

돼지 난소내 과립세포의 염색질이상응축과 여포액내 스테로이드호르몬의 농도 변화와의 상관관계

한양대학교 자연과학대학 생물학과

이창주 · 윤용달 · 김종흠 · 김문규

The Relationship Between the Pyknosis of Granulosa Cell and the Change of Steroid Concentration in Porcine Ovarian Follicles

Chang Joo Lee, Yong-Dal Yoon, Jong Heup Kim and Moon Kyoo Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT

In order to study the follicular atretic mechanism in mammalian ovary, the relationship between pyknotic index (PI) of granulosa cells and the steroid concentrations in the follicular fluid of atretic follicle was investigated.

Follicles were isolated from porcine ovary according to their sizes and the reproductive phases. Steroid concentrations were quantified by high-performance liquid chromatography.

As PI increased, the concentration of progesterone was significantly increased ($p < 0.05$), whereas testosterone and estradiol showed no significant changes in their concentration. As follicular size was increased, PI of follicular GC in the luteal phase was increased significantly ($p < 0.05$) and the molar ratio of progesterone to testosterone was increased in the follicles of follicular phase.

It can be concluded that progesterone accumulated in the follicular fluid as atresia of the follicles was progressed, and that PI of granulosa cells could be used as one of convenient and practical criteria for the identification of follicular atresia.

서 론

포유류 난소내 여포의 폐쇄(follicular atresia)는 형태적인 변화이전에 스테로이드 합성능의 변화가 먼저 일어난다고 알려져왔다(Bill and Greenwald, 1981).

형태적인 변화로서 과립세포의 염색질이상응축(pyknosis)은 여포의 폐쇄를 판정하는 주요 방법으로 이용되어지고 있으나(Braw et al., 1976; Hay et al., 1976; Hirshfield and Midgley, 1978; Carson et al., 1981), 최근 여포의 여러 성장단계 및 정상적인 여포에서도 찾아볼 수 있는 현상으로 보고 되고있다(Hay et al., 1976; Koering et al., 1982; Tsafirri and Braw, 1984;

Gurays, 1985). 또한 과립세포내 aromatase의 불활성화에 의하여 여포액내에 androgen, 특히 testosterone(T)과 androstenedione(A)이 축적되는 것이 여포폐쇄의 주된 요인으로 작용한다고 보고되고 있다(Harman et al., 1975; Haney and Schomberg, 1978; Moor et al., 1978; Carson et al., 1981; Tsafirri and Braw, 1984; Tsonis et al., 1984). 그러나 형태학적 변화와 스테로이드 합성능간의 관계는 아직도 초기연구 단계에 있다.

한편 여포가 폐쇄되는 현상은 난소내의 황체의 유무, 즉 생식주기에 따라 그 폐쇄화의 기작이 상이할 것으로 보고된바 있다(Lee and Yoon, 1985; Kim et al., 1987). 그리고 progesterone이 androgen으로 전환하는 데에 관여하는 효소

의 작용변화(Braw and Tsafiriri, 1980a) 및 뇌하수체 호르몬수용체의 농도감소(Richards and Midgley, 1976; Uilenbroek and Richards, 1979; Uilenbroek et al., 1980; Chang et al., 1986) 등도 난소내 여포의 폐쇄원인으로 간주되고 있다.

본 연구는 폐쇄를 판정하는 두가지 지표, 즉 여포내 과립세포의 염색질이상응축정도와 여포액내 스테로이드 호르몬농도사이의 상관관계를 알아보고자 시행되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료

서울 마장동의 도살장(우성농역)에서 채취한 돼지난소를 4°C의 얼음 상자에 넣어 30분내로 실험실로 운반하였다. 4°C의 냉장상태에서 황체의 존재유무별로 난소를 구분하고 예리한 핀셋을 사용하여 여포를 분리한 후 크기를 측정하고(대, large, L, 6mm 이상; 중, medium, M, 4-5.9mm; 소, Small, S, 3.9mm 이하) 부피를 측정하였다.

