daegu, Korea

³Dept. of Physical Therapy, Konyang University, Daejeon, Korea

⁴Well Aging Research Center, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology (DGIST), Daegu, Korea

⁵Department of Robotics Engineering, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology (DGIST), Daegu, Korea

(Manuscript received 16 November 2017 ; revised 16 November 2017 ; accepted 25 November 2017)

308

Abstract: Skeletal muscle function plays a very important role in quality of life. However, skeletal muscle causes functional decline under aging or some diseases. Exercise and muscle training are good solutions to delay sarcopenia, but there are limitations to those who are uncomfortable in exercise. For this reason, alternative interventions for muscle sarcopenia are required, and many studies proved the increase of skeletal muscle mass by electrical stimulation. In conventional studies, however, mouse skeletal muscle cells have been mostly used in experiments to identify electrical stimulation conditions while human derived cells have not been frequently utilized in these studies. Stimulation used for rehabilitation has been uniformly treated without the consideration of aging. In addition, many studies have been used with conventional petri dish usually requiring many numbers of cells, which is not appropriate for rare. Moreover, they are not usually condition uniformity of electrical field. In this study, we have developed an electrical stimulation device which consumes a small amount of cells and can form a uniform electrical field. With the system, we analyzed the skeletal muscle differentiation and Myotube thickness depending on the electrical stimulation condition.

Key words: Skeletal muscle cell, Electrical stimulation, Cell viability

1. 서 론

전체 체중의 40% 정도를 차지하고 있는 골격근은 수 천

개의 근 필라멘트로 구성 되어 있으며, 운동신경의 전기적 신호에 의해 근 필라멘트의 구성원인 마이오신과 액틴을 움직이는 힘과 수축이 유발된다. 골격근은 빠르게 수축하면서 큰 힘을 생성하는 속근과 작은 힘으로 오랫동안 수축을 유지하는 지근으로 나눌 수 있으며, 상황에 따라 필요한 힘을 근육 수축 과정을 통해서 몸을 지탱할 수 있게 된다. 골격근은 일상 생활에 필요한 활동 및 몸의 형태를 유지하기 위한 필수 요소이다[1,2]. 이에 따라 건강과 높은 삶의 질을 유지하기 위해 노화 및 질병에 따른 근육 쇠퇴를 예방하고 유지시키는 것은 매우 중요하며, 운동을 통해서 골격근의 자극 및 수축을 발생시켜 근 감소를 줄이고 근 기능을 향상

Corresponding Author : Ki-Sik Tae
Dept. of Biomedical Engineering, Konyang University, 158
Gwanjeodong-ro, Seogu, Daejeon 35365, Republic of Korea
TEL: +82-42-600-8518 / E-mail: tae@konyang.ac.kr
Corresponding Author : Minseok S. Kim
Department of New Biology, Daegu Gyeongbuk Institute of
Science and Technology (DGIST), Daegu, Korea
TEL: +82-53-785-1740 / E-mail: kms@dgist.ac.kr
이 연구는 한국연구재단의 지원(NRF-2015R1C1A1A01054292)
을 받아 수행하였음.

시킬 수 있다[3]. 그러나 선, 후천적으로 거동이 불편한 사람들은 운동을 통해 몸에 기본적으로 필요한 근육량을 유지하는 것은 한계가 있으며 이를 대체하여 골격근을 수축할 수 있도록 도와주는 자극이 필요하다[4].

