

ATP-Induced Apoptosis of Human Luteinized Granulosa Cells: a Role of Mitochondria

김미란 · 박동욱 · 김영아 · 조태섭* · 황경주 · 민철기*

아주대학교 의과대학 산부인과교실, 생명과학과*

서 론

난소의 재형성 과정은 난소 내 여러 조절인자들에 의해 조절되는 성장 및 퇴행 과정을 반복하는 특징을 가지고 있다¹⁾. 황체는 주기적 성장과 퇴행을 보이며 과립세포의 세포자멸사 (apoptosis)를 통해 황체의 퇴행이 일어나게 된다²⁾. 이러한 세포자멸사 과정은 난소의 정상 생리에 매우 중요하다.

ATP는 자율신경으로부터 세포의 유출을 통해 분비되어³⁾ 근육 수축, 신경전달체계, 외분비 및 내분비 호르몬의 분비, 면역반응, 염증, 혈소판 응집, 동통 및 심장기능의 조절 등 매우 다양한 생물학적 기능에 영향을 미친다⁴⁻⁵⁾. 이러한 작용은 세포 표면에 존재하는 purinoceptor를 통해 이루어지는 것으로 알려져 있다⁶⁾. ATP는 일반적으로 세포 내에서는 에너지원으로서 작용하나 세포외부에 존재하는 ATP의 경우에는 조절물질로 작용하여 어떤 세포에 있어서는 세포용해를 일으키기도 하며⁷⁻⁸⁾, 어떤 세포에서는 세포자멸사를 유발하기도 한다⁹⁾. 세포 내에 존재하는 ATP는 세포의 주요한 에너지원으로 사용되며 살아있는 세포에서는 세포막을 통과하지 못하는 반면 세포 외에 존재하는 ATP는 말초신경계 혹은 중추신경계에 있어서 매우 중요한 신경전달물질로 작용하고 있다¹⁰⁻¹¹⁾. 인간 및 동물의 난소에는 교감 및 부교감 신경이 잘 분포되어 있고 이에 의해 프로게스테론 합성이 조절된다는 연구 결과와¹²⁾ 과립 세포에서 P₂ purinoceptor 수용체가 존재한다는 사실은¹³⁾ 신경말단으로부터 분비된 ATP가 난소의 기능을 조절하는 중요한 조절 인자로 작용함을 시사한다. 최근에는 인간의 과립세포에서 purinoceptor를 통한 세포 내 칼슘 이온의 변화가 있음이 확인되었고¹⁴⁾, 세포 내 칼슘 이온의 변화가 세포자멸사의 핵심 신호라는 것이 보고되어¹⁵⁻¹⁶⁾ 과립세포에 있어서 ATP에 의한 세포내 칼슘 이온 농도의 증가가 세포자멸사와 연관이 있으리라 사료된다.

또한, 최근 들어 세포자멸사 과정을 미토콘드리아의 기능 손상으로 인한 막전위차 ($\Delta\Psi_m$)의 붕괴, 산소 자유 유리기의 생성, permeability transition (PT) pore의 개통 및 cytochrome c의 분비에 의한 caspases의 활성화를 통해 세포자멸사 과정으로 돌입한다고 보고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾.

난소의 생리에 있어서 세포자멸사가 중요함에도 불구하고 난소 내에서 이를 조절하는 분자생물학적인 과정은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구는 ATP를 과립

세포 배양시 첨가하여 미토콘드리아에 미치는 영향을 살펴보고, ATP가 미토콘드리아에 어떠한 영향을 미친다면 이러한 결과가 과립세포의 세포자멸사와 연관이 있는지 알아보고자 연구를 시행하였다.

재료 및 실험방법

1. 황체화 과립세포(human luteinized granulosa cell; hLGC)의 획득과 배양

체외수정 및 배아이식술(IVF-ET)을 시행하는 환자들로부터 획득한 과립세포를 사용하였다. 황체화 과립세포를 혈청이 없는 DMEM-F12 medium (Gibco, Life Technologies, Roskilde, USA)에 수합한 후 적혈구와 분리하기 위하여 40% percoll (Sigma, USA) 용액을 이용하여 원심분리 하였다. 그 후 과립세포를 trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin and 0.53 mM EDTA · 4Na in Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco, USA) 2 mL와 혼합한 후 37°C에서 10분간 진탕 배양하여 단일세포로 분리하였다. 분리된 세포를 배양액 (minimum essential medium (MEM; Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 2 mM L-glutamine (Gibco, BRL), 100 U/mL penicillin (Gibco, BRL), 100 µg/mL streptomycin (Gibco, BRL)을 첨가)에 푼 후 1회 원심분리 하여 세포를 갈아 앉히고 이를 다시 같은 배양액을 이용하여 2×10^5 cells/mL의 농도로 희석하였다. 희석된 세포를 35 mm 배양 접시에 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양한 후 동일한 배양액으로 교환하였다. 과립세포 채취 후 24시간 후에 실험 조건에 따라 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM의 adenosine tri-phosphate (ATP, Sigma, USA)를 배지에 첨가하여 24시간 배양한 후 필요한 실험을 진행하였다.

