

Flow Cytometer를 이용한 소 과립막세포의 분석: 난포성숙에 따른 세포주기의 변화

김해정 · 김동훈 · 이훈택 · 정길생
건국대학교 동물자원연구센터

Flow Cytometric Analysis of Bovine Granulosa Cells: Changes of Cell Cycle During Follicular Maturation

Kim, H. J., D. H. Kim, H. T. Lee and K. S. Chung
Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

The objective of the present study was to characterize the cell cycles of granulosa cell populations during follicular maturation in cattle by using flow cytometer. Granulosa cells were isolated from bovine preovulatory antral follicles of F1(>10mm), F2(5~10mm), F3(3~4mm) and F4(1~2mm) diameter and fixed and stained with fluorochromes that selectively bind to DNA. Flow cytometer equipped with a laser excitation system was used to analyze the intensity of fluorescence from stained cells. Forward angle light-scatter(FSC) and 90° light-scatter(SSC) signals were adopted to measure the size and the granularity of granulosa cells. As a results of FSC/SSC analysis, granulosa cell populations(G1 phase of cell cycle) from each follicle were relatively regular in size and granularity, regardless of follicular size. However, their distribution in granularity was greater than that in size. Most of granulosa cell populations collected from each follicle were distributed in G₀/G₁, S and G₂/M phases. As the follicles approached to ovulation the percentage of cells in the proliferative phases of cell cycle (S and G₂/M) decreased significantly, but there was a concomitant increase in the percentage of granulosa cells in G₁ phase. Therefore, these data indicate the proportion of main populations to cell cycle of granulosa cells may be changed from proliferative phase to G₁ phase during follicular maturation in cattle.

I. 서론

난포란의 성숙과 배란은 난포내에서 난포란을 둘러싸고 있는 난포세포들의 기능적 분화와 깊은 관련이 있다. 그리고, 난포세포의 성장과 분화의 조절은 난포 발육뿐만 아니라 난자의 성숙에도 매우 중요하다. 난

자형성과정에서 포유류의 난포란은 주위 여러층의 난포세포와 다양한 gap junction을 형성하고 있으며 (Anderson와 Albertini, 1976), 이를 통해 난자성숙에 필요한 에너지원, 핵산, 아미노산등을 공급 받는다 (Heller와 Schultz, 1980; Heller 등, 1981; Brower와 Schultz, 1982; Colonna와 Mangia, 1983).

원시난포로부터 발달된 난포는 난포액에 의해 난포강이 형성되면서 부터 성선자극호르몬 (FSH, LH)의 영향을 받게 된다. FSH의 영향을 받은 과립막세포는 그 분화가 촉진되고, 난포액의 분비도 증가되면서 아울러 estrogen의 분비도 증가하게 된다(Hadley, 1992; Hafez, 1987). 과립막세포에 의해 분비된 estrogen은 다시 autocrine현상으로 과립막세포에 영향을 주어 세포증식과 estrogen의 분비를 자극한다(Rao 등, 1978).

Flow cytometer (FCM-유식세포 분석분리기)는 특정한 세포를 분리할 수 있을 뿐만 아니라 세포의 여러 특성을 측정, 비교함으로써 세포의 독특한 성질을 알아낼 수 있어 세포생물학을 연구하는데 중요한 도구로 사용되어 오고 있다. 즉 Flow cytometer는 세포의 크기나 세포의 과립상태를 측정할 수 있고, 세포내에 존재하는 특정물질, 예를 들면 DNA, RNA, 단백질의 상대적인 양도 측정할 수 있다(Ormerod, 1990).

