

생쥐 난소의 β -Endorphin에 대한 면역조직화학적 동정

조사선 · 이영기* · 김경진* · 윤용달** · 이정주* · 조완규*

서울대학교 의과대학 해부학교실, 자연대학 동물학과* 및 한양대학교 자연과학대학 생물학과**

면역조직화학적 방법을 이용하여 생쥐 난소에서 β -endorphin이 생성되는 부위를 조사하기 위하여 본 실험을 행하였다. 성숙한 생쥐를 4% neutral buffered paraformaldehyde로 관류고정하였으며 난소를 적출한 후 cryostat로 절편을 만들어 avidin-biotin complex (ABC)를 이용하여 면역염색을 하였다. β -endorphin에 대한 항체반응은 주로 황체에서 일어났으며, theca interna와 theca externa에서는 반응이 나타나지 않았다. 황체에서의 염색 양상은 퇴화가 많이 진행된 황체세포에서 보다 강한 염색반응을 관찰할 수 있었다. 때로 황체세포에서 유래된 것으로 보이는 간질세포에서도 양성반응을 관찰할 수 있었다. 이외에도 large antral follicle의 여포강에 인접한 과립세포에서 약한 반응을 보여주었으나, 제 1차 여포나 제 2차 여포에서는 양성반응이 나타나지 않았다.

KEY WORDS: Immunohistochemistry, β -endorphin, Mouse ovary, Corpus luteum

최근 고등동물의 난소에서 oxytocin, vasopressin, relaxin, inhibin, gonadotropin-releasing hormone (GnRH)등의 다양한 생물학적 활성물질이 존재한다는 사실이 밝혀짐에 따라서 이러한 물질들이 생식소의 주요 기능인 스테로이드 합성 (steroidogenesis)과 생식세포 형성 (gametogenesis)에 관련되어 autocrine 혹은 paracrine역할을 할 것으로 추측되고 있다(O'Byrne *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1981; Wathes and Swann, 1982; Wathes *et al.*, 1983; Park *et al.*, 1988).

생식소에서 생성되어 국부적 조절인자로 작용할 것으로 생각되어지는 이러한 물질들 중에서, β -endorphin은 전구물질인 proopiomelanocortin (POMC)으로부터 분리되는 31개의 아미노산으로 이루어져 있으며 뇌하수체의 전엽, 중엽 이외에도 뇌, 태반, 위장관, 췌장 등에서도 합성된다는 것이 이미 밝혀진 바 있다(Liotta *et al.*, 1980a, 1980b; Ferule *et al.*, 1980; Larson, 1981). 특히 뇌와 뇌하수체에서 β -endorphin이 생성된다는 사실이 밝혀진 이후 그 기능에 대해 많은 연구가

진행되었다. β -endorphin은 시상하부조직에서는 GnRH 분비조절에 관여하며 뇌사수체에서도 생식소자극호르몬 분비에 영향을 미침이 알려졌다(Cicero *et al.*, 1979; Blank *et al.*, 1979; Ieiri *et al.*, 1980; Wilkes and Yen, 1981; Sylvester *et al.*, 1982; Resmussen *et al.*, 1983).

한편 양(Lim *et al.*, 1983), 생쥐(Shaha *et al.*, 1984), 흰쥐(Lolait *et al.*, 1985), 사람(Aleem *et al.*, 1986)등의 난소 추출물에서 β -endorphin이 검출된다는 것이 알려졌으나 이들 조직내에서의 β -endorphin의 분포와 기능에 관해서는 별로 알려진 바 없다.

따라서 본 실험은 면역조직화학적 방법을 이용하여 생쥐 난소의 특정 세포형에서 β -endorphin의 발현, 분포를 밝히고자 수행되었다.

재료 및 방법

실험동물 및 조직처리

본 실험에 사용된 생쥐는 서울대학교 동물사육장에서 일정한 조명조건(14시간 조명, 10시간 소

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학육성연구비의 지원에 의한 것임.

등)에서 사육된 체중 30g 내외의 성숙한 Balb/c 계 암컷이었다. 생쥐를 ethyl ether (Junsei)로 흡입마취시킨 후 흉곽을 절개하여 심장을 노출시킨 후 좌심실을 통하여 생리식염수와 4% neutral buffered paraformaldehyde 고정액을 관류시켰다. 그 다음 난소를 적출하여 4시간 동안 온실에서 고정액으로 후고정을 한 후, 20% sucrose 용액에 12시간 동안 침적시켰다. OCT compounds에 포매하여 동결시키고 cryostat로 8 μ m 두께의 절편을 만들어 gelatin coated slide에 부착시켰다.