전기자극은 근 감소의 대표적인 자극 치료법으로 많은 연구가 이루어졌다[5-8]. 다수의 연구에서는 골격근육의 마이오튜브의 두께와 근육 수축과 성숙에 관련된 단백질 인자들이 근 기능 향상에 도움이 되는 것을 확인 했으며 전기자극이 이러한 근 성숙 관련 인자들을 증가시켜 근 증가에 많은 도움을 준다는 것을 강조하고 있다[9-12]. 그러나 기존 선행연구에서는 정확한 전기장을 형성할 수 있는 전기자극 기기를 이용하지 않고 있는 경우가 많으며 실험 한 번에 상당한 세포의 양이 필요한 과정을 거치고 있다[13,14]. 그리고 대부분 쥐 같은 동물 근육 세포를 통한 실험 결과가 대부분이며 현재까지 사람에서 추출된 골격근세포를 이용한 연구는 매우 부족한 상태이다. 이처럼 전기자극을 통한 연구는 매우 많이 진행되었으며 이에 대한 효과도 많이 증명되어 있는 상태이지만 정확한 실험 조건이 미 형성된 경우가 많고 인체의 부위에 따라서 골격근에 맞는 최적의 전기자극 조건은 확립이 되어 있지 않다. 또한 재활치료에서도 일률적인 전기자극 조건으로 치료되고 있고, 질병이나 노화에 따른 근육 상태를 고려하지 않는 실정이다. 이는 골격근의 전기자극에 따른 효과에 대한 더 많은 연구가 필요하다는 것을 말해주고 있다. 본 연구에서는 적은 세포의 양을 요구하며 균일한 전기장을 형성하는 전기자극 기기를 개발하였다. 그리고 사람에서 추출한 골격근세포를 이용하여 각각의 파라미터에 따른 세포의 생존도를 측정하고 이의 결과를 기반으로 골격근의 마이오튜브 두께를 측정하여 전기자극 효과를 관찰하였다.

II. 실험 방법

1. 세포배양

17세 여성 골격근세포를 13 mm 원형 플라스틱 커버 슬립에 10% Myotonic growth supplement (Cook myosite, MS-3333), 1% 항생제(Antibiotic-antimycotic, hyclone, SV30079.01)가 첨가된 기본배지(Myotonic basal medium, cook myosite, MB-2222)를 이용하여 이를 동안 배양 후, 1% 항생제만 첨가된 분화배지(Myotonic differentiation medium, Cook myosite, MD-5555)로 변경을 하여 3일간 분화를 실시 했다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 환경을 갖춘 인큐베이터에서 배양되었다.

2. 전기자극 디바이스 제작 및 자극조건설정

총 6개의 원형 플라스틱 커버 슬립을 올려놓고 세포에 전

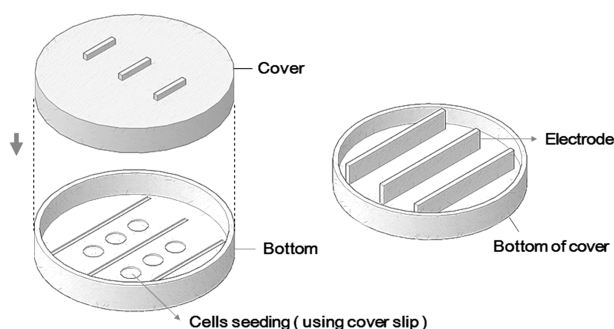


그림 1. 전기자극 디바이스 구성.

Fig. 1. Composition of the electrical stimulation device.

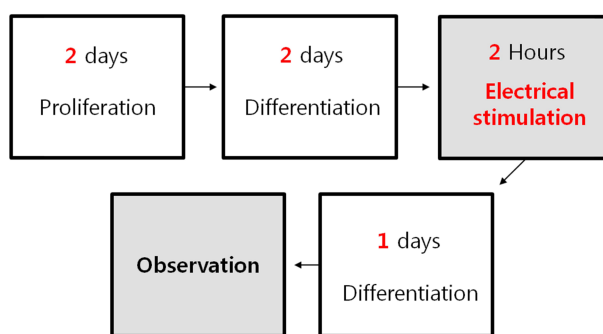


그림 2. 전기자극 효과를 분석하기 위한 실험 과정.

Fig. 2. An experimental procedure to analyze the effect of electrical stimulation.

