

## Research Note



# 아연의 1차혈관평활근세포 증식에 대한 기능

조영은 , 권인숙

안동대학교 생명과학대학 식품영양학과

## The function of zinc in the primary vascular smooth muscle cell proliferation in rats

Young-Eun Cho and In-Sook Kwun

Department of Food and Nutrition, College of Life Science and Biotechnology, Andong 36729, Korea

### OPEN ACCESS

**Received:** Dec 1, 2020

**Revised:** Dec 11, 2020

**Accepted:** Dec 14, 2020

#### Correspondence to

In-Sook Kwun

Department of Food and Nutrition, College of Life Science and Biotechnology, 1375 Gyeongdong-ro, Andong 36729, Korea.  
Tel: +82-54-820-5917  
E-mail: iskwn@andong.ac.kr

© 2020 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### ORCID iDs

Young-Eun Cho

<https://orcid.org/0000-0001-9864-0265>

In-Sook Kwun

<https://orcid.org/0000-0003-2562-3469>

#### Funding

This work was supported by grant from Andong National University.

#### Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

### ABSTRACT

**Purpose:** The vascular smooth muscle cells (VSMCs) in mature animals have implicated to play a major role in the progression of cardiovascular diseases such as atherosclerosis. This study aimed at optimizing the protocol in culturing primary VSMCs (pVSMCs) from rat thoracic aorta and investigating the effect of cellular zinc (Zn) deficiency on cell proliferation of the isolated pVSMCs.

**Methods:** The thoracic aorta from 7-month-old Sprague Dawley rats was isolated, minced and digested by the enzymatic process of collagenase I and elastase, and then inoculated with the culture Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) at 37°C in an incubator. The primary cell culture morphology was observed using phase-contrast microscopy and cellular Zn was depleted using Chelex-100 resin (extracellular zinc depletion only) or 3 μM N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine (TPEN) (extracellular and intracellular zinc depletion). Western blot analysis was used for the detection of SM22α and calponin as smooth muscle cell marker proteins and von Willebrand factor as endothelial cell marker protein to detect the culture purity. Cell proliferation by Zn depletion (1 day) was measured by MTT assay.

**Results:** A primary culture protocol for pVSMCs from rat thoracic aorta was developed and optimized. Isolated cultures exhibited hill and valley morphology as the major characteristics of pVSMCs and expressed the smooth muscle cell protein markers, SM22α and calponin, while the endothelial marker von Willebrand factor was hardly detected. Zn deprivation for 1 day culture decreased rat primary vascular smooth muscle cell proliferation and this pattern was more prominent under severe Zn depletion (3 μM TPEN), while less prominent under mild Zn depletion (Chelexing).

**Conclusion:** Our results suggest that cellular Zn deprivation decreased pVSMC proliferation and this may be involved in phenotypic modulation of pVSMC in the aorta.

**Keywords:** primary vascular smooth muscle cells (pVSMCs), primary cell culture, vascular calcification, zinc, atherosclerosis

## 서론

혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cells, VSMCs)는 혈관 안쪽의 내피세포층 바로 아래 위치하는 평활근 세포층으로서, 혈관의 수축과 이완에 관여하고 혈관 칼슘화가 주로 일어나는 혈관의 주요 세포층이다 [1]. 동맥경화증 같은 혈관 질환은 혈관평활근세포의 기능과 밀접한 관련이 있으며, 따라서 혈관평활근세포 모델은 혈관 질환 연구에 있어서 주요한 세포모델이다 [2]. 그런데 평활근세포의 *in vitro* (시험관 안, 즉 생체 밖) 실험에서는 세포를 분화시켜 주는 과정이 따로 없다. 예를 들면, 마우스 조골세포 모델인 MC3T3-E1 세포라인 (cell line)은 일정 수준까지 세포를 증식한 후에는 조골세포 기능을 나타낼 수 있게 세포 분화 요소를 사용하여 조골세포 분화를 유도하지만 (조골세포의 경우 인산과 비타민 C 등), 혈관평활근 세포라인에 속하는 A7r5 세포 (실험쥐 대동맥 유래) 배양에서는 따로 혈관세포에 대한 분화 과정이 없다. 따라서 혈관세포 모델에서는 세포라인보다 생체조직에서 세포 배양을 하는 1차 세포배양 (primary cell culture)에 대한 필요성이 더 요구된다 [3].