지금까지의 난포 성장에 따른 난포의 변화에 관한 연구는 주로 조직학적 절편을 이용하여 그 크기와 세포수를 측정하는 방법이나, autoradiography법을 이용하여 세포의 mitotic activity를 측정하는 방법들이 제시되고 있지만(Butcher, 1984), 이러한 방법들로써는 세포의 정확한 증식율을 알 수 없으며, 또한 방법상의 문제점도 많이 지적되고 있다. 그러나, 형광기술과 laser system를 이용한 Flow cytometry방법은 단시간내에 세포의 여러 특성을 측정, 비교, 분석할 수 있으며, 특히 cell cycle의 변화를 측정하는데 매우 유용하다고 한다(Tobey, 1975).

이에 본 연구는 Flow cytometer를 이용하여 소의 난소에 존재하는 난포강 형성 이후의 가시난포를 그 크기별로 분류하여 난포성숙에 따른 과립막세포의 특성과 변화를 알아보고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 우 과립막세포의 준비

도축장으로부터 운반되어온 난소를 생리식염수로 세척한후, 난포의 크기를 각각 1~2mm(F4), 3~4mm(F3), 5~10mm(F2), 및 >10mm(F1)으로 구분하여 21 gauge 주사침이 부착된 주사기로 난포액을

흡인하였다. 난포액과 난포세포들로 부터 조직이나 세포덩어리를 제거하기 위해 흡인된 난포액은 pore size 약 200 μ m의 steel filter(Nalgene, USA)에 통과시켰고, 통과된 난포세포로부터 난포액을 제거하기 위해 PBS(Ca^{+2} , Mg^{+2} , free)로 세척하였다. Pellet 내의 혈액세포 제거를 위해 pellet은 4 $^{\circ}$ C 3차 증류수 300 μ l로 부유시켰고, 곧 바로 PBS로 희석시켜 혈액세포를 파괴시켰다. 파괴된 혈액세포와 난포세포의 debris를 제거하기 위해 40% percoll에서 2000rpm, 20분간 원심분리시켜 상층의 세포층만을 모은후 PBS로 percoll를 제거하였다. 모아진 과립막세포의 일부는 현미경(Zeiss, Germany) 관찰을 위해 PBS로 부유시켰고, 일부는 FCM분석을 위해 고정시켰다.

2. FCM 전처리과정(고정과 염색)

과립막의 고정과 염색과정은 Rao 등 (1991)의 방법을 수정하여 실시하였다. 난포의 크기별로 분리해낸 과립막세포는 최종농도가 1×10^6 cells/ml이 되도록 70% ice-cold ethanol(Et-OH/PBS)로 고정시켰고, 분석전까지 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 분석을 위해 세포는 PBS로 세척하므로써 고정액을 제거한 후 PBS 1 ml로 부유시키고, propidium iodide(PI, 1 mg/ml, Sigma USA) 20 μ l를 첨가하였다. 염색액이 첨가된 세포는 빛을 차단하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1~2시간 염색하였다. 염색이 끝난후 Flow Cytometer stream에 방해가 될 수 있는 세포덩어리를 제거하기위해 분석 직전, 50 μ m nylon filter(Nalgene, USA)를 통과시켜 단일세포부유액을 준비하였다.

3. Flow cytometry systems

본 실험에 사용된 Flow cytometer는 FACStar^{plus}(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain view CA, USA)로 488nm의 파장을 발산하는 laser(Coherent Innova 90 Argon-ion laser)를 갖추고 있다. 과립막의 단일세포 부유액은 먼저 forward angle light scatter(FSC)와 90 $^{\circ}$ light scatter(SSC)로 분석되며, 전자는 상대적인 세포의 크기를, 후자는 세포의 과립상태를 측정할 수 있다(Hatfield와 Hymer, 1986a, b). DNA양을 측정하기 위해 사용되는 형광시료인 PI는 488nm파장에서 발기하여 610nm의 파장으로 여기되는 형광물

질로써 형광을 발하는 강도에 따라 DNA양을 인지하였고, 610 nm파장만이 detector에서 감지되도록 578/28 band-pass filter를 장치하였다. Data는 2C-4C의 DNA만을 갖는 세포들을 모으며, cell cycle의 G₁ stage에 있는 Doublet cell은 fluorescence의 Area와 Width의 dot-plot에서 G₂/M 세포와 구분하여 분리하였고, Data 분석에서는 이를 제외시켰다 (Shapiro, 1988). 각 group에 대해 5,000개의 세포를 감지하고, Data 분석을 위해 CONSORT computer에 저장하였다. FSC와 SSC에 대한 정보들은 Becton Dickinson computer에 내장되어 있는 LYSIS™ II program에 의해 저장, 분석되었고, DNA양에 따른 cell cycle분포는 CellFIT™ program에 의해 분석되었다.