면역조직화학 염색

조직이 부착된 슬라이드를 0.02M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 10분씩 2회 세척한 다음, 내인성 peroxidase를 억제하기 위하여 3% H₂O₂로 10분간 처리하고 PBS로 10분씩 2회 세척하였다. 또한 비특이성 반응을 제거하기 위해 정상염소혈청(normal goat serum)을 40분 동안 처리하였다. 그다음 여분의 정상염소의 혈청을 티슈케이퍼로 제거한 후 흡착한 β -endorphin (양)에 대한 토끼항원(BioGenex)을 500배로 희석하여 50 μ l를 조직절편 위에 얹고 슈윙상자 속에 넣어서 12시간 동안 4°C에서 반응시켰다.

제1항체와 반응시킨 조직은 PBS로 2회 10분씩 세척한 다음, 제2항체와 ABC 복합물을 Hsu 등 (1981)의 방법에 따라서 반응시켰다. 즉 제2항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (BioGenex)로 1시간 동안 실온에서 반응시키고 나서 PBS로 10분씩 2회 세척한 다음, Streptavidin labelled peroxidase (ABC complex, BioGenex)로 1시간 동안 반응시켰다. 그후 다시 PBS로 10분씩 2회 세척하고 기질액에 넣어 갈색의 침전물을 관찰하였다. 이때 사용한 기질액은 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) 35mg을 50ml의 PBS에 포화시켰으며, 정색반응 직전에 H₂O₂를 0.01%가 되도록 첨가하여 5분 동안 반응시켰다.

광학현미경으로 조직에서 갈색의 양성반응이 나타난 것을 확인한 후 alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화를 하고 permount (Polysciences)로 봉입하였으며, 일부 조직은 hematoxylin으로 핵염색을 한 후, 같은 방법으로 봉입하고 광학현미

경으로 관찰하였다.

결과

대조염색 반응

음성대조군(negative control)으로서 생쥐 간을 이용한 면역염색에서는 갈색의 양성반응이 나타나지 않았으며, 본 실험에서 사용한 β -endorphin에 대한 항체 대신 PBS로 대체한 생쥐 난소의 면역염색에서도 황체세포와 과립세포 및 난자에서 양성반응이 나타나지 않았다(Figs. 1, 2 and 3). 또한 양성대조군(positive control)으로서 생쥐 뇌하수체를 이용한 면역염색에서는 뇌하수체의 전엽과 중엽에 강력한 양성반응을 보여주었다(Fig. 4).