분리된 여포는 시험관(Pyrex, 12×75mm) 내에서 기계적으로 터트린 후 300-500 μ l의 NaCl (0.154 M)을 첨가하여 과립세포가 일정하게 퍼지도록 가볍게 교반 하였다. 여기에서 20 μ l를 취해 slide 위에 도발하여 공기건조시킨 후 0.5% toluidine blue O (Merck)로 상온에서 15분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 과립세포의 염색질이상응축지수(pyknotic index, PI)는 Braw와 Tsafiriri(1980b)의 방법을 응용하여 정상대 응축세포의 수를 세어 PI를 계산하였다(No. of pyknotic cell/No. of normal cell × 100).

2. HPLC 작동조건

HPLC (DuPont, 8800 series)는 Gradient Controller, Pump, Injector, Column oven, UV detector 및 Recorder를 사용하였다. 분리용 column은 Zorbax CN(4.6mm in i.d.×25cm in length, 6.8 μ m)을 사용하였으며, 이동상은 50% acetonitril(Tedia, HPLC grade), 48% H₂O (Millipore, pure water) 그리고 2% methanol (Merck)을 분당 1.5ml의 속도로 흘려 40°C에서 스테로이드를 분리하였다. 분리된 스테로이드는 0.05 AUFS의 sensitivity로 254nm의 UV하에서 검출하였다.

Progesterone(P4), testosterone(T), 및 estro-

diol(E₂)의 표준 스테로이드 호르몬(Sigma)의 stock solution은 90%의 ethanol (Merck)로 mg/ml의 농도가 되게끔 조제하여 보관하였으며 이를 적당한 농도로 희석하여 working solution으로 사용하였다.

3. 통계검정

PI와 스테로이드호르몬의 농도와의 상관관계는 최소자승법(Least square method)으로 구하였으며, 각군과의 통계적인 차이는 Student's t test로 비교, P 값이 0.05 보다 작은 경우를

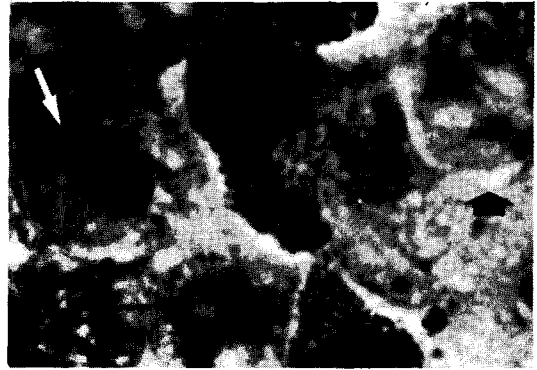


Fig. 1. Photograph of porcine granulosa cells smeared on a microscopic slide. The cells were stained with 0.5% toluidine blue O. Note that the various intact cells showed as the features of normal(open arrow), mitotic(white arrow) and pyknotic cell (black arrow).

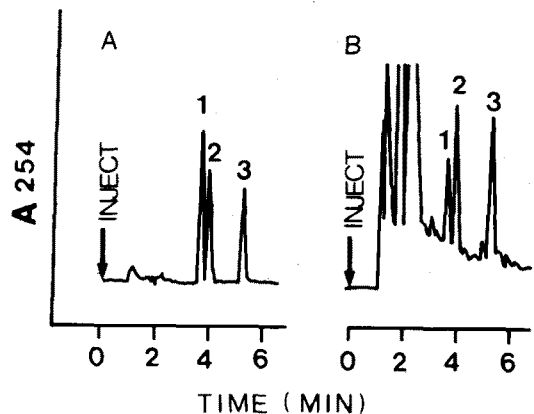


Fig. 2. Chromatograms of three steroid hormones separated by HPLC. A. Chromatogram of a standard mixture of steroid hormones. B. Chromatogram of steroid hormones extracted from porcine ovarian follicular fluid. Peak identity; 1, testosterone; 2, estradiol; 3, progesterone. Attenuation lengths represent 0.001 AUFS detected at 254 nm under UV light.