4. 통계처리

본 연구에서 얻어진 Cell cycle 분포에 대한 통계처리는 ANOVA 분석을 실시하였고, t-검정으로 난포간의 유의성을 검토하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 현미경적 관찰

F1(>10mm), F2(5~10mm), F3(3~4mm), F4(1~2mm)로 난포의 크기를 구분하여 얻어진 과립막 세포는 세포의 형태, 크기별 분포도와 group간의 크기 변화를 알아보기 위해 1차적으로 채취 직후 광학현미경으로 관찰을 실시하였다(Fig. 1). 각각의 난포로부터 분리해낸 과립막 세포는 대부분 둥근 형태로 세포 내부에는 많은 과립들이 존재하였다. 대부분의 세포들이 단일세포로 분리되어 있었으나, 일부는 작은 세포 덩어리를 이루며 응집되어 있었고, 세포들의 응집정도는 난포가 작아질수록 커지고, 난포가 커질수록 잘 분산되어 있었다. 한 group내에 존재하는 세포들은 그 크기가 불규칙적이었는데, 이러한 현상은 4 group 모두에서 관찰되고 그 정도는 F4에서 가장 많이 나타났으며, F1는 비교적 균일한 크기의 세포로 구성되어 있었다. 또한 group간에 나타난 세포크기의 차이는 난포의 크기가 커질수록 세포의 크기도 커졌는데, 이는 닭의 난포에서 보인 결과와 유사하였다(Marrone 등, 1990).

현미경적 관찰에서 한 group내에 세포의 크기가 불규칙한 것은 과립막세포 채취과정에서 하나의 난포만을 사용하지 않고 크기가 같은 여러 난포를 함께 채취하였기 때문에 난포에 따른 과립막세포의 차이이거나 atresia 난포가 존재하고 있을 수 있기 때문이라고 본다. 또한 F4 group의 경우는 계속적으로 세포분열과 분화를 하고 있어서 세포분열 과정중에 나타나는 세포 크기의 차이에서 기인할 수도 있다고 본다. 따라서 본 실험에 사용된 난소는 난포에 따른 차이나 atresia 난포의 존재가능성을 최소화 하기 위해 동일조건외의 난소와 난포를 사용하였다. 즉 난소는 성장기의 난포만을 얻기 위해 황체가 존재하지 않은 것으로 상태가 양호한 난소만을 선택하였고, 5mm이상의 큰난포는 그 수를 2~3개로 최소로 하고, 전체 난소의 수도 5~6개로 제한하여 다음 실험을 실시하였다.

2. FSC/SSC 분석

Debris와 doublet를 제거하고 세포주기의 동일한 상태의 세포만을 분석하고자 DNA분석 조건에 맞추어 parameter와 detector를 setting하였고, FSC와 SSC는 Cell cycle분석중 G₁ phase만을 Gating하여 측정하였다. Fig. 2. a,b의 histogram은 각각 세포들의 상대적인 세포크기를 나타내주는 것이다. 세포의 크기를 나타내는 FSC histogram(a)과 과립상태를 나타내는 SSC histogram(b)은 하나의 main peak를 나타내었고, SSC의 분포도가 FSC의 것보다 넓게 나타났다.

