

돼지 난포내 Acid Phosphatase의 활성부위와 활성도

김종흡 · 이창주 · 윤현수 · 윤용달 · 김문규

한양대학교 자연과학대학 생물학과

돼지 난포의 폐쇄기작을 규명하고 폐쇄난포의 판정기준을 보완, 확립하기 위하여 난포의 크기 및 상태 그리고 난소주기에 따라 Acid phosphatase(ACPase)의 활성부위와 활성도를 조사하였다.

ACPase의 활성부위는 과립세포와 난포막내층이었고, 반응정도는 난포기의 대난포와 중난포의 경우 정상군에 비해 폐쇄군에서 강한 반응을 보였다. 황체기난포의 과립세포에서는 중난포와 소난포 모두 반응이 미약하였고, 난포막층에서는 정상군과 폐쇄군 모두 강하게 나타났다. ACPase의 활성도는 난포기 난포의 과립세포에서 난포가 커짐에 따라 증가하였는데 난포막층의 활성도는 감소하였으며, 폐쇄군이 높은 활성도를 보였다. 황체기의 경우 난포기와는 달리 과립세포와 난포막층에서 난포가 커짐에 따라 활성도는 감소하였으나 폐쇄군은 역시 높았다.

이상의 결과에서 폐쇄난포의 ACPase의 활성부위와 활성도는 정상난포에 비하여 뚜렷하고 강하여서 이 방법은 폐쇄의 판정기준으로 이용 가능한 것으로 사료된다. 또한 난소주기에 따라 상이한 결과를 나타낸 것은 폐쇄기작이 서로 다름을 시사하였다.

KEY WORDS: Acid phosphatase, Theca layer, Granulosa cell, Atresia

포유류의 난포는 생식소자극호르몬(gonadotropin)에 의하여 성장, 성숙하여 배란한다. 그러나 난포들 중 일부만이 배란하고 다른것은 폐쇄난포(atretic follicle)로 되어 난자를 배란하지 않는다(Ingram, 1962). 폐쇄난포의 세포-조직학적 특징은 난자 투명대의 불규칙한 형태, 난자-난구세포의 난포액내 부유와 퇴화, 과립세포의 난포액내 부유와 핵응축(pyknosis), 그리고 난포막층의 이상비대와 섬유질화등으로 알려지고 있다(Wallach and Noriega, 1970; Byskov, 1974; Ryan, 1981; Tsafiri and Braw, 1984).

한편 흰쥐의 폐쇄난포에서 이상비대한 난포막층은 강한 alkaline phosphatase의 활성을 보이며, 스테로이드 생합성에 관련된 효소의 활성을 나타낸다고 하였으며(Guraya, 1985, review), 과립세포의 autophagic vacuole이 acid phosphatase(ACPase)의 활성부위라는 보고가 있다(Elfont *et al.*, 1977). Adams 등(1966)은 guinea pig에서 난포막층이 결합조직으로 변하는 과정에서 약한 ACPase의 활성이 나타난다고 하였다.

본 연구실에서는 돼지의 난소주기에 따라 폐쇄난포의 전자현미경적 미세구조가 다른 것을 관찰하였고(Kim *et al.*, 1987), 또한 난포액내에서도 상이한 단백질들(114 KD, 141 KD)이 존재한다는 것을 밝힌 바 있으며(Yoon *et al.*, 1990), 이로 보아 황체의 유무에 따라 폐쇄기작이 다를 것으로 짐작된다. 그러나 난소주기에 따른 phosphatase 활성부위와 활성도에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 난포의 성장에 따른 과립세포와 난포막층의 ACPase의 활성부위와 활성도를 알아봄으로써 폐쇄난포의 판정기준으로의 이용가능성을 조사하고 폐쇄기작을 밝히기 위한 기초 자료를 얻고자 행하였다.

본 연구는 1990년도 분교부 기초과학육성연구비의 지원에 의한 것임.

재료 및 방법

돼지의 난소를 도살장(서울 마장동, 우성농역(주))에서 얻어 얼음상자(4°C)에 넣어 실험실로 운반한 즉시 황체가 없는 난소내 난포를 난포기(follicular phase), 황체가 있는 난소의 난포를 황체기(luteal phase)로 구분하였다.