Table 1. Relationship of the concentration of various steroid hormones(y, ng/ml) in the porcine follicular fluids to the pyknotic indices(x, %) of granulosa cells

Group No	Least square equation	R	P value
P4 NCL 49	$y=176.69+3.65x$	0.419	$p<0.005$
CL 22	$y=189.80+0.03x$	-0.008	NS
T NCL 48	$y=33.22-0.10x$	-0.165	NS
CL 22	$y=40.07-0.08x$	-0.198	NS
E2 NCL 47	$y=25.58-0.08x$	-0.170	NS
CL 22	$y=32.03-0.06x$	-0.190	NS

Abbreviations are as follows : P4, progesterone ; T, testosterone ; E2, estradiol ; NCL, follicles in follicular phases ; CL, follicles in luteal phases ; NS, non-significant ; R, correlation of coefficient ; P, probability

Table 2. Relationship between the concentration (y, ng/ml) of various steroid hormones in the porcine ovarian follicular fluids and the size of follicles (x, mm)

Group No	Least square equation	R	P value
P4 NCL 49	$y=505.19-48.56x$	-0.355	$p<0.05$
CL 22	$y=337.76-42.31x$	-0.211	NS
T NCL 48	$y=46.60-3.05x$	-0.326	$p<0.05$
CL 22	$y=66.27-8.44x$	-0.392	$p<0.1$
E2 NCL 47	$y=32.38-1.80x$	-0.250	$p<0.05$
CL 22	$y=52.72-6.71x$	-0.363	$p<0.05$

Abbreviations are explained in Table 1

유의하다고 보았다.

결 과

PI를 측정하기 위해 과립세포를 도말염색한 결과를 Fig. 1로 나타내었다. HPLC의 용출양상은 Fig. 2와 같았다. 각 스테로이드의 retention time은 testosterone이 3.63 ± 0.12 분, estradiol이 3.94 ± 0.05 분, 그리고 progesterone이 5.27 ± 0.12 분으로 나타났다. 스테로이드 표준시료의 농도 (ng/ml, y)와 peak area(mm, x)의 관계는 P4의 경우 $y=1.06x-3.22$ ($r=0.976$), T의 경우 $y=0.05x+9.58$ ($r=0.998$) 그리고 E2가 $y=0.05x+8.09$ ($r=0.987$)로 나타났다.

RIA결과 (x)와 HPLC의 결과 (y)와의 상관관계는 progesterone의 경우 $y=0.89x+4.53$ ($r=0.984$) testosterone의 경우 $y=0.99x+0.285$ ($r=0.998$), 그리고 estradiol은 $y=0.95x+0.04$

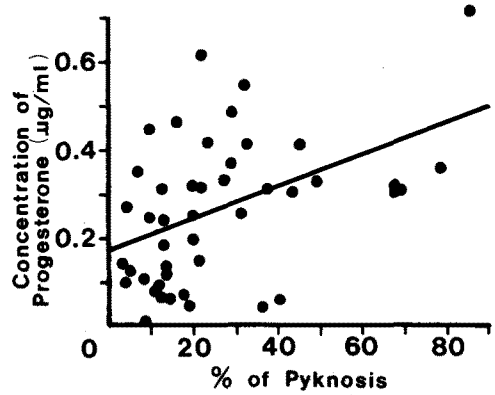


Fig. 3. Relationship of the concentration of progesterone (y, ng/ml) to the pyknotic % (x) of granulosa cells. Linear regression equation is $y=176.69+3.65x$, and correlation of coefficient (r) is 0.419 ($n=49$, $p<0.005$).