2. Patch-clamp analysis를 이용한 purinoreceptor 전류 전도도 측정

Whole-cell patch clamp 방법을 이용하여 ATP에 의한 황체화 과립세포의 막전류를 측정하였다. 황체화 과립세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 poly-L-lysine이 코팅된 plastic coverslip 위에서 24시간 이상 배양하였다. 세포가 들어있는 plastic coverslip을 도립현미경 (Diaport 200, Nikon, Japan)의 재물대에 고정시킨 후 상온에서 실험을 진행하였다. 세포 배양용액과 0.1 mM의 ATP가 들어 있는 시험 용액은 perfusion 방법으로 제공하였다. Patch electrode는 borosilicate glass tube (B150-86-10, Sutter instruments, USA)를 사용하였고 tip의 크기는 1 µm 내외, 전체 저항은 3~4 MΩ 정도로 맞추었다. 표준 세포 배양액 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES-Na, pH 7.3, 300 mosmol/L)과 pipette electrode에 채울 용액 (140 mM KCl, 10mM NaCl, 1.0 CaCl₂, 8 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.3, 285 mosmol/L)은 0.2 µm membrane filter를 이용하여 걸러주었다. 전기신호증폭기는 Axo-patch-1D (Axon instruments, Inc., USA)를 사용하였고, 실험 데이터는 pCLAMP6.0 (Axon instruments, Inc., USA)을 이용하여 최종 분석하였다.

3. 형광염색약을 이용한 미토콘드리아의 염색

배양 중인 황체화 과립세포 배지에 첨가된 ATP를 농도 별로 첨가한 후 24시간 더 배양한 후 손상 받지 않은 미토콘드리아에만 염색이 가능한 10 µg/ml 농도의 Rhodamine 123 (Molecular Probes Inc., Eugene, USA)을 배지에 첨가한 후 37°C에서 15분간 배양하고 PBS로

2회 세척하였다. 각각의 검체는 490 nm의 파장에서 여기 (excitation)되고, 510 nm의 파장으로 발산되는 형광을 공초점 현미경 (MR-AG/2, BIO-RAD, USA)으로 분석하였다. 미토콘드리아의 막전위차 ($\Delta\Psi_m$)를 측정하기 위해서는 배지에 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1, Molecular Probe, USA)을 첨가하여 37°C에서 15분간 배양한 후에 PBS로 2회 세척하여 공초점 현미경으로 분석하였다. 각 검체를 490 nm에서 여기시킨 후 각각 510/590 nm의 파장에서 JC-1의 발현 정도를 관찰하였다.

4. 세포자멸사 관찰

배양된 과립세포를 phosphate buffered saline (PBS) 용액에 resuspension 시킨 후 Annexin V-FITC apoptosis detection kit (PharMingen, USA)를 이용하여 FITC-Annexin V 및 Propidium iodide (PI)로 처리한 후 flow cytometry로 정량화 하였다. Flow cytometry는 single 488 nm 파장의 argon laser가 장착된 FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, USA)를 사용하였다. 매 실험 당 최소 10,000개의 세포들로부터 결과를 Lysis II software (Becton Dickinson, USA)로 분석하였다.

5. 통계학적 분석

연구 결과에 대한 통계학적 분석은 SPSS for Windows Release 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였다. Friedmann test를 사용하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