세포모델 연구에서 세포라인이란 다세포 생체에서 특정 세포를 분리해서 세포가 사멸하지 않게 유전자변이를 준 다음, 같은 세포 특성을 가진 세포라인이 계속 증식할 수 있게 만든 세포모델이다 (immortalized cell line). 세포라인 배양의 장점은 세포 형질 특성의 일관성이 있을 수 있지만, 혈관 평활근세포에서처럼 따로 세포분화가 없는 경우에는 1차세포배양 (primary cell culture) 모델에 비해서는 세포의 분화 특성이 덜 나타날 수 있다. 따라서 혈관질환 연구에서는 동물의 생체 혈관에서 평활근을 채취하여 일정 수준까지 계대배양하는 1차세포배양 (primary cell culture)에 의한 세포모델 실험이 생체 밖 (ex vivo) 실험 모델로서 더 의미가 있다.

아연은 세포 안과 밖에 존재하는 미량무기질로서 많은 세포 조절기능을 가지고 있다. 많은 효소들 특히 세포의 과산화물 막아주는 세포의 항산화효소는 아연을 그 구성분으로 하며, 또한 세포 수준에서 단백질을 합성할 때 DNA로부터 mRNA가 만들어지는 전사 과정에 전사인자 (transcription factor)라는 단백질이 필요하고, 이 전사인자 단백질의 구성분으로서 아연이 필요하다. 아연이 포함되어 있는 단백질 모양이 손가락 모양 같다 하여서 zinc (Zn)-finger transcription factors 라고 명명되고 있다 [4,5]. 최근에는 세포 아연이 부족 시 조골세포의 칼슘화가 지연되고 [6], 칼슘화가 도리어 비정상적 형태인 혈관 같은 연조직에서의 아연에 관한 연구들도 보고되고 있다 [7,8].

본 연구는 아연의 혈관질환 기전 연구에 필요한 실험 쥐의 대동맥에서 유래한 1차혈관평활근 세포의 최적화된 1차세포 (primary cells) 형질 확인과 이를 활용하여 아연에 의한 혈관평활근 세포의 증식 (cell proliferation, 세포 활성 cell viability)을 평가하고자 하였다. 아연에 의한 혈관평활근세포의 증식은 아연의 혈관 생리적 변화에 대한 선행연구 결과를 도출할 수 있으며, 이는 아연의 혈관질환에 대한 기능 연구에 도움을 줄 수가 있으리라 생각된다.

## 연구방법

### 실험 쥐 대동맥 유래의 1차혈관평활근세포 (primary vascular smooth muscle cells) 계대배양

1차세포 제작에 필요한 혈관 조직은 기관생명윤리위원회 (Institutional Review Board, IRB) 승인을 얻은 후, 혈관 조직을 제공받아 분리 및 배양을 실시하였다. 실험쥐 1차혈관평활근세포의 분리 및 배양에 관한 표준 프로토콜을 확립하고 최적화하기 위해서 다음과 같이 실시하였다.