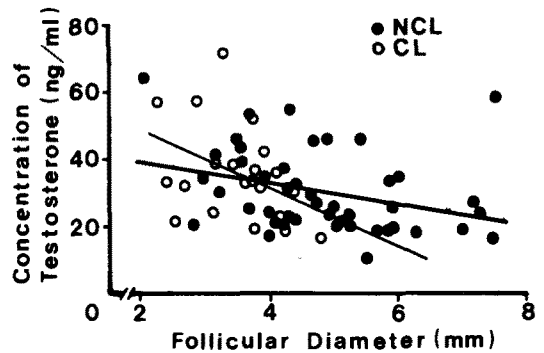


Fig. 4. Relationship of testosterone concentration (ng/ml, y) to follicle diameter (mm, x). Linear regression equation of NCL and CL group is $y=46.60-3.05x$ ($r=-0.326$, $n=48$, $p<0.05$) and $y=66.27-8.44x$ ($r=-0.392$, $n=22$, $p<0.1$) respectively.

($r=0.987$)을 보였다.

여포액내 존재하는 스테로이드호르몬의 농도와 과립세포의 염색질 이상응축지수와의 관계 (Table 1)를 보면 황체가 없는 난소내 여포액에 존재하는 progesterone의 농도만이 PI가 증가함에 따라 현저히 ($p<0.005$) 증가하는 결과를 보였으나 (Fig. 3), 반면 testosterone과 estradiol의 농도는 PI의 증가에 대해 통계적으로 유의하지 않은 결과를 나타냈다.

또한 여포의 크기와 각 스테로이드의 농도사이의 상관관계를 보면 (Table 2) 황체가 있는 경우의 progesterone의 농도를 제외하고 모든 스테로이드의 농도가 여포크기가 증가함에 대해 황체의 존재 유무에 무관하게 감소하였고

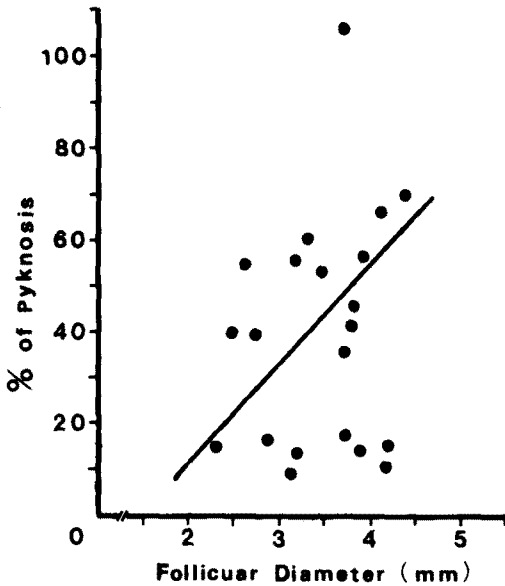


Fig. 5. Relationship between pyknotic index (% , y) and follicular diameter of luteal follicles (mm, x). Linear regression equation is $y = -33.32 + 22.28x$ ($r = 0.412$, $n = 22$, $p < 0.05$).

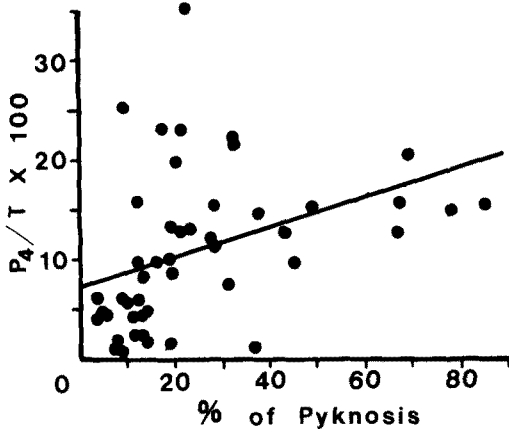


Fig. 6. Relationship between the molar ratio of progesterone to testosterone ($P_4/T \times 100$, y) and pyknotic index (% , x) of follicular phases follicles. Linear regression equation is $y = 7.07 + 0.15x$ ($r = 0.392$, $n = 48$, $p < 0.01$).