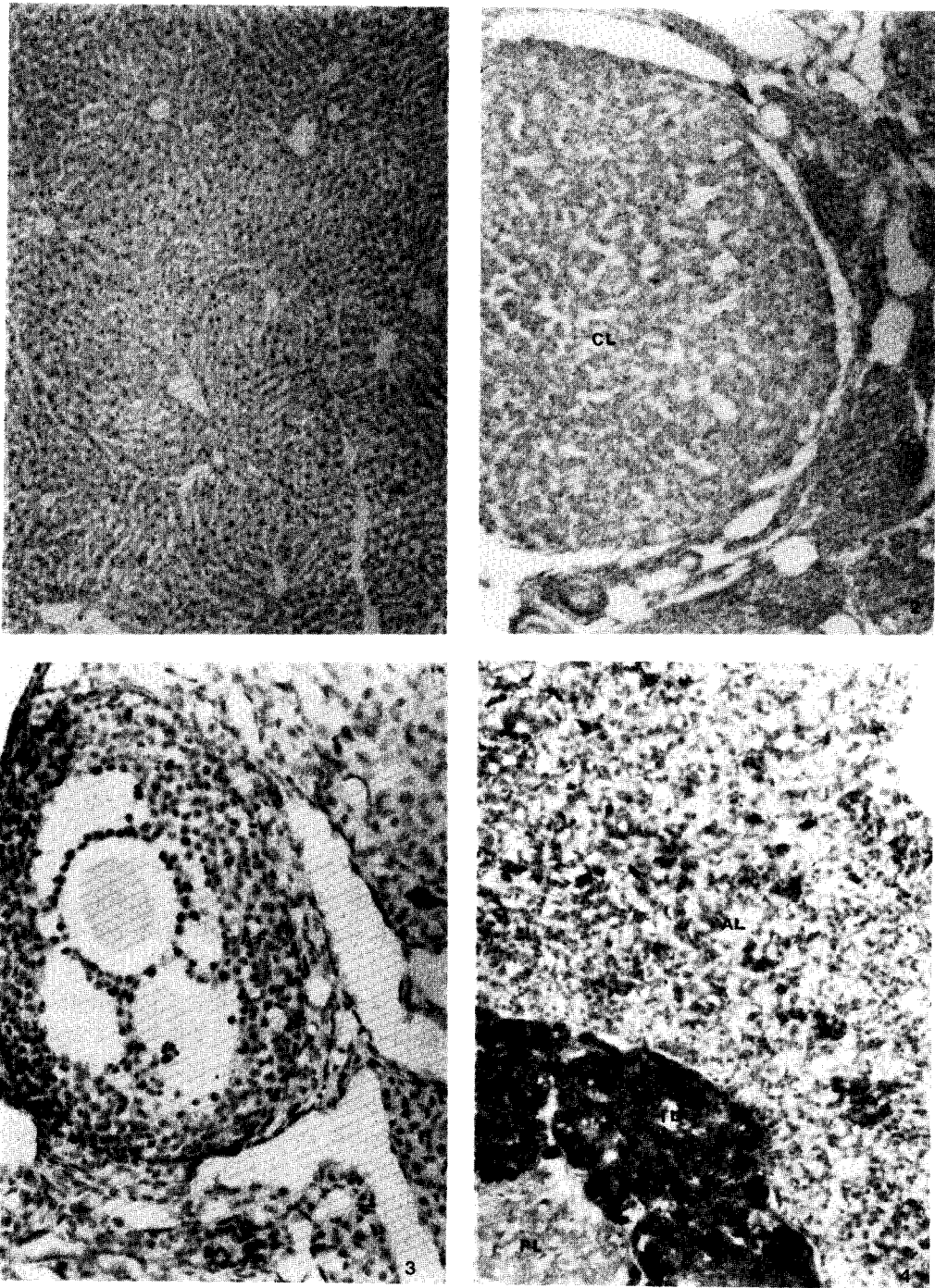
따라서 본 실험에서 사용한 염색방법과 β -endorphin에 대한 항체는 생쥐 β -endorphin의 항원결정부위(antigenic determinants)에 대해 면역특이성을 나타냈다.