각각의 난포를 낱개로 적출하여 소난포(직경 3 mm 이하, S), 중난포(4-6 mm, M) 그리고 대난포(7 mm 이상, L)로 분류하였다. 적출한 난포는 급냉동(-70°C)시킨 후 일부를 냉동절편기(Histostat AO, Model 855)를 사용하여 8 μ m의 두께로 잘라 일부 절편은 hematoxylin-eosin으로 염색하여 과립세포의 핵응축정도, 난포막층의 섬유화와 비대화 등으로 정상과 폐쇄를 판정하였다. 그리고 나머지 절편은 Gomori의 방법(1941)을 사용하여 ACPase의 활성부위를 조사하였다. 즉 절편을 0.05 M Veronal acetate 완충용액(pH 5.0)에 2% MgCl₂, 2% β -glycerophosphate와 2% Pb(NO₃)₂를 포함하는 반응액에서 90분간 반응시켰다. 반응 후 동일 완충용액으로 세척하고 1%(NH₄)₂S로 발색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

한편, 난포의 일부분을 잘라내고 남은 조직에서 과립세포와 난포막층을 분리하여 homogenizer와 sonicator로 분쇄한 후 Ernst의 방법(1972)을 변용하여 ACPase의 활성도를 측정하였다. 즉, 반응액은 0.1 M acetate 완충용액(pH 5.0)에 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM SrCl₂로 5 mM ρ -nitrophenyl phosphate(ρ -NPP)를 포함하는 용액 1 ml에 조직현탁액 1 ml를 넣어 30분간 반응시켰다. 37.5% trichloroacetic acid(TCA) 1 ml로 반응을 정지시키고, 효소활성에 의한 분해산물인 ρ -NP를 2N NaOH 2 ml로 재발색시킨 후, 800 g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액은 위와 동일조건하에서 일련농도의 ρ -NP(Sigma) 용액을 표준삼아 분광광도계(spectrophotometer, Shimadzu, UV-150-02)를 사용하여 파장 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 조직내 단백질은 Lowry 등의 방법(1951)에 따라

bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 표준단백질로 삼아 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

측정된 효소의 활성도(μ moles ρ -NP/mg protein/minute)에 대한 유의성 검정은 Student's *t*-test를 하였으며 $p < 0.05$ 를 유의성 있다고 판정하였다.

결과

Acid phosphatase 활성부위

난포의 절편을 hematoxylin-eosin으로 염색하여 고른 배열의 과립세포층과 잘 발달된 난포막층 등으로 정상난포를 판정하였으며(Fig. 1) 과립세포의 50% 이상 핵응축이 일어났으며 난포막층이 섬유화되어 있는 난포를 폐쇄난포로 판정하였다(Fig. 2).

난포기의 경우 과립세포는 정상난포에서 활성을 거의 보이지 않았으나(Figs. 3 and 5), 폐쇄중난포에서 약한 활성을, 대난포에서는 강한 활성을 보였다(Figs. 4 and 6). 황체기의 경우 과립세포는 대체로 매우 약한 활성을 보였으며, 난포의 크기와는 관계 없이 정상난포에 비해 폐쇄난포에서 약간 강한 활성을 보였으나 큰 차이는 없었다. 다만 황체기의 난포에서는 난포기의 경우보다 강한 활성을 보였다(Figs. 7 and 8).

한편, 난포막층은 일반적으로 난포막내층(theca interna)에서 활성을 보였다. 난포기의 경우 정상난포에서 활성이 거의 보이지 않았으나 폐쇄난포에서는 약한 활성을 보였으며, 황체기의 경우 정상난포와 폐쇄난포에서 모두 강한 활성을 보였다(Figs. 7 and 8).

Acid phosphatase 활성도

과립세포와 난포막층에서 ACPase의 활성도(μ moles ρ -NP/mg protein/minute)는 Table 1, 2에 나타내었다. 과립세포의 활성도는 Table 1에서 보듯이 난포기의 경우, 정상난포에서 평균 4.99-6.75의 범위로써 크기에 따라 유의한 차이가 없었으나 폐쇄난포에서는 소, 중, 대난포에서 각각 평균 4.82, 8.83, 12.93으로 나타나 난포의

Table 1. Acid phosphatase activity of granulosa cells according to the follicle size, the phase of ovarian cycle, and the follicle state of the porcine ovary.