이러한 FSC/SSC의 결과는 Rat (Rao 등, 1991)의 연구에서 몇개의 peak를 나타낸 것과는 상반되었으나, Marron과 Crissman (1988)가 보고한 닭의 난포세포에서 보인 결과와는 유사하였다. 소 과립막세포의 FSC와 SSC가 단일 main peak만으로 나타난 것은 한 난포내에 존재하는 G₁ phase의 과립막세포는 그 크기나 과립정도에 있어서 비교적 균일하다는 것을 의미한다고 본다. 그러나, SSC는 FSC의 peak에 비해 그 분포도가 넓었는데, 이것은 과립막세포가 크기에 비해 그 과립상태에 있어서는 차이가 있다고 본다.

3. 난포크기에 따른 과립막세포의 Cell cycle 분석

Cell Cycle의 G₁에 있는 2개의 세포 (doublet)는 그 fluorescence intensity가 G₂ 세포의 intensity와 같게 된다. 따라서 보다 정확한 cell cycle분석을 위해

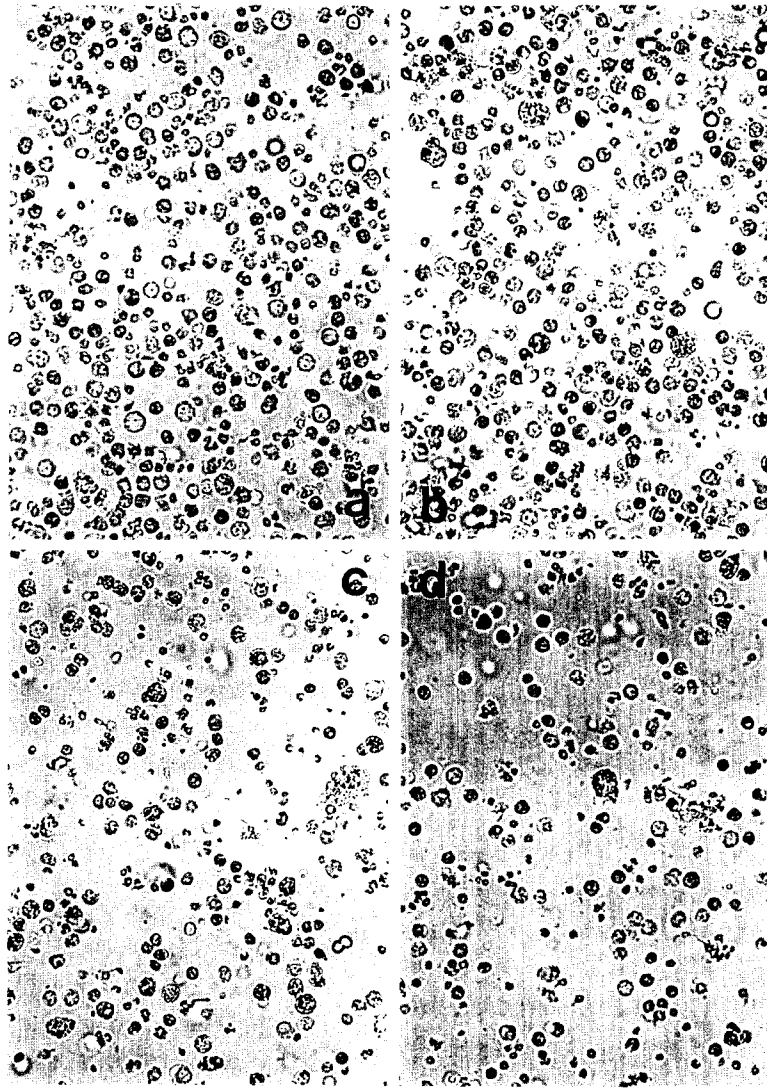


Fig. 1. Photomicrograph of bovine granulosa cells obtained from four different size of follicles. a: F1(≥ 10 mm) b: F2(5~10 mm) c: F3(3~4 mm) d: F4(1~2 mm). ($\times 200$)

서는 doublet와 G_2 세포의 signal을 분리해야 하는데, 이는 detector에서 감지되는 PI fluorescence의 Area (빛의 강도)와 Width (빛의 넓이)에 대한 signal을 모두 감지하여, 감지된 signal를 double-parameter(Fig. 3. b)로 나타낸 후 단일세포(G_1 , S, G_2)만을 Gating하고 Gating된 이외 부분은 Data 분석에서 삭제하였다.