난소에서의 β -endorphin에 대한 염색반응

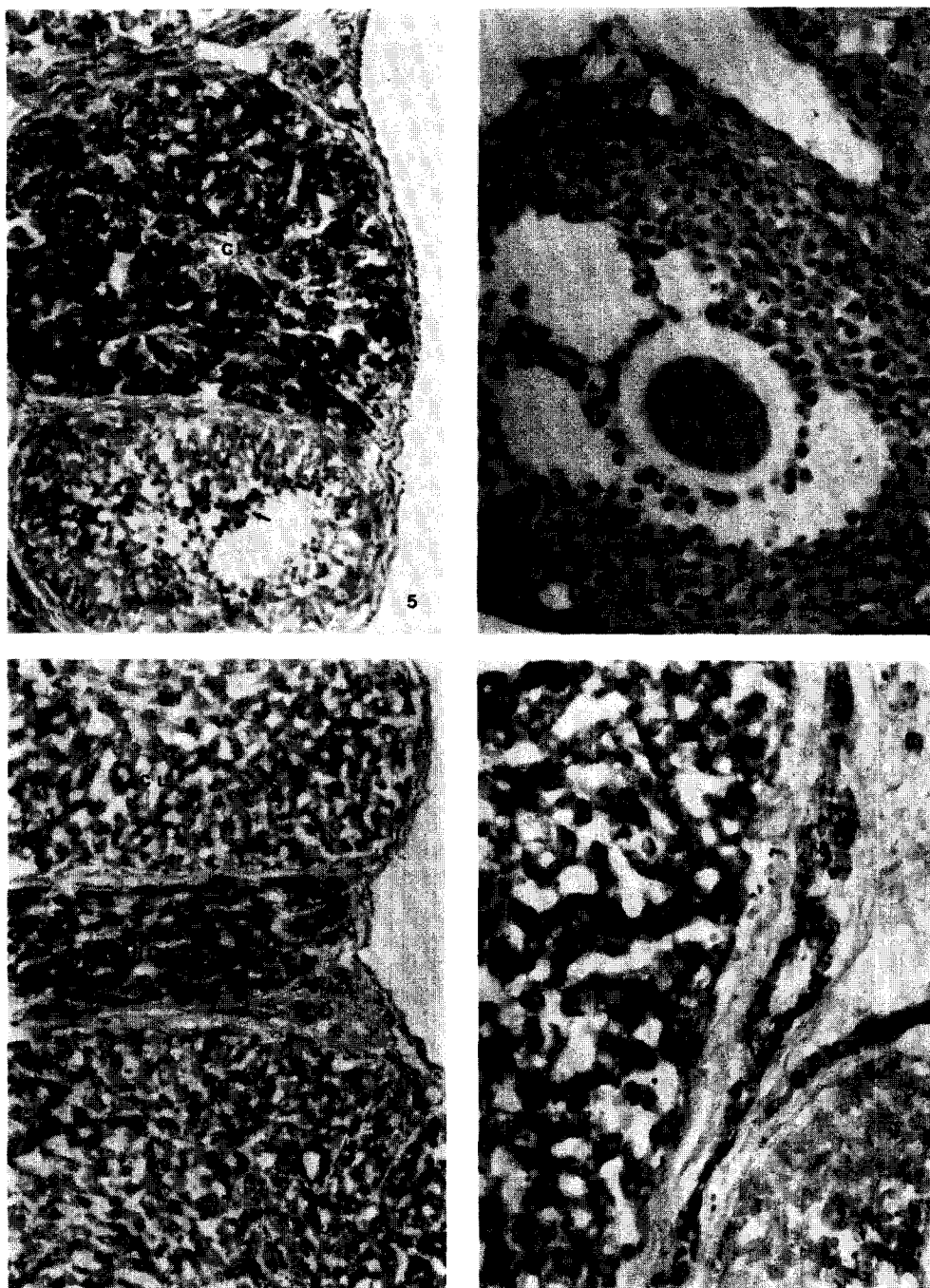
제1차 여포나 제2차 여포에서는 양성반응을 전혀 보여주지 않았으며, large antral follicle에서도 역시 양성반응이 나타나지 않았으나, 여포강(follicular antrum)에 접한 과립세포에서 약한 갈색의 침전을 보여주었다(Fig. 5). 또한 antral follicle안의 난자에서도 양성반응이 나타났다(Fig. 6). 황체세포에서는 전체적으로 강력한 양성반응의 갈색 염색을 보여주었으나 theca interna와 theca externa에서는 양성반응이 나타나지 않았으며, 퇴화가 보다 많이 진행된 백체(corpus albicans)에서 보다 강력한 염색반응을 보여주었다(Figs. 5 and 7). 또한 간질세포(interstitial cell)에서 강한 염색반응을 보여주었는데, 이 세포들은 황체세포가 퇴화됨으로써 유래된 세포로 사료된다(Fig. 8).

고찰

본 연구는 면역조직화학적 염색방법을 이용하



Figs. 1-4. Immunohistochemical staining of the control sections of the mouse tissues. Note that there is no immunoreaction product in the negative control sections of liver (Fig. 1), corpus luteum (CL in Fig. 2), and antral follicle (AF, in Fig. 3) which replaced the primary antisera with buffer constituents. There are positive immunostaining in the intermediate lobe (IL) and anterior lobe (AL), but no reaction product in the posterior lobe (PL) of the positive control section of pituitary (Fig. 4). $\times 125$.



Figs. 5-8. β -endorphin immunostainable cells of the mouse ovary.

Luteal cells of the corpus luteum (CL, in Figs. 5, 7 and 8) have immunoreactive granules in their cytoplasm and cells of regressing corpus luteum (RCL, in Fig. 7) show more strong immunostaining than those of large corpus luteum. Note that there are weak-to-moderate positive immunostaining of oocyte in the antral follicle (Fig. 6) and weak immunostainable cells (arrows, in Figs. 5 and 8) lining the antral cavity of the large antral follicle. Interstitial cells (IC) are also positively stained (Fig. 8). $\times 125$.