Phase of ovarian cycle	Follicle state	Follicle size (diameter)		
		small (3 mm <)	Medium (4 - 6 mm)	Large (7 mm >)
Follicular	Normal	4.99 ± 0.11	5.53 ± 1.04 (a)(a), *	6.75 ± 0.44
	Atretic	4.82 ± 0.22	8.83 ± 0.69	12.93 ± 1.35
Luteal	Normal	## 14.13 ± 1.20	(a)(a) 5.02 ± 0.92	-
	Atretic	##, * 19.62 ± 1.35	(a)(a) 6.07 ± 0.75	-

Mean ± SE (μ moles p-NP/mg protein/minute), n = 5

Significancy of follicle size; (a): p < 0.05, (a)(a): p < 0.01, cyclic phase; #: p < 0.05, ##: p < 0.01, state; *: p < 0.05, **: p < 0.01.

Table 2. Acid phosphatase activity of theca layer according to the follicle size, the phase of ovarian cycle, and the follicle state in the porcine ovary.

Phase of ovarian cycle	Follicle state	Follicle size (diameter)		
		Small (3 mm <)	Medium (4 - 6 mm)	Large (7 mm >)
Follicular	Normal	17.14 ± 1.77	(a)(a) 7.21 ± 0.78	7.38 ± 0.61
	Atretic	16.07 ± 3.28	(a), ** 11.82 ± 1.69	(a)(a) 7.20 ± 0.82
Luteal	Normal	18.60 ± 1.80	(a), ## 15.16 ± 1.17	-
	Atretic	#, * 22.27 ± 1.96	(a), # 15.73 ± 2.01	-

Mean ± SE (μ moles p-NP/mg protein/minute), n = 5

Significancy of follicle size; (a): p < 0.05, (a)(a): p < 0.01, cyclic phase; #: p < 0.05, ##: p < 0.01, state; *: p < 0.05, **: p < 0.01.

크기가 커짐에 따라 활성도가 유의하게(p < 0.01) 증가하였다. 황체기의 경우, 소난포의 과립 세포는 정상과 폐쇄에 관계 없이 높은 활성도(각각 평균 14.13, 19.62)를 나타냈으며, 중난포들의 활성도(각각 평균 5.02, 6.07)는 난포기에서 중난포의 경우와 거의 같았다.

한편 난포막층의 활성도는 Table 2에 나타내었다. 난포기의 경우, 정상 소난포에서 높은 활성도(17.14)를 나타내다가 중, 대난포에서는 각각 평균 7.21과 7.38로 활성도가 1/2이하로 감소되었

다. 폐쇄 소, 중난포들에서는 높은 활성도(각각 평균 16.07, 11.82)를 나타내었으나 대난포에서의 활성도(평균 7.20)는 정상 대난포에서와 거의 같았다. 황체기의 경우, 폐쇄여부나 크기와 관계 없이 모든 난포의 난포막층은 높은 활성도(평균 15.16-22.27)를 나타내었는데 정상 소난포보다는 폐쇄 소난포에서, 중난포보다는 소난포에서 더 높은 활성도를 나타내는 경향을 보였으나 통계적으로 유의성은 없었다. 또한 황체기의 경우는 난포기에 비하여 난포상태(state)나 크기에 관계 없

이 높은 활성도를 나타내었다. 특히 난포기 정상 중난포 난포막층의 활성도는 평균 7.21인데 비하여 황체기 정상 중난포의 경우 평균 15.16로서 2배로 높았다.

고 찰

난포내 ACPase의 활성부위에 따른 활성도는 과립세포내에 폐쇄와 관련된 autophagic vacuole에서 강하게 나타난다는 보고가 있어(Elfont *et al.*, 1977) 폐쇄난포의 판정기준의 증거로 제시되어 왔다(Ryan, 1981; Tsafiriri and Braw, 1984; Guraya, 1985, review; Sadrkhanloo *et al.*, 1987).

난포기 소난포의 과립세포에서는 활성정도가 매우 약하여 그 차이를 구분할 수 없으므로 정상과 폐쇄를 구분할 수 없었다. 쥐에서 정상군에 비하여 폐쇄군의 과립세포에서 강한 활성을 나타냈다는 Sadrkhanloo 등(1987)의 보고와, guinea pig에서는 오히려 정상군의 활성이 강하다는 Adams 등(1966)의 보고가 있었으며, 돼지의 경우는 소난포에서 거의 같은 활성을 보인 것으로 보아 종에 따라 활성정도가 다른 것을 알 수 있다. 난포막층의 경우 정상군에 비하여 폐쇄군의 난포에서 강한 활성을 보였는데, 폐쇄난포내 난포막 세포는 과립세포와 같이 지질과립을 포함하는 steroidogenic 세포라는 보고가 있어(Schwall and Erickson, 1981) 효소의 활성정도가 난포막내층에 강하다는 본 실험의 결과와 일치하였다.