309

기를 가할 수 있는 전기자극 디바이스를 제작했다. 3개의 전극을 결합 할 수 있으며 양 끝에는 -, 가운데는 +전극을 연결하여 전기자극을 가할 수 있는 형태이다. 크기는 기존 100 mm 배양접시와 동일하며 배지를 약 15 ml 첨가하여 세포 배양을 유지하며 전기자극을 가할 수 있다(그림 1).

이를 간 분화가 진행된 세포를 0.1 ms, 2시간 기준으로 0.1 V ~ 2 V, 10 Hz ~ 20 Hz 세기의 전기자극을 실시했으며 CO₂ 인큐베이터에 24시간 동안 분화 유지 후 관찰했다(그림 2).

3. 형광염색 및 이미지 분석

전기자극 후 24시간 동안 배양을 유지한 세포를 고정용액 4% 파라포름알데하이드 (Paraformaldehyde, Biosesang, HP2031)에 담귀 20분 동안 유지했다. 이 후 0.5% 트리톤 (Triton, biosesang, T1020) 15분, 2% 소 혈청 알부민에 (Bovine serum albumin, Sigma, A8531) 1시간 동안 담귀 후, Myosin heavy chain (MHC) 관찰을 위해 1차 항체 (MYH1E Antibody, DSHB, MF-20) 작업을 4°C에 14시간 이상 실시했다. 2차 항체 (Alexa fluor 488, Invitrogen, A-11034) 교체 후 약 1시간 동안 대기 했으며 DAPI (Anti-fade mounting medium with DAPI, vector, H-1200)

용액을 이용하여 핵 염색을 실시했다. 형광 현미경을 이용하여 MHC 및 DAPI 이미지를 얻었으며, ImageJ 프로그램을 통해 전기자극 조건에 따른 MHC의 두께를 측정했다.

III. 결 과

1. 전기자극 세기에 따른 세포 생존도 변화

전기자극 조건은 매우 다양하게 존재하기 때문에 세기에 따른 세포의 확실한 생존도 관찰이 필요하다. 따라서 전기자극의 효과를 분석하기 전 세기에 따른 세포 생존도를 분석을 실시했다. 0.1 ms, 2시간, 10 Hz 기준으로 0.1 V에서 2 V 까지의 볼트 변화에 따른 세포 상태를 확인한 결과, 0.5 V 기준으로 골격근세포의 마이오투브가 끊어지고 죽는 현상이 발생하고 2 V 이상에서는 10분 이내로 전기분해 현상이 발생했으며 더 이상 세포가 살 수 없는 환경으로 변했다(그림 3).

이를 통해 현재 다양한 연구에서 밝혀진 전기자극 조건에 비해 상당히 약한 조건에서 세포의 생존력이 감소하지 않고 유지되고 있음을 확인했으며, 이는 골격근세포의 종류 및 특성에 따라 전기자극에 효과적으로 반응하는 조건이 매우 다르고 정확한 세포 생존도를 근육의 부위별로 측정 할 필요성을 보여주고 있다. 그림 4는 0.1 ms, 10 Hz 기준으로 볼트와 시간 변화에 따라 실험에 이용한 골격근세포 생존도의 전체 결과를 그래프로 나타내고 있으며 0.3 V 이하 수준에서 전기자극 조건에 따른 효과를 볼 수 있음을 예측 할 수 있었다.

2. 전기자극을 통한 마이오 튜브의 두께 변화

세포 생존력 데이터를 기반으로 실제 전기자극 조건에 따른 골격근세포의 마이오투브 두께 변화를 측정했다. 0.01 V,

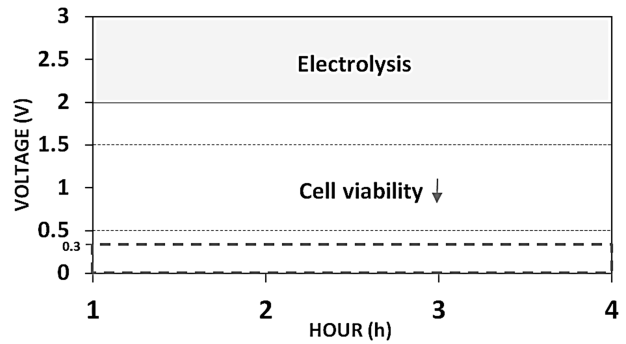


그림 4. 시간과 볼트 변화에 따른 근육 세포의 생존도 그래프(n = 3).
Fig. 4. The viability graph of the skeletal muscle cells as voltage and time.