여 다양한 세포들로 구성되어 있는 생쥐 난소에서 β -endorphin의 소체를 규명하기 위해 수행하였다. β -endorphin에 대한 면역조직화학적 염색이 난소내의 황체세포에서 주로 나타난 것은 이미 보고된 결과(Shaha *et al.*, 1984; LoLait *et al.*, 1985; Aleem *et al.*, 1986)와 일치하며, 본 연구에서는 배란 직후 생긴 크기가 큰 황체세포에서보다도 퇴화가 진행된 황체세포 즉 백체(corpus albicans)에서 보다 강력한 염색반응을 보여주었다. 한편 제 1 차 여포나 제 2 차 여포 그리고 large antral follicle에서는 염색반응을 보이지 않았는데 이러한 결과는 Lim *et al.* (1983)이 보고한 배양중인 양의 과립세포에서 β -endorphin이 생성된다는 사실을 고려해 볼 때, 황체화세포에서만 β -endorphin을 생성하는 것으로 추측된다. 이를 규명하기 위해서는 황체화되기 이전의 과립세포를 채취배양하면서 인위적으로 황체화과정을 유도한 후 배양시대별로 조사하는 연구가 중요하리라 사료된다.

한편 oxytocin, vasopressin, inhibin, GnRH, 등의 물질이 난소에서 생성된다는 일련의 보고(Schwartz, 1982)는 난소의 생리적 현상에 대한 새로운 고찰을 하게 하였다.

따라서 본 연구에서 보여준 생쥐 난소에서 β -endorphin이 존재한다는 사실은 난소의 주요기능인 생식세포 형성(gametogenesis)과 스테로이드 합성(steroidogenesis)에 관련하여 β -endorphin이 autocrine 혹은 paracrine하게 난소내의 생리조절기능을 담당하고 있으리라 추측된다. 또한 β -endorphin이 여포형성과정(folliculogenesis) 중에서 황체형성에 관여하고 그 내분비적기능을 조절할 가능성도 아울러 시사된다.

β -endorphin의 세포내 신호전달기작에 관해서 β -endorphin이 thymocyte에 있어서 Ca^{++} 의 유입을 증가시키며(Hemmick and Bidlack, 1987), 돼지의 소뇌에서 추출된 cyclic nucleotide phosphodiesterase의 칼슘의존성-활성화를 저해한다고 알려졌다(Giedroc *et al.*, 1985). 그리고 흰쥐의 proestrus시기에 β -endorphin이 가장 많이 분비된다는 보고(Wolf *et al.*, 1986)와 난자성숙 과정에서 Ca^{++} 와 cAMP의 역할(Cho *et al.*, 1974; Tsafirri and Bar-Ami, 1978)등을 고려해 볼 때,

β -endorphin이 난자성숙에 간접적으로나마 영향을 줄 수 있는 난소내 국부조절인자라고 추정된다.

인용문헌

- Aleem, F. A., R. A. Omar, and G. H. Eltabbkh, 1986. Immunoreactive β -endorphin in human ovaries. *Fertil. Steril.* **45**:597-551.
- Blank, M. S., A. E. Panerai, and H. E. Friesen, 1979. Opioid peptides modulate luteinizing hormone secretion during sexual maturation. *Science* **203**: 1129-1131.
- Cho, W. K., S. Stern, and J. D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **187**:383-386.
- Cicero, T. J., B. A. Schainker, and E. R. Meyer, 1979. Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis and testosterone's negative feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology* **104**:1286-1291.
- Ferule, G. E., V. Weber, and V. Helmstaedter, 1980. Corticotropin-like substances in human gastric antrum and pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**:1656-1662.
- Giedroc, D. P., T. M. Keravis, J. V. Staros, N. Ling, J. N. Wells, and D. Puett, 1985. Functional properties of covalent β -endorphin peptide/calmodulin complexes: chlorpromazine binding and phosphodiesterase activation. *Biochemistry* **24**:1203-1211.
- Hemmick, L. M. and J. M. Bidlack, 1987. β -endorphin modulation of mitogen-stimulated calcium uptake by the rat thymocytes. *Life Sci.* **41**:1971-1978.
- Hsu, S., L. Raine, and H. L. Fanger, 1981. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique. *J. Histochem. Cytochem.* **29**:557-580.
- Ieiri, T., G. A. Campbell, and J. Meites, 1980. Effect of naloxone and morphine on the progesterone surge of prolactin and gonadotropin in the rat. *Endocrinology* **106**:1568-1570.
- Larson L-I., 1981. Adrenocorticotropin-like and α -melanotropin-like peptides in a subpopulation of human gastrin cell granules: bioassay, immunoassay and immunocytochemical evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2990-2994.
- Lee, V. W. K., J. M. McMaster, H. Quigg, J. Findlay, and L. Leversha, 1981. Ovarian and peripheral blood inhibin concentrations increase with gonadotropin treatment in immature rats. *Endocrinology* **108**:2403-2405.