과립막세포의 cell cycle분석에 의해 나타나는 전형

적인 분포는 Fig. 3. a에 제시한 바와 같으며, 4 Group의 cell population은 모두 G_0/G_1 , S, G_2/M phase가 존재하였다. 이와 같은 방법으로 난포크기에 따른 과립막세포의 cell cycle를 조사한 결과를 Fig. 4에 요약하였다.

난포가 성숙하는 동안 과립막세포의 세포분열은 그 분포에서 변화가 관찰되었는데, cell cycle의 proliferative phase인 S와 G_2/M 기에 있는 세포수는

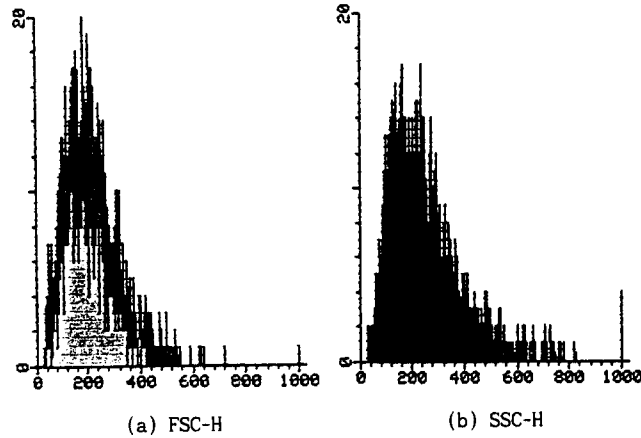


Fig. 2. Frequency distribution showing forward angle light scattering (a) and 90° light scatter (b) of pooled granulosa cells from F3 follicle(3~4 mm diameter). Only data from cells in the G₁ phase of the cell cycle are present.

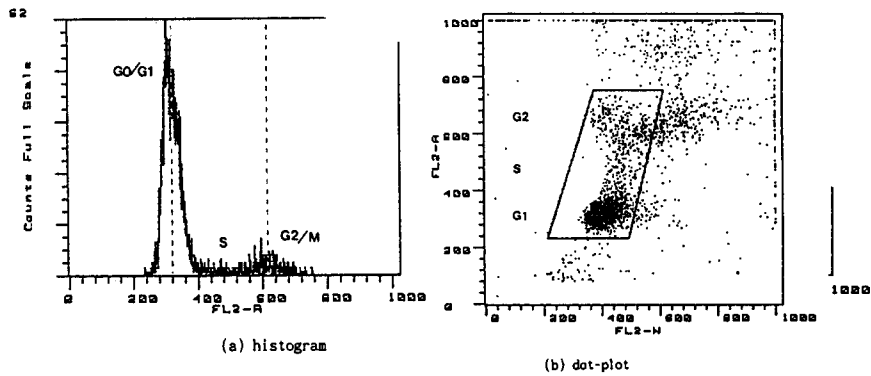


Fig. 3. Cell cycle analysis of granulosa cells from F3 follicle(3~4 mm diameter). Doublets of cells in the G₁ stage of the cell cycle were identified by their separation from G₂/M cells on a dot-plot of Area vs Width fluorescence and were gated out of the data analysis

난포의 크기가 커질수록 현저히 감소하였고 (Fig. 4. D), 상대적으로 G₁기의 세포수는 증가하였다. 이러한 소의 과립막세포의 cell cycle 변화를 닭에서 실시한 연구의 결과(Marron 과 Crissman, 1988)와 비교해 볼 때 그 변화 양상이 유사하였으나, 닭의 경우보다 F4와 F3에서 proliferative phase가 낮은 분포를 나타내었다. 이러한 차이는 닭에서는 크기와 발육단계가 명확한 하나의 난포에서 얻어진 균일한 과립막세포들을 분석하였고, 본 연구에서는 동일한 크기의 몇개 난포로부터 채취한 소 과립막세포들을 분석한데서 기인

한 것으로 사료된다. 따라서 명확한 발육단계의 소 난포로부터 얻어진 과립막세포들의 분석이 금후의 연구에서 검토되어야 한다고 본다.

