

## 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 있다<sup>1)</sup>. 황체는 주기적 성장과 퇴행을 보이며 과립세포의 세포자멸사 (apoptosis)를 통해 황체의 퇴행이 일어나게 된다<sup>2)</sup>. 이러한 세포자멸사 과정은 난소의 정상 생리에 매우 중요하다.

ATP는 자율신경으로부터 세포의 유출을 통해 분비되어<sup>3)</sup> 근육 수축, 신경전달체계, 외분비 및 내분비 호르몬의 분비, 면역반응, 염증, 혈소판 응집, 동통 및 심장기능의 조절 등 매우 다양한 생물학적 기능에 영향을 미친다<sup>4-5)</sup>. 이러한 작용은 세포 표면에 존재하는 purinoceptor를 통해 이루어지는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. ATP는 일반적으로 세포 내에서는 에너지원으로서 작용하나 세포외부에 존재하는 ATP의 경우에는 조절물질로 작용하여 어떤 세포에 있어서는 세포용해를 일으키기도 하며<sup>7-8)</sup>, 어떤 세포에서는 세포자멸사를 유발하기도 한다<sup>9)</sup>. 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 있다<sup>10-11)</sup>. 인간 및 동물의 난소에는 교감 및 부교감 신경이 잘 분포되어 있고 이에 의해 프로게스테론 합성이 조절된다는 연구 결과와<sup>12)</sup> 과립 세포에서 P<sub>2</sub> purinoceptor 수용체가 존재한다는 사실은<sup>13)</sup> 신경말단으로부터 분비된 ATP가 난소의 기능을 조절하는 중요한 조절 인자로 작용함을 시사한다. 최근에는 인간의 과립세포에서 purinoceptor를 통한 세포 내 칼슘 이온의 변화가 있음이 확인되었고<sup>14)</sup>, 세포 내 칼슘 이온의 변화가 세포자멸사의 핵심 신호라는 것이 보고되어<sup>15-16)</sup> 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 있다<sup>17-19)</sup>.

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  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 희석하였다. 희석된 세포를 35 mm 배양 접시에 접종한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^5$  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 CaCl<sub>2</sub>, 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 CaCl<sub>2</sub>, 8 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.3, 285 mosmol/L)은 0.2 µm membrane filter를 이용하여 걸러주었다. 전기신호증폭기는 Axopatch-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 측정된 결과 주로 외향성전류 (outward current)가 발견되어  $P_{2Y}$  type의 purinoceptor를 통해 ATP가 인식, 신호전달 된다는 것을 나타낸다. 세포 내  $\text{Ca}^{+2}$ 의 농도 변화를 Fura-2를 이용하여 측정된 결과 과립세포는 100  $\mu\text{M}$ 의 ATP에 의해 세포 내  $\text{Ca}^{+2}$  농도를 증가시켰다. 외부의  $\text{Ca}^{+2}$  이 없는 상태에서는 세포 내  $\text{Ca}^{+2}$ 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 측정된 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 재형성과정에서 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.