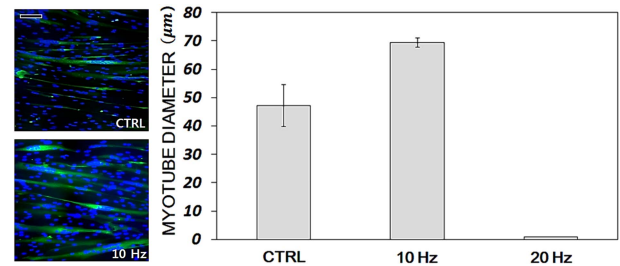


그림 5. 주파수 변화에 따른 전기자극 후 이미지 및 그래프(n = 3) (Scale bar = 0.3 mm).

Fig. 5. The cell images and graph after electrical stimulation at control, 10 and 20Hz.

2시간, 0.1 ms 기준 10 Hz 때, 전기자극을 주지 않는 경우보다 다수의 마이오투브가 발견됐으며 두께도 약 20 μm 이상 커진 것을 확인 할 수 있었다. 20 Hz 이상에서는 마이오투브가 끊어지고 세포가 죽는 현상이 발생했다. 이로 인해 전기자극이 근육의 수축을 유발하는 자극 플랫폼으로 이

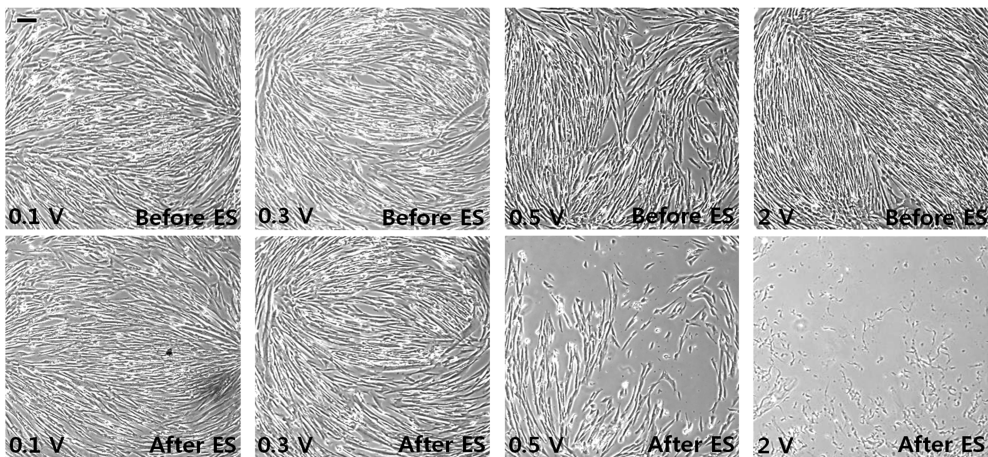


그림 3. 볼트 변화에 따른 전기자극 전 후의 세포 이미지(n = 3) (Scale bar = 0.3 mm).

Fig. 3. The cell image before and after electrical stimulation by variation of voltage.

용할 수 있다는 것을 확인했으며 볼트 및 시간 뿐만 아니라 주파수의 세기에 따른 세포 생존도 변화의 관찰을 통해서 전기의 세기를 결정하는 파라미터의 정확한 평가가 필수적으로 이루어져야 골격근 수축에 알맞고 정확한 전기자극 조건을 확립할 수 있다는 것을 알 수 있었다(그림 5).

