지방전구세포에서 지방세포의 분화과정의 전자현미경 관찰

한가형[1,2,3], 김수진[1,2,3], 박창현[4], 정혜선[4], 이상훈[1,2,3], 엄창섭[1,2,3]

[1]고려대학교 의과대학 해부학 교실, [2]고려대학교 두뇌한국 21 의과학사업단,

[3]고려대학교 동결폐조직은행, [4]고려대학교 의과대학 전자현미경실

줄기세포(stem cell)는 여러 세포로 분화될 수 있고 스스로 반복되어 자라는 능력을 가지고 있다. 분화 과정 중 어떤 요소들에 따라 최종적으로 하나의 특징만을 가지는 세포가 된다. 본 실험에서는 일차적으로 줄기세포인 지방전구세포(preadipocyte)에서 지방세포(adipocyte)로 분화하는 과정을 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM)으로 관찰하고 분화하면서 생기는 지방방울을 Oil-Red-O 염색을 이용해 확인하였다. 아울러, 이들 세포들이 통상적인 조건에서 고정이 잘 되지 않는 사실을 확인하고, 지방전구세포주인 3T3-L1을 사용하여 보다 적절한 고정 방법을 찾고자 하였다.

지방전구세포는 Sprague-Dawley계 흰쥐의 신장 주변 지방 조직에서 분리하였고, 3T3-L1 세포주는 ATCC에서 구입하여 10% FBS(fetal bovine serum)를 포함한 고정액(Dulbecco's modified medium, DMEM)으로 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

광학현미경 관찰을 위하여는 배양된 세포를 2.5% glutaraldehyde(pH7.4, 0.1M PB)로 고정한 후, 직접 혹은 Oil-Red-O 염색을 시행하여 관찰하였다. 이를 위하여 고정된 배양 세포를 1X PBS로 수세한 후 10% 중성포르마린(neutral buffered formalin)으로 15분간 고정하고, 0.5% Oil-red-O로 30분간 37℃에서 염색하였다.

전자현미경 관찰을 위하여는 통상적인 방법에 따라 2.5% glutaraldehyde(pH7.4, 0.1M PB)로 전고정하였다. 고정 조건을 잡기 위하여는 배양된 3T3-L1 세포를 1% glucose를 넣은 0.1M PB buffer, 0.09M PB, 0.1M PB, 0.12M PB buffer, 1X PBS buffer를 이용하여 만든 고정액으로 고정하고 분화를 관찰하기 위한 지방전구세포는 0.1M PB buffer를 사용하여 고정액을 만들었다. 고정된 세포는 1% osmium tetroxide로 후고정하고, 상승 농도의 알코홀로 탈수한 후 t-buthyl alcohol(TBA)로 치환하여 TBA 동결건조법으로 건조하였다. 건조된 조직은 platinum coating을 시행하여 S-4700 Hitachi FE SEM으로 3 혹은 15kV의 가속전압 하에서 관찰하였다.

지방전구세포는 분화 초기에 나선형, 둥근 모양의 세포가 배양접시 바닥에 부착되어 있었고, 세포질에서 한 두 개의 지방방울이 관찰되었다. 이들 세포는 점차 세포의 크기가 커졌다. 일정 시간 후에 이들 세포의 크기가 더 이상 커지지 않게 되면 세포질 내에 점차 지방방울의 수가 많아지고 크기가 커지면서 이웃하는 것과 합쳐져 점차 하나의 지방방울로 변화되었다. 성숙한 지방세포는 세포의 약 80% 정도가 지방방울을 포함하고 있었다.

본 실험을 통하여 줄기세포의 일종인 지방전구세포에서 지방세포로의 분화되는 과정을

형태적으로 관찰하였고, 다른 세포와 달리 주사전자현미경 표본 제작시 고정액의 조성이 달라져야 함을 확인하였다. 이러한 결과는 앞으로 지방세포의 분화 및 현재 관심이 되고 있는 이종분화(transdifferentiation)에 관한 연구의 기본 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

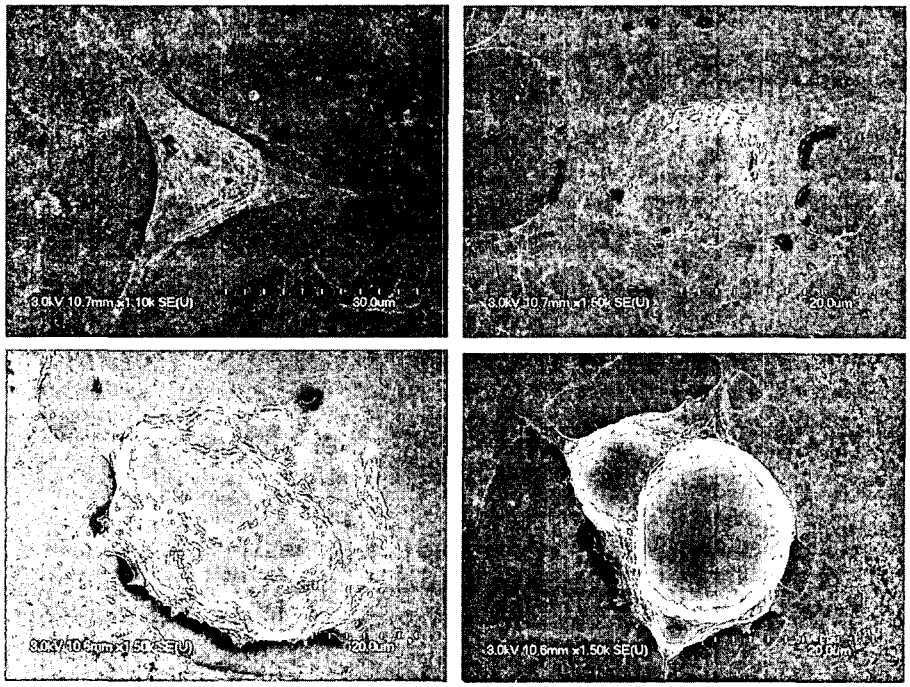

Fig. 1. Scanning electron micrographs of differentiating adipocytes.