실험 쥐 대동맥 조직 (Sprague Dawley, 7개월령)을 채취하여 지방조직을 제거하고 혈관을 절개한 뒤, 혈관내피세포를 조심스럽게 긁어서 제거하였다. 이후 조직을 조각 낸 뒤 collagenase type 1 (1 mg/mL, C1639; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 elastase (0.74 units/mL, E1250; Sigma-Aldrich)로 조직의 결합단백질 및 세포간 단백질을 제거하고, soybean trypsin inhibitor (1 mg/mL, 17075-029; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)을 사용하여 단백질 분해 저해와 세포 오염을 방지하였다. 이후, 계대배양 준비된 세포조직은 1X Dulbecco's Modified Eagle's Medium에 Penicillin/Streptomycin (1% final)과 fetal bovine serum (heat inactivated, 20% final)이 첨가된 세포배양액에 옮겨서 배양하였으며, 이후 일반적인 평활근세포 배양 방식대로 계대배양 하였다. 1차세포는 계대배양 수 (passage number)가 일정한 수치를 넘어가면 혈관평활근세포의 특성을 잃는 편이며, 따라서 본 연구에서는 계대 수 4-5 이하로 저장하여 사용하였다. 세포배양의 진행과정은 위상차 현미경 (phase-contrast microscopy)를 사용하여 관찰하였다. 1차혈관세포배양 및 세포 아연처리 과정은 Fig. 1에 도식화하여 나타내었다.

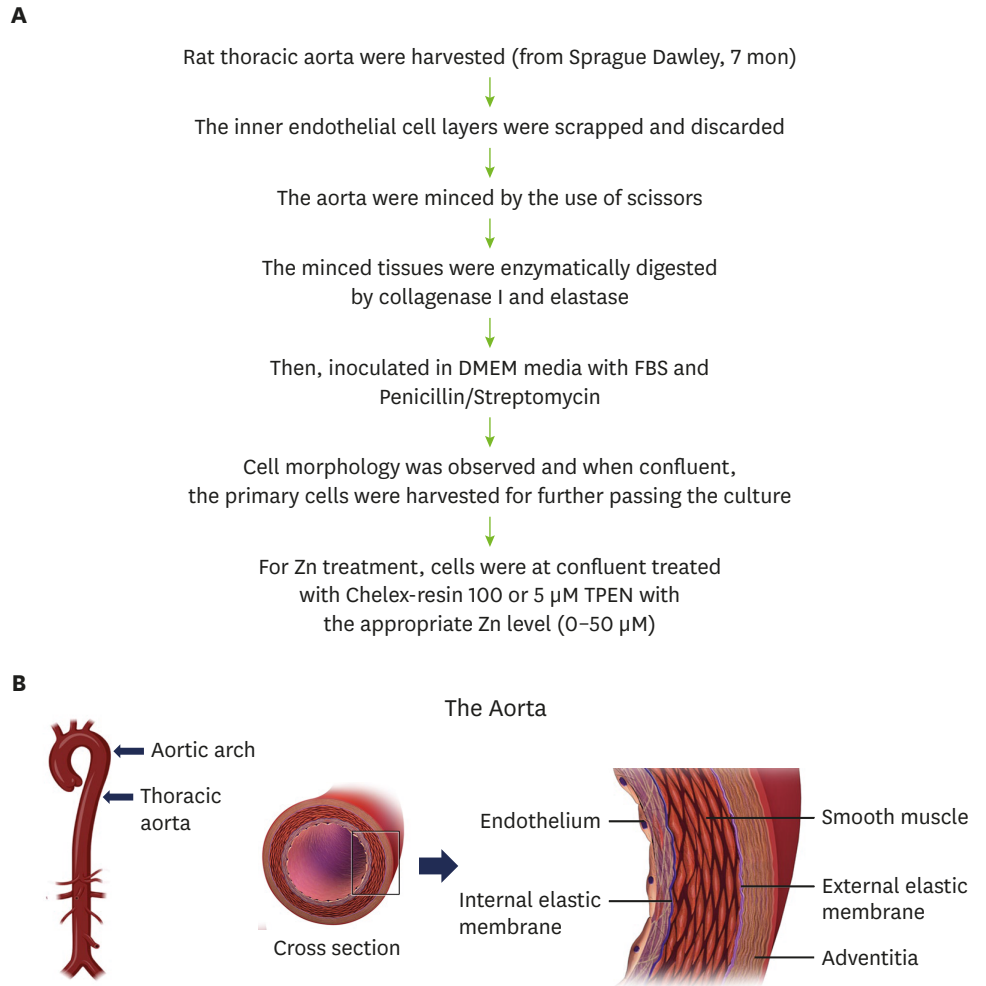
동물실험 허가는 영국 로웨트연구윤리위원회 (Ethics Committee, Rowett Research Institute)의 승인을 받았으며 (Investigation confirmation to Directive 2010/63/EU of the European parliament), 모든 절차와 관리는 영국 동물복지관리 (UK Home Office Animal Welfare) 및 안동대 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다.