IV. 고 찰

최근 고령화 사회와 삶의 질 향상의 필요성으로 인해 재활치료는 현대사회에 매우 중요하다. 특히 일상의 필요한 움직임과 외부적 활동에 큰 역할을 하고 있는 골격근을 건강하게 유지하는 것이 노화 및 질병을 일차적으로 예방할 수 있는 방법이며 운동 이외에 근 치료법에 대한 연구가 꾸준히 늘고 있는 추세이다. 전기자극이 골격근의 수축작용을 도와주고 근 향상에 큰 도움을 준다는 연구가 꾸준히 밝혀지면서 현재 재활치료에 다양하게 이용하고 있을 뿐만 아니라 지금까지도 근 증가를 위한 최적의 전기자극 조건을 밝히기 위해 연구가 계속 진행되고 있다. 그러나 정확한 전기장 형성하는 전기자극 기기를 이용하지 않은 경우가 많으며, 확실한 전기의 파라미터의 값에 따른 골격근세포의 반응에 대한 분석 및 평가가 아직까지 많이 미흡한 상태이다. 그리고 마우스 근육을 이용한 연구 결과가 대부분이며 사람 골격근을 사용한 연구는 상당히 부족한 상태이다.

이 문제점을 기반으로 본 연구에서는 정확한 전기장을 형성하고 적은 세포의 양을 요구하는 전기자극 장치를 개발하였으며 사람 골격근세포를 선정하고 전극 거리에 따른 파라미터 값을 정확히 계산하여 근육 세포의 변화를 관찰했다. 그리고 전기자극에 따른 생존도 및 마이오튜브 변화를 측정했다. 본 연구에서 사용한 전기자극 세기는 현재까지 긍정적으로 밝혀진 전기자극 조건보다 약한 세기에서 세포의 효과적인 반응이 발견됐다. 0.1 V 에서 0.3 V 까지는 세포의 생존도에 큰 변화 없이 전기자극 후에도 분화를 계속 진행되고 있는 것을 확인했다. 0.5 V 이상의 수준에서는 세포 생존 능력이 급격히 떨어지는 것을 보였으며 2 V 이상에서는 전기분해 현상이 발생하는 것을 관찰 할 수 있었다. 주파수에 따른 변화에서도 이와 비슷한 경향성을 보여주고 있다. 이는 골격근의 종류와 성질에 따라 전기자극 조건에 반응하는 능력이 매우 다르며, 부위별에 따라 골격근의 특성을 파악하여 알맞은 조건을 분석을 해야함을 의미하고 있다.

향후 연구에서는 한 번에 다양한 전기 파라미터를 입력할 수 있는 기기 제작과 이를 통해 골격 근육의 부위에 따른 최적의 전기자극 조건의 확립이 필요하며 나이와 질병에 따른 반응도 관찰해 볼 필요도 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 17세 여성 근육 세포를 이용하여 전기자극에 따른 근 증가 효과를 보기 위해 전기자극 기기를 만들어 분석을 진행했다. 전기자극 전 후에는 따른 근육 세포는 기존 선행연구에서 밝혀진 조건보다 더 낮은 부분에서 세포 생존도가 많이 떨어지는 것을 확인했다. 또한 근력 증가를 유발하는 전기자극 조건은 전기 파라미터의 적절한 값을 통해 이루어지는 것을 확인하였다. 선행 연구들은 전극 거리와 전기 파라미터가 모호하게 제시하는 경우가 많으며 사람 근육 세포를 통한 연구 결과는 현재 많이 부족한 상태이다. 본 연구는 동물이 아닌 사람 세포를 이용하여 전기자극의 효과를 제시했으며 전기자극 세기에 따른 세포의 반응과 전기 파라미터의 정확한 설계가 매우 중요함을 나타내고 있다. 골격근 세포 특성에 따른 최적의 전기자극 조건을 찾고 재활치료 시 근육의 특징과 종류에 따라 각각의 다른 전기자극 조건을 형성하는 기초자료로서 사용될 것으로 기대된다.