IV. 적 요

본 연구는 소의 난소에 존재하는 난포강 형성 이후의 가시난포를 그 크기에 따라 각각 F1(>10mm), F2(5~10mm), F3(3~4mm) 및 F4(1~2mm)로 분류하여 난포성장애 따른 과립막세포의 변화와 한 난

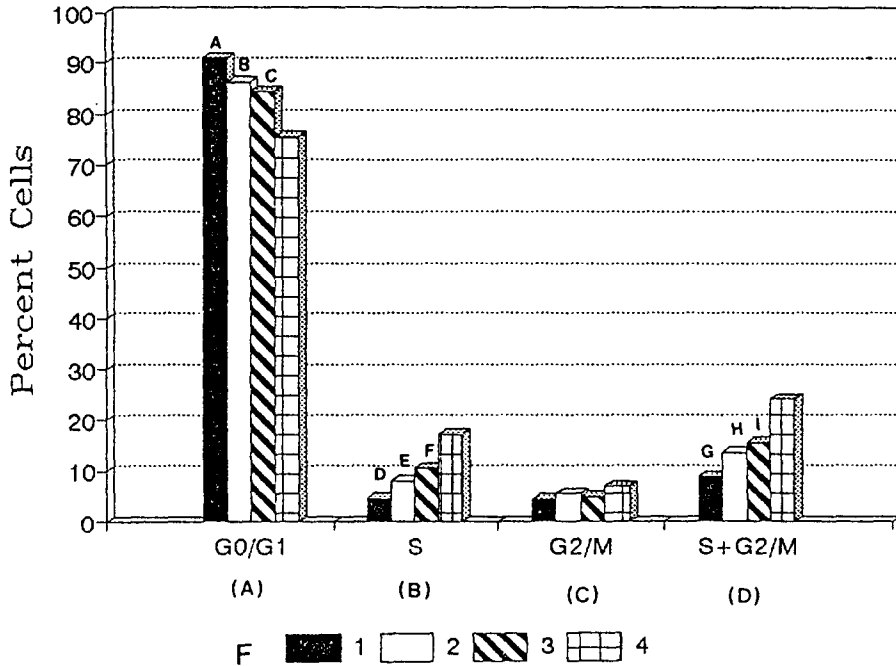


Fig. 4. Percentage of granulosa cells in each stage of the cell cycle as determined from DNA content histograms from flow cytometry analysis of cells stained with PI. Each bar represents the mean percentage \pm SEM from 5 experiments in which cells were prepared from follicles at each stage of follicular maturation (F1~F4).

^A $P < 0.05$ vs. F3-F4; ^B vs. F4; ^C vs. F4; ^D vs. F2-F4; ^E vs. F4; ^F vs. F4; ^G vs. F3-F4; ^H vs. F4; ^I vs. F4