($p < 0.05$), 황체가 있는 난소의 여포액내 testosterone의 농도는 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 4).

여포의 크기에 대한 PI의 관계(Table 3, Fig. 5)를 보면 황체가 있는 경우에만 여포의 크기에 대해 유의성있게($p < 0.05$) PI가 증가하는 결과를 얻었다. Progesterone이 testosterone으로 전환되는 비율($P_4/T \times 100$)은 황체가 없는 난소내 여포의 경우에서만이 유의성있게 PI가 높아질

Table 3. Relationship between the follicular size in porcine ovaries (\bar{x} , mm) and the pyknotic indices of granulosa cells (y, %) of the same follicles

Group	No	Least square equation	R	P value
NCL	49	$y = 39.66 - 2.98x$	-0.189	NS
CL	22	$y = -33.32 + 22.28x$	0.412	$p < 0.05$

Abbreviations are explained in Table 1

Table 4. Relationship between the pyknotic indices (x, %) of granulosa cells and the molar ratio of progesterone to testosterone ($P_4/T \times 100$) in the follicular fluid of the pig ovary

Group	No	Least square equation	R	P value
NCL	48	$y = 7.07 + 0.15x$	0.392	$p < 0.01$
CL	22	$y = 3.98 + 0.46x$	0.295	$p < 0.1$

Abbreviations are explained in Table 1

수록 증가($P < 0.01$) 하는 결과를 보였다(Table 4, Fig. 6).

논 의

포유류 난소내 여포의 폐쇄원인은 뇌하수체호르몬의 작용에 대한 과립세포의 수용체수의 감소(Richards and Midgley, 1976; Uilenbroek and Richards, 1979; Uilenbroek et al., 1980; Chang et al., 1986)와 여포내 steroidogenesis 등의 변화(Hsueh et al., 1983; Lee and Yoon, 1985)등이 알려져 있다.

과립세포의 염색질이상응축은 여포의 폐쇄를 판정하는 주요방법으로 이용되어왔다. 한편 여포액내의 스테로이드 호르몬의 농도가 주로 과립세포와 theca층에 존재하는 효소들의 활성도에 의해 영향받아짐(Braw and Tsafiriri, 1980b)으로 여포액내에 androgen이 축적되면 여포는 폐쇄하게 된다고 보고되어왔다(Harman et al., 1975; Haney and Schomberg, 1978; Hillier and Ross, 1979; Tsafiriri and Braw, 1984; Lee and Yoon, 1985). 그러나 이들 상호관계에 대해서는 체계적인 연구가 없었다. 이러한 이유는 여포자체의 형태적, 조직학적 연구와 생리, 생화학적 분석연구가 동시에 이루어지기 어려운 점 때문으로 인식되고 있다. 그러나 본 연구에서와 같이 대동물의 여포를 연구재료로 사용함으로써

이들의 상호관계의 연구도 가능하다고 판단된다.

여포가 폐쇄됨에 따라 과립세포는 steroidogenic 한 미세구조를 갖는데(Schwall and Erickson, 1981), 난소 황체가 존재하는 경우(luteal phase)에는 이러한 현상이 관찰되지않아 난소내 황체의 존재유무에 의해서도 여포폐쇄의 기작이 상이할 것으로 보고된 바 있다(Kim et al., 1987). 본 실험의 결과 여포내 과립세포의 염색질 이상응축지수(pyknotic index, PI)와 스테로이드의 농도 사이의 상관관계에서 PI가 높아짐에 대해 증가를 보였다. 이는 황체가 존재하지않은 여포성숙기의 여포내 theca층에서 분비되는 progesterone이 과립세포에서 androgen으로 전환이 되지 않기 때문으로 여겨진다. 또한 progesterone만이 증가한 것은 폐쇄여포의 주요 분비 스테로이드가 progesterone 이라는 보고(Moor et al., 1978 ; Braw and Tsafiriri, 1980b ; Terranova, 1980, 1981 ; Terranova et al., 1982 ; Braw et al., 1981)와 일치되어진다. 본 결과에서도 생식주기(sexual cycle)에 따라 각여포의 폐쇄기작이 다르다는 가설을 확인하였다.