### 세포 아연 처리

세포의 아연 처리는 두 가지 방법으로 실시하였는데, 1) 세포 밖 배양액의 아연을 결합하여 세포의 아연 결핍을 유도하는 Chelexing (chelex-100; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법과 세포막을 통과하여 세포 내외의 아연을 결합하면서 세포의 아연 결핍을 유도하는 TPEN (Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 세포 밖 세포 배양액의 아연이 고갈되는 Chelexing 방법은 약한 수준의 세포 아연 결핍인 반면에 (extracellular Zn depletion), 세포 내외의 아연을 모두 고갈시킬 수 있는 TPEN을 사용하는 방법은 심한 수준의 세포 아연 고갈 방법이다 (extracellular and intracellular Zn depletion). 두 방법 모두 세포의 아연을 고갈시킨 후에, 처리하고자 하는 아연의 양을 배양액에 추가하여 세포배양 하였다.

### Western blot 및 1차혈관평활근세포 증식 측정

Western blot을 이용하여 혈관평활근세포 마커단백질인 SM22 $\alpha$  (transgelin 단백질 family)와 calponin, 그리고 혈관내피세포 마커단백질인 von Willebrand factor 단백질 발현을 측정하였다. 세포증식 (세포 활성)은 MTT assay를 사용하여 측정하였다.