배양된 과립세포에 ATP를 perfusion 방법으로 첨가한 후 patch clamp 기법을 이용하여 과립 세포막에 발생하는 전류를 측정한 결과 주로 외향성전류 (outward current)가 발견되어 P_{2Y} type의 purinoceptor를 통해 ATP가 인식, 신호전달 된다는 것을 나타낸다. 세포 내 Ca^{+2} 의 농도 변화를 Fura-2를 이용하여 측정한 결과 과립세포는 100 μM 의 ATP에 의해 세포 내 Ca^{+2} 농도를 증가시켰다. 외부의 Ca^{+2} 이 없는 상태에서는 세포 내 Ca^{+2} 의 농도 증가는 처리 후 2초 후 최대치에 도달하였고 1초 이내에 다시 기준치로 되돌아 왔다. 과립세포 내에 존재하는 살아 있는 미토콘드리아를 관찰하기 위해 ATP가 농도별로 처리된 (0~0.75 mM) 세포에 Rhodamine 123를 첨가하여 미토콘드리아를 염색시켰다. 처리한 ATP는 농도 의존적으로 살아있는 미토콘드리아의 수를 감소시켰다 (최대 40% 감소) ($P=0.05$). 또한 미토콘드리아의 막전위 변화에 민감한 형광염색약인 JC-1을 과립세포에 처리한 미토콘드리아의 막전위 변화를 측정한 결과 ATP의 농도가 높아질수록 높은 막전위를 갖는 미토콘드리아의 상대적 빈도 (red/green ratio)가 감소하는 양상을 보였다 ($P=0.027$). 배양된 과립세포를 FITC-Annexin V 와 Propidium Iodide로 이중 염색한 후 flow cytometry로 정량 분석한 결과 ATP의 농도가 증가할수록 세포자멸사의 정도가 증가함을 보여주었다. 이와 같은 관찰 결과, 인간 황체화 과립세포의 배양에 있어서 세포 외 ATP는 농도에 비례하여 과립세포의 세포자멸사를 유도하는 것으로 나타났으며 이러한 과정은 세포막의 purinoceptor의 활성화 및 미토콘드리아의 기능적 변화를 통하여 이루어짐을 관찰함으로써 난소의 재형성과정이 세포 외 ATP에 의한 신경내분비학적 조절을 받고 있으리라 사료된다. 또한 5 IU/mL의 hCG

가 ATP에 의해 유도되는 세포자멸사를 억제하는 결과를 얻어 황체화과립세포의 세포자멸사는 gonadotrophin에 의해 억제된다는 사실을 확인하였다.

참고문헌

1. Yen J and Adashi EY. The ovarian life cycle. In: Yen SS, Jaffe RB, and Barbieri RL editors. Reproductive endocrinology. 4th ed. Philadelphia; Saunders; 1999. p.153-190.
2. Murdoch WJ. Temporal relationships between stress protein induction, progesterone withdrawal, and apoptosis in corpora lutea of ewes treated with prostaglandin F2 alpha. *J Anim Sci.* 1995; 73: 1789-92.
3. Gorden JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J.* 1986; 233: 309-319.
4. el-Moatassim C, Dornand J, Mani JC. Extracellular ATP and cell signalling. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1134: 31-45.
5. Burnstock G. Overview. Purinergic mechanisms. *Ann NY Acad Sci.* 1990; 603: 1-17.
6. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-92.
7. Di Virgilio F, Bronte V, Collavo D, Zanovello P. Responses of mouse lymphocytes to extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP). Lymphocytes with cytotoxic activity are resistant to the permeabilizing effects of ATP. *J Immunol.* 1989; 143: 1955-60.
8. Filippini A, Taffs RE, Agui T, Sitkovsky MV. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J Biol Chem.* 1990; 265: 334-40.
9. Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JD. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol.* 1991; 112: 279-88.
10. Fredholm BB. Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol.* 1995; 76: 228-39.
11. Edward FA, Gibb AJ. ATP; A fast transmitter. *FEBS Lett.* 1993; 325: 86-89.
12. Bodis J, Tinneberg HR, Papenfuss F, Torok A, Cledon P, Hanf V, Schwarz H. Cholinergic stimulation of progesterone and estradiol secretion by human granulosa cells cultured in serum-free medium. *Gynecol Endocrinol.* 1993; 7: 83-7.
13. Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K, Hodgen GD. Existence of P2-purinoceptors on human and porcine granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 650-6.
14. PSN Lee, PE Squires, AMJ Buchan, BH Yuen, PCK Leung. P2-purinoreceptor evoked changes in intracellular calcium oscillations in single isolated human granulosa-lutein cells. *Endocrinol* 1996; 137: 3755-3761.
15. Mussche S, Leybaert L, D'Herde K. First and second messenger role of calcium. Survival versus apoptosis in serum-free cultured granulosa explants. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 926: 101-15.
16. Luciano AM, Pappalardo A, Ray C, Peluso JJ. Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the

- distribution of intracellular free calcium. *Biol Reprod.* 1994; 51: 646-54.
17. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281: 1309-12.
 18. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1366: 79-94.
 19. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999; 341: 233-49.