여포의 크기와 스테로이드의 농도관계에서 황체기여포의 여포액내 progesterone 및 estradiol 이 모두 감소한다는 보고(Peluso et al., 1980)로 보아 여포크기의 증가에 따른 농도의 감소와 폐쇄에 따른 농도의 감소가 서로 연관이 있다고는 볼 수 없고 단지의 여포의 크기가 커짐에 의해 상대적으로 농도가 감소한 결과가 온 것으로 여겨진다.

크기와 PI의 관계를 보면 여포의 크기증가에 대해 과립세포의 PI는 황체가 있는 난소내 여포의 경우 정상여포의 배란이 이미 일어난 황체가 되면서 progesterone을 활발하게 분비하게 되고 이로 인해 상대적으로 인접한 큰 여포의 폐쇄가 유발되었기 때문으로 사료된다.

Progesterone이 testosterone으로 전환되는 molar ratio의 경우 황체가 없는 난소내 여포는 PI가 증가함에 따라 유의하게 증가($p < 0.01$)한 결과를 보였고, 황체기여포의 경우 증가의 경향성을 보였는데 난소내 황체의 유무에 따라서 3β -hydroxysteroid dehydrogenase의 활성의 차이가 생긴다고 여겨지며 그 결과 PI가 증가함에 따라 progesterone이 testosterone으로의 전환이 감소한다고 여겨진다.

이상의 결과로 보아 여포폐쇄의 판정에 있어 과립세포의 염색질이상응축의 정도를 측정하는

것이 매우 편리하고 실제적인 방법이라는 결론을 얻었다. 그러나 이러한 염색질이상응축현상이 뇌하수체호르몬의 수용체 수의 농도감소에 의해 여포내 micromillieu 내의 어떠한 변화에 의해 일어나는지에 관하여는 더욱 연구가 진행되어져야 할 것이다.

REFERENCES

- Bill, C.H. and Greenwald, G.S. : *Acute gonadotropin deprivation. I. A model for the study of follicular atresia. Biol. Reprod.* 24 : 913-921, 1981.
- Braw, R.H., Byskov, A.G., Peters, H. and Faber, M. : *Follicular atresia in the infant human ovary. J. Reprod. Fert.* 46 : 55-59, 1976.
- Braw, R.H. and Tsafiriri, A. : *Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. J. Reprod. Fert.* 59 : 259-265, 1980a.
- Braw, R.H. and Tsafiriri, A. : *Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. J. Reprod. Fert.* 59 : 267-272, 1980b.
- Braw, R.H., Bar-Ami, S. and Tsafiriri, A. : *Effect of hypophysectomy on atresia of rat preovulatory follicles. Biol. Reprod.* 25 : 989-996, 1981.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Clarke, I.J. and Burger, H.G. : *Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. Biol. Reprod.* 24 : 105-113, 1981.
- Chang, C.S., Lee, C.J., Yoon, Y.D. and Kim, M.K. : *Changes of hCG binding capacity on the granulosa cells of porcine ovary during follicular atresia. Kor. J. Fert. Steril.* 13 : 29-38, 1986.
- Guraya, S.S. : *Follicular atresia. In : Biology of Ovarian Follicles in Mammals. Springer-Verlag, pp 227-275, 1985.*
- Haney, A.F. and Schomberg, D.W. : *Steroid modulation of progesterone secretion by granulosa cells from large porcine follicles : A role for androgens and estrogens in controlling steroidogenesis. Biol. Reprod.* 19 : 242-248, 1978.