황체기난포의 경우 ACPase의 활성부위는 정상군과 폐쇄군의 난포막내층과 정상군의 강소와 겹쳐 있는 과립세포에서 활성을 보였는데 이는 난포기 경우와는 다른 양상이었다. 과립세포의 경우 보편적으로 정상군과 폐쇄군 모두 약한 활성을 나타내어 서로 구분이 모호하여 활성정도로는 판정기준으로의 이용 가능성이 없는 것으로 사료된다. 난포막층의 경우, 폐쇄난포의 난포막내층에 강한 활성을 보였는데 이는 세포가 steroidogenic form으로 변화했기 때문이라 사료된다.

ACPase의 활성도는 난포기난포의 경우, 과립세포의 활성도는 대난포 및 중난포에서 폐쇄군이

정상군보다 유의성 있게 높았는데 이는 과립세포내 ACPase의 활성은 난포의 크기가 커짐에 따라 lysosomal 효소가 축적되어 활성도가 증가한 것으로 사료된다. 소난포에서는 활성도가 거의 같아 아직 폐쇄와 연관성이 있는 autophagic vacuole이 생성되지 않은 것으로 사료된다. 크기에 따라 활성정도가 다른 과립세포의 autophagic vacuole에 효소의 분포양상이 다름을 시사한다(Byskov, 1974; Richard, 1980; Guraya, 1985, review). 이는 폐쇄의 시기가 일정하지 않고 폐쇄가 시작되는 부위도 불확실하다는 것을 암시한다. 난포막층의 활성도는 난포기 폐쇄군의 중난포에서는 활성이 높아 폐쇄의 판정기준으로써 이용이 가능하나 대난포와 소난포에서는 활성도에 차이가 없어 폐쇄의 증거로 삼을 수 없었다. 난포의 크기가 커짐에 따라 과립세포와 달리 활성도가 감소하였는데 이는 난포가 커짐으로써 난포막세포들이 섬유화되면서 세포내 autophagic vacuole이 사라져버렸기 때문이 아닌가 사료된다.

황체기난포의 경우, 과립세포의 ACPase의 활성도는 소난포에서 매우 높았는데 이는 황체로부터 분비되는 progesterone이 작은 소난포에 쉽게 영향을 준 것으로 짐작된다. 과립세포내 ACPase의 활성부위는 소난포에서 다양하게 분포된 것으로 사료되어 황체시기와 관련이 있는 것으로 생각된다. 난포막층의 경우 황체기 중난포의 활성도가 난포기에 비하여 높았는데 이는 난소주기에 따라 폐쇄의 진전과 기작이 다름을 암시한다(Kim *et al.*, 1987; Yoon *et al.*, 1990). 황체기 소난포 폐쇄의 진전은 ACPase의 활성도로 폐쇄의 진전정도를 판정할 수 있으며 난소주기와 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

본 실험에서 ACPase의 활성부위 및 활성도와 난포상태의 상관관계로 보아 대, 중난포에서는 폐쇄의 판정기준으로 이용 가능성을 보였으나 소난포에서는 폐쇄와 정상간의 뚜렷한 차이를 확인할 수 없었다. 또한 난포기난포와 황체기난포 간에 ACPase의 활성부위와 활성도는 차이점이 있어 난소주기에 따라 폐쇄의 기작이 다를 것이라는 주장을 뒷받침하고 있다.

인용문헌

- Adams, E. C., A. T. Hertig, and S. Foster, 1966. Studies on guinea pig oocyte. II. Histochemical observations on some phosphatases and lipid in developing and in atretic oocytes and follicles. *Am. J. Anat.* **119**: 303-340.
- Byskov, A. G. S., 1974. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J. Reprod. Fert.* **37**: 277-285.
- Elfont, E. A., J. P. Roszka, and M. J. Dimino, 1977. Cytochemical studies of acid phosphatase in ovarian follicle: A suggested role for lysosome in steroidogenesis. *