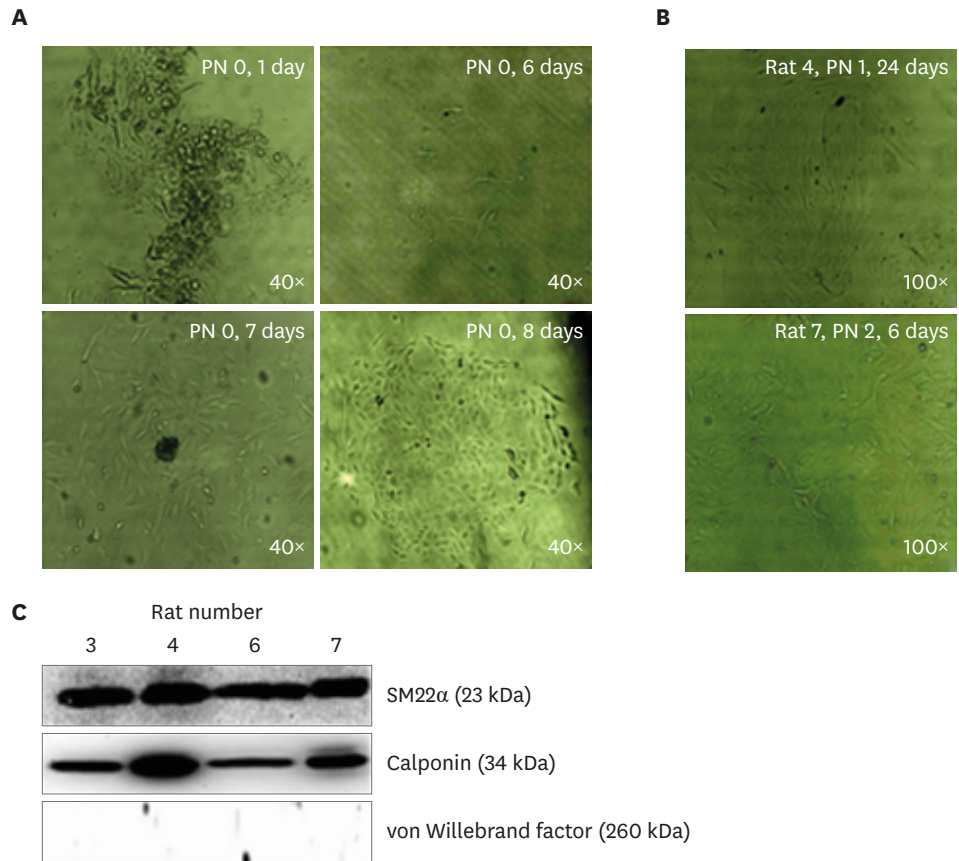


**Fig. 1.** The diagram for the isolation of primary vascular smooth muscle cell from rat aorta and cellular Zn treatment. (A) The isolation and primary cell culture from rat aorta is shown with cellular Zn treatment. (B) Rat thoracic aorta were collected and then enzymatic digestion and inoculation of culture were processed for primary cell culture.  
Zn, zinc; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS, fetal bovine serum.

## 결과 및 고찰

### 1차혈관평활근세포의 계대배양 특성

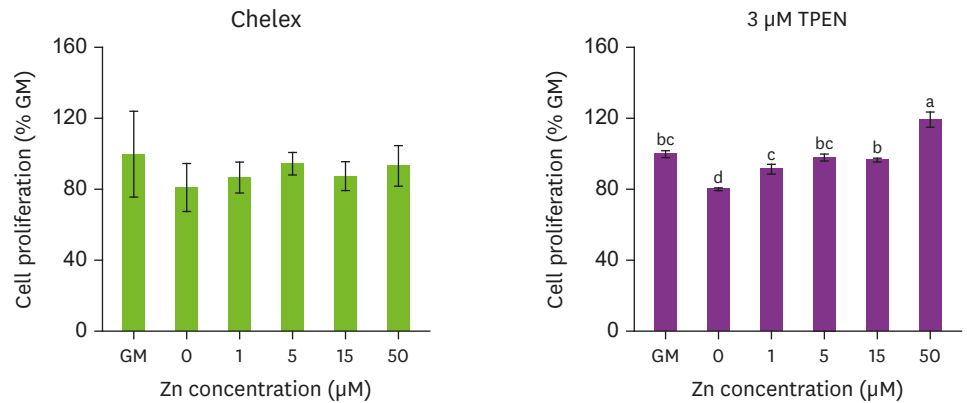
실험쥐로부터 채취한 대동맥 1차혈관평활근세포 (rat primary vascular smooth muscle cells, pVSMCs)의 계대배양 특성을 Fig. 2에 나타내었다. 혈관조직을 1차 배양한 후의 세포 형태적 변화를 보면, 배양 1일에는 세포들이 배양접시에서 서로 이동해서 증식하기 시작하며, 6-7일째에는 혈관평활근세포의 주요 특성인 섬유세포 (fibroblastic) 모습을 나타내기 시작하였다. 8일 이후에는 80% 이상의 세포 배양 포화상태로 증식해서 혈관평활근세포의 전형적인 높고 낮은 세포배양층의 모습을 나타내었다 (hill and valley like morphology) (Fig. 2A). 최초의 1차 배양 (passage number, PN=0) 이후, 계대배양 1-2번째까지도 혈관평활근세포의 특성인 섬유 세포 모양을 나타내었으며, 계대배양 4-5번째까지도 이러한 특성을 그대로 유지하였다. 따라서 본 연구에서의 계대배양은 4번까지로 최적화하였다 (Fig. 2B).



**Fig. 2.** Cell morphology of isolated rat pVSMCs in cultures (A and B) and smooth muscle cell marker expression (C). (A) The aorta isolated from rat 1 was cut into small portions and were allowed to adhere to the culture dish. After 1 day, some cells began to migrate from the tissue explants. At 6 days, healthy cells with a characteristic fibroblast shape began to grow. At 7-8 days, growing cells began to come in contact with each other and formed a subconfluent layer. (B) Cell morphology of passaged pVSMCs isolated from different rats. The morphology of the passaged pVSMCs also exhibited fibroblastic morphology indicating the smooth muscle cell phenotype. (C) The phenotype of the cultured pVSMCs was assessed by the expression of SM22 $\alpha$  and calponin, both of which are abundantly expressed by differentiated smooth muscle cells. The purity of the isolated cultures was assessed by the lack of expression of the endothelial cell marker von Willebrand factor, the common contaminant in pVSMCs isolation. Protein expression was assessed by Western blotting. pVSMC, primary vascular smooth muscle cell; PN, passage number.