참고문헌

- [1] C. Cheng, B. Davis, L. Madden, N. Bursac and G. Truskey, "Physiology and metabolism of tissue-engineered skeletal muscle", *Experimental Biology and Medicine*, vol. 239, no. 9, pp. 1203-1214, 2014.
- [2] G. Cittadella Vigodarzere and S. Mantero, "Skeletal muscle tissue engineering: strategies for volumetric constructs", *Frontiers in Physiology*, vol. 5, 2014.
- [3] A. Petersen, "The anti-inflammatory effect of exercise", *Journal of Applied Physiology*, vol. 98, no. 4, pp. 1154-1162, 2005.
- [4] N. Jones and K. Killian, "Exercise Limitation in Health and Disease", *New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 9, pp. 632-641, 2000.
- [5] Y. Liu, R. Grumbles and C. Thomas, "Electrical Stimulation of Embryonic Neurons for 1 Hour Improves Axon Regeneration and the Number of Reinnervated Muscles That Function", *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 72, no. 7, pp. 697-707, 2013.
- [6] A. Ito, Y. Yamamoto, M. Sato, K. Ikeda, M. Yamamoto, H. Fujita, E. Nagamori, Y. Kawabe and M. Kamihira, "Induction of functional tissue-engineered skeletal muscle constructs by defined electrical stimulation", *Scientific Reports*, vol. 4, no. 1, 2014.
- [7] K. Ikeda, A. Ito, M. Sato, Y. Kawabe and M. Kamihira, "Improved contractile force generation of tissue-engineered skeletal muscle constructs by IGF-I and Bcl-2 gene transfer with electrical pulse stimulation", *Regenerative Therapy*, vol. 3, pp. 38-44, 2016.
- [8] B. Zhang, S. Yeung, Y. Liu, H. Wang, Y. Wan, S. Ling, H. Zhang, Y. Li and E. Yeung, "The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension", *BMC Cell Biology*, vol. 11, no. 1, p. 87, 2010.

- [9] A. Ito, Y. Yamamoto, M. Sato, K. Ikeda, M. Yamamoto, H. Fujita, E. Nagamori, Y. Kawabe and M. Kamihira, "Induction of functional tissue-engineered skeletal muscle constructs by defined electrical stimulation", *Scientific Reports*, vol. 4, no. 1, 2014
- [10] H. Kern, L. Barberi, S. Lofler, S. Sbardella, S. Burggraf, H. Fruhmann, U. Carraro, S. Mosole, N. Sarabon, M. Vogelauer, W. Mayr, M. Krenn, J. Cvecka, V. Romanello, L. Pietrangelo, F. Protasi, M. Sandri, S. Zampieri and A. Musaro, "Electrical Stimulation Counteracts Muscle Decline in Seniors", *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 6, 2014.
- [11] M. Langelaan, K. Boonen, K. Rosaria-Chak, D. van der Schaft, M. Post and F. Baaijens, "Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 5, no. 7, pp. 529-539, 2010.
- [12] N. Nikolić, S. Skaret Bakke, E. Tranheim Kase, I. Rudberg, I. Flo Halle, A. Rustan, G. Thoresen and V. Aas, "Electrical Pulse Stimulation of Cultured Human Skeletal Muscle Cells as an In Vitro Model of Exercise", *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, p. e33203, 2012.
- [13] I. Evers-van Gogh, S. Alex, R. Stienstra, A. Brenkman, S. Kersten and E. Kalkhoven, "Electric Pulse Stimulation of Myotubes as an In Vitro Exercise Model: Cell-Mediated and Non-Cell-Mediated Effects", *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, 2015.
- [14] Y. Kawahara, K. Yamaoka, M. Iwata, M. Fujimura, T. Kajiume, T. Magaki, M. Takeda, T. Ide, K. Kataoka, M. Asashima and L. Yuge, "Novel Electrical Stimulation Sets the Cultured Myoblast Contractile Function to 'On' ", *Pathobiology*, vol. 73, no. 6, pp. 288-294, 2006.