포내에 존재하는 과립막세포의 특징을 규명하고자 실시하였다. 분석방법으로는 Flow cytometer를 이용하여 Forward angle light-scatter(FSC-세포크기 측정)와 90° light-scatter (SSC-과립상태 측정)의 분포도를 측정하였고, PI로 DNA를 염색하여 cell cycle의 변화를 분석하였다. 현미경적 관찰에서 과립막세포들은 대부분 둥근 형태로 세포내부에 많은 과립들이 존재하였다. group간에 나타난 세포크기의 차이는 난포의 크기가 커갈수록 과립막세포의 크기는 커졌다. FSC/SSC 분석 결과 한 난포내에 존재하는 G1 phase의 과립막세포는 그 크기나 과립정도에 있어서 비교적 균일하며, 세포의 과립상태 분포는 크기에 비해 그 차이가 크게 나타났다. 그리고, 과립막세포의 cell cycle분포는 4 group에서 G0/G1, S, G2/M phase가 모두 존재하였고, 난포의 크기가 커질수록 proliferative phase (S와 G2/M기)의 세포수는 현

저히 감소하였다. 따라서, 본 연구는 Flow cytometer를 이용하여 소의 난포성숙에 따른 과립막세포의 변화를 분석하였으며 그 결과, 과립막세포는 난포가 성숙하는 동안 proliferative phase의 세포수는 현저히 감소하고, G1 phase는 증가함을 알 수 있었다.

V. 인용문헌

1. Anderson, E. and D. F. Albertini. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.*, 71:680-686.
2. Brower, P. T. and R. M. Schultz. 1982. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocyte: Existence and

- possible nutritional role during oocyte growth. *Dev. Biol.*, 90:144-153.
3. Butcher, R. L. and D. Kirkpatrick-Keller. 1984. Patterns of follicular growth during the four-day estrus cycle of the rat. *Biol. Reprod.*, 31:280-286.
 4. Colonna, A. and F. Mangia. 1983. Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:797-803.
 5. Hadley, M. E. 1992. *Endocrinology: Hormones and Female Reproductive Physiology*. 3th Ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
 6. Hafez, E. S. E. 1987. *Reproduction in Farm Animals: Folliculogenesis, Egg Maturation and Ovulation*. 5th Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
 7. Hatfield, J. M. and W. C. Hymer. 1986a. Flow cytometric analysis and sorting of live male rat anterior pituitary cell types by forward angle and perpendicular light scatter. *Endocrinology*, 119:2670-2682.
 8. Hatfield, J. M. and W. C. Hymer. 1986b. Flow cytometric analysis and sorting of live female rat anterior pituitary cell types by forward angle and perpendicular light scatter. *Endocrinology*, 119:2683-2694.
 9. Heller, D. T. and R. M. Schultz. 1980. Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes: Metabolic cooperativity between the fully grown oocyte and cumulus cells. *J. Exp. Zool.*, 214:355-364.
 10. Heller, D. T., D. M. Cahill, and R. M. Schultz. 1981. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between follicle cells and growing mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 84:455-464.
 11. Marrone, B. L. and H. A. Crissman. 1988. Characterization of granulosa cell subpopulations from avian preovulatory follicles by multiparameter flow cytometry. *Endocrinology*, 122:651-685.
 12. Marrone B. L., M. Jamaluddin, and F. Hertelendy. 1990. Regional pattern of cell maturation and progesterone biosynthesis in the avian granulosa cell layer. *Biol. Reprod.*, 42:405-412.
 13. Ormerod, M. G. 1990. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
 14. Rao, I. M., A. R. Midgley, Jr., and J. S. Richards. 1978. Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, 14:71-76.
 15. Rao, I. M., W. C. Allsbrook, B. A. Conway, Jr., and J. E. Martinez. 1991. Flow cytometric analysis of granulosa cells from developing rat follicles. *J. Reprod. Fert.*, 91:521-530.
 16. Rao, I. M., T. M. Mills, E. Anderson, and V. B. Mahesh. 1991. Heterogeneity in granulosa cells of developing rat follicles. *Anat. Rec.*, 229:177-185.
 17. Shapiro, H. M. 1988. *Practical Flow Cytometry*, 2th Ed. Alan R. Liss, Inc., New York.
 18. Tobey, R. A. and H. A. Crissman. 1975. Unique techniques for cell cycle analysis utilizing mithramycin and Flow microfluorometry. *Exp. Cell Res.*, 93:235-239.