### 1차혈관평활근세포의 형질 특성 측정

분리 배양한 1차평활근세포 형질 (cell phenotype)이 최적화 조건으로 배양되었고, 혈관내피 세포로 오염 배양은 되지 않았는지를 확인하기 위해서 SM22 $\alpha$ 과 calponin (혈관평활근세포 마커단백질)과 von Willebrand factor (혈관내피세포 마커단백질) 발현을 측정하였으며, 이에 대한 결과를 Fig. 2C에 나타내었다. SM22 $\alpha$  (transgelin 단백질 family)와 calponin은 혈관평활근세포가 적절히 잘 분화하면 나타나는 주요 마커단백질인데 [9-11], Western blot 측정 결과가 이 두 마커단백질의 발현은 1차혈관평활근세포 배양에서 충분히 발현되었다 (Fig. 2C). 또한 혈관내피세포 마커인 von Willebrand factor 단백질 발현은 나타나지 않았다 (Fig. 2C). 따라서 본 혈관평활근세포의 1차배양은 평활근세포 마커단백질의 발현과 내피세포로 인한 오염 배양이 없는 최적화된 1차혈관평활근세포의 배양임을 확인하였다.



**Fig. 3.** Cell proliferation of rat pVSMCs cultured under extracellular (chelexed) and intracellular (TPNEed) Zn depletion. pVSMCs were grown until confluence. At confluence, cells were switched to media containing chelexed serum (extracellular Zn depletion) or 3 μM TPEN (intracellular Zn depletion) resulting in a mild and severe Zn deficiency, respectively. Cells were treated with Zn for 1 day. Cell proliferation was measured by MTT assay and presented as % GM (cells cultured in normal GM only). Statistically, Zn effect was analyzed by one-way analysis of variance at  $p < 0.05$  followed by Turkey as post hoc test.

pVSMC, primary vascular smooth muscle cell; Zn, zinc; GM, growth media.

<sup>a-d</sup>Means having different superscripts indicated significance among Zn treatments (mean ± SD, n = 7).

### 아연의 1차혈관평활근세포 증식에 대한 영향

실험쥐의 대동맥 유래의 1차평활근세포의 증식에 미치는 아연의 영향에 대한 결과는 **Fig. 3**에 나타내었다. 세포의 생리적 아연 수준은 15 μM 정도가 일반적인 수준으로 제시되고 있다 [5]. 본 연구에서는 아연에 의한 1차혈관평활근세포의 증식은 저농도 구간에서 낮아졌으며 (0-1 μM), 이 현상은 TPEN (intra- and extra-cellular Zn chelator) 처리한 세포배양에서 더 두드러졌으며, Chelexing (extra-cellular Zn chelator) 처리를 한 경우에는 통계적으로 유의적 의미는 보이지 않았지만 비슷한 경향을 나타내었다. 이는 TPEN 이 세포 안과 밖의 아연을 고갈시킬 수 있는 심한 수준의 아연 결핍인 것에 비교해서, Chelex-resin 은 세포 밖의 아연만 고갈시킬 수 있으며, 이에 따른 세포 아연 고갈 정도에 따른 결과라고 해석된다.