- Harman, S.M., Cran, D.G. and Moor, R.M. : *Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia. Endocrinology* 96 : 1145-1152, 1975.
- Hay, M.F., Cran, D.G. and Moor, R.M. : *Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. Cell Tissue Res.* 169 : 515-529, 1976.
- Hillier, S.G. and Ross, G.T. : *Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature rats. Biol. Reprod.* 20 : 261-268, 1979.
- Hirshfield, A.N. and Midgley, A.R., Jr. : *Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol. Reprod.* 19 : 597-605, 1978.
- Hsueh, A.J.W., Jones, P.B.C., Adashi, E.Y., Wang, C., Zhuang, L.Z. and Welsh, T.H. Jr. : *Intraovarian mechanism in the hormonal control of granulosa cell differentiation in the rats. J. Reprod. Fert.* 69 : 325-342, 1983.
- Kim, M.K., Lee, Y.H., Kim, J.H. and Yoon, Y.D. : *A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia. Kor. J. Zool.* 30 : 351-370, 1987.
- Koering, M.J., Goodman, A.L., Williams, R.F. and Hodgen, G.D. : *Granulosa cell pyknosis in the dominant follicle of monkeys. Fertil. Steril.* 37 : 837-844, 1982.
- Lee, Y.K. and Yoon, Y.D. : *Changes of the concentrations of steroid hormones in the porcine follicular fluids on atresia. Kor. J. Fertil. Steril.* 12 : 83-98, 1985.
- Moor, R.M., Hay, M.F., Dott, H.M. and Cran, D.C. : *Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. J. Endocr.* 77 : 309-318, 1978.
- Peluso, J.J., Charlesworth, E.C., Bolender D.L. and Stegar, R.W. : *Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia. Cell Tissue Res.* 211 : 105-115, 1980.
- Richards, J.S. and Midgley, A.R. Jr. : *Protein hormone action : A key to understanding ovarian follicular and luteal development. Biol. Reprod.* 14 : 82-94, 1976.
- Schwall, R. and Erickson, G.F. : *Functional and morphological changes in rat theca cells during atresia. In : Dynamics of Ovarian Function. Schwartz, N.B. and M. Hunzicker-Dunn eds. Raven Press, New York, pp 29-34, 1981.*
- Terranova, P.F. : *Effect of phenobarbital-induced ovulatory delay on the follicular population and serum levels of steroids and gonadotropins in the hamster : A model for atresia. Biol. Reprod.* 23 : 93-99, 1980.
- Terranova, P.F. : *Steroidogenesis in experimentally induced atretic follicles of the hamster : A shift from estradiol to progesterone synthesis. Endocrinology* 108 : 1885-1890, 1981.
- Terranova, P.F., Martin, N.C. and Chien, S. : *Theca is the source of progesterone in experimentally induced atretic follicles of the hamster. Biol. Reprod.* 26 : 721-727, 1982.
- Tsafiriri, A. and Braw, R.H. : *Experimental approaches to atresia in mammals. An offprint from Oxford Review of Reproductive Biology, vol. 6, Oxford Univ. Press, pp 206-265, 1984.*
- Tsonis, C.G., Carson, R.S. and Findlay, J.K. : *Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 β and testosterone concentrations, and diameter and atresia of individual ovine follicles. J. Reprod. Fert.* 72 : 153-163, 1984.
- Uilenbroek, J. Th, J. and Richards, J.S. : *Ovarian follicular development during the rat estrous cycle : Gonadotropin receptors and follicular responsiveness. Biol. Reprod.* 20 : 1159-1165, 1979.
- Uilenbroek, J. Th, J. and Richards, J.S. : *Ovarian follicular development during the rat estrous cycle : Gonadotropin receptors and follicular responsiveness. Biol. Reprod.* 20 : 1159-1165, 1979.