- Lim, A. T., S. J. Lolait, J. W. Barlow, O. W. Sum, I. Zois, B. H. Toh, and J. W. Inder, 1983. Immunoreactive β -endorphin in the sheep ovary. *Nature* **303**:709-711.
- Liotta, A. S., C. Loudes, J. F. Mckelvy, and D. T. Krieger, 1980a. Biosynthesis of precursor corticotropin/endorphin-, corticotropin-, α -melanotropin-, β -lipotropin-, and β -endorphin-like material by cultured neonatal rat hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1880-1884.
- Liotta, A. S. and D. T. Krieger, 1980b. In vitro biosynthesis and comparative posttranslational processing of immunoreactive precursor corticotropin/ β -endorphin by human placental and pituitary cells. *Endocrinology* **106**:1504-1511.
- Lolait, S. J., D. J. Autelitano, A. T. W. Lim, A. I. Smith, B. H. Toh, and J. W. Funder, 1985. Ovarian immunoreactive β -endorphin and estrous cycle in the rat. *Endocrinology* **117**:161-168.
- O'Byrne, E. M., J. F. Flitcrafts, W. K. Sawyer, J. Hochman, J. Weiss, and B. G. Steinetz, 1978. Relaxin bioactivity and immunoactivity in human corpora lutea. *Endocrinology* **102**:1641-1644.
- Park, Y., B. J. Lee, K. Kim, and W. K. Cho, 1988. Identification of GnRh mRNA in the rat gonad. *The 8th International Congress of Endocrinology*, Kyoto, Japan, Abst. No. 03-19-048.
- Rasmussen, D. D., K. H. Liu, P. L. Wolf, and S. S. C. Yen, 1983. Endogenous opioid regulation of gonadotropin-releasing hormone release from the human fetal hypothalamus *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**:881-884.
- Schwartz, N. B., 1982. Novel peptides in ovarian fluid: implications for contraceptive development. *Res. Front. Fertil. Regul.* **2**:1-13.
- Shaha, C., A. Margioris, A. S. Liotta, D. T. Krieger, and C. W. Bardin, 1984. Demonstration of immunoreactive β -endorphin and γ 3-melanocyte-stimulating hormone-related peptides in the ovaries of neonatal, cyclic and pregnant mice. *Endocrinology* **115**:378-384.
- Sylvester, P. W., C. A. Van Vugut, E. A. Aylsworth, E. A. Hanson, and J. Meites, 1982. Effect of morphine and naloxone on inhibition by ovarian hormone of pulsatile release of LH in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. **34**:269-273.
- Tsafiri, A., and S. Bar-Ami, 1978. Role of divalent cations in the resumption of the meiosis of rat oocytes. *J. Exp. Zool.* **205**:293-300.
- Wathes, D. C., and R. W. Swann, 1982. Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature* **297**:225-227.
- Wathes, D. C., R. W. Swann, S. D. Birkett, D. G. Porter, and B. T. Pickering, 1983. Characterization of oxytocin, vasopressin and neurophysin from the bovine corpus luteum. *Endocrinology* **113**:693-698.
- Wilkes, M. N. and S. S. C. Yen, 1981. Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci.* **28**:2355-2359.
- Wolf, R., A. Meiner-Fleitmann, E. M. Duker, and W. Wuttke, 1986. Intra-ovarian secretion of catecholamines, oxytocin, beta-endorphin and gamma-aminobutyric-acid in freely moving rats: development of a push-pull tubing method. *Biol. Reprod.* **35**:599-607.

(Accepted January 30, 1990)

Immunohistochemical Identification of β -Endorphin in the Mouse Ovary

Sa Sun Cho*, Young Ki Lee*, Kyungjin Kim*, Yong Dal Yoon**, Chung Choo Lee* and Wan Kyoo Cho (Department of Anatomy, College of Medicine and Department of Zoology*, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742; and Department of Biology**, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791)

The present study, using immunohistochemical procedure, was carried out to determine the localization of immunostainable β -endorphin cells in the mouse ovarian tissues. Mature female mice were perfused with 4% neutral buffered paraformaldehyde under anesthesia and then frozen-sections were immunostained with anti β -endorphin antiserum according to ABC technique. Immunoreactive β -endorphin was found in the luteal cells of corpus lutea, but not in the thecal cells. More strong immunostaining signals were observed in large corpus luteum, in particular, the regressing luteal cells. Primary and secondary follicles did not show any immunoreactivity of β -endorphin, but granulosa cells lining the antral cavity of large antral follicles contained immunoreactive β -endorphin.