또한 3 μM TPEN 처리한 실험에서는 50 μM 아연 처리군에서 세포 증식이 대조군 (growth media, GM) 보다 높았으며 ( $p < 0.05$ ), 이는 세포의 아연이 충분할수록 단기간의 혈관평활근세포 증식을 증가하는 것으로 나타났다. 이는 혈관평활근세포가 일정한 증식기간이 필요한 초기 혈관생성에는 아연의 긍정적 효과를 나타내며, 선행연구에서의 장기간 (20일 이상)의 혈관평활근세포 배양에서는 오히려 세포 아연이 결핍될수록 혈관평활근세포 증식이 높아졌는데, 이는 혈관평활근세포의 분화가 지연되고 증식은 여전히 많아서 혈관벽이 두꺼워지는 현상과 관련이 있는 것으로 이해되며 이는 동맥경화증 같은 혈관계 질환 유발에 아연 결핍이 관여됨을 시사하는 점이다 [12]. 한편, 아연이 혈소판이 분비하는 당단백질 thrombospondin 이 있을 때에 혈관평활근세포의 증식을 추가적으로 증가시킬 수 있다는 논문 결과가 보고된 적이 있으며, 이 결과 역시 아연이 혈관세포조직과의 연관성을 제시하는 연구라고 생각된다 [13].

본 연구의 결과는 실험쥐 대동맥으로부터 채취한 혈관평활근세포의 1차배양에서 평활근세포 마커단백질 발현은 충분히 나타났고, 혈관내피세포의 오염 배양은 없었으며, 따라서 혈관평활근세포 모델로서 최적화된 형질 특성을 보여주었다. 또한 1차혈관평활근세포에서의 아연 결핍은 세포 증식을 감소시켰는데, 이는 세포의 아연 고갈수준이 심할수록 더 감소되었

으며, 이러한 결과는 혈관평활근 세포에서의 아연 결핍은 혈관의 손상을 가지고 올 수 있음을 암시하는 연구결과이다.

## 감사문

본 실험에 도움을 준 Ethel Alcantara 와 1차세포 배양에 대한 조언을 준 로웨트 심혈관연구팀에게 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118(4): 692-702.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Harman JL, Jørgensen HF. The role of smooth muscle cells in plaque stability: Therapeutic targeting potential. *Br J Pharmacol* 2019; 176(19): 3741-3753.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Wang D, Uhrin P, Mocan A, Waltenberger B, Breuss JM, Tewari D, et al. Vascular smooth muscle cell proliferation as a therapeutic target. Part 1: molecular targets and pathways. *Biotechnol Adv* 2018; 36(6): 1586-1607.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Beattie JH, Marco Malavolta M, Irina Korichneva I. Zinc. In: Malavolta M, Mocchegiani E, editors. *Trace Elements and Minerals in Health and Longevity*. Berlin: Springer; 2018. p.99-131.
- Cousins RJ. A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc Nutr Soc* 1998; 57(2): 307-311.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Alcantara EH, Lomeda RA, Feldmann J, Nixon GF, Beattie JH, Kwun IS. Zinc deprivation inhibits extracellular matrix calcification through decreased synthesis of matrix proteins in osteoblasts. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(10): 1552-1560.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Allen-Redpath K, Ou O, Beattie JH, Kwun IS, Feldmann J, Nixon GF. Marginal dietary zinc deficiency in vivo induces vascular smooth muscle cell apoptosis in large arteries. *Cardiovasc Res* 2013; 99(3): 525-534.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Nagy A, Pethő D, Gáll T, Zavaczki E, Nyitrai M, Posta J, et al. Zinc inhibits HIF-Prolyl hydroxylase inhibitor-aggravated VSMC calcification induced by high phosphate. *Front Physiol* 2020; 10: 1584.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13(2): 63-70.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Ferjani I, Fattoum A, Manai M, Benyamin Y, Roustan C, Maciver SK. Two distinct regions of calponin share common binding sites on actin resulting in different modes of calponin-actin interaction. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804(9): 1760-1767.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015; 125(13): 2019-2028.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Alcantara EH, Shin MY, Feldmann J, Nixon GF, Beattie JH, Kwun IS. Long-term zinc deprivation accelerates rat vascular smooth muscle cell proliferation involving the down-regulation of JNK1/2 expression in MAPK signaling. *Atherosclerosis* 2013; 228(1): 46-52.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
- Kaji T, Fujiwara Y, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. Stimulation of cultured vascular smooth muscle cell proliferation by thrombospondin is potentiated by zinc. *Biol Pharm Bull* 1995; 18(9): 1264-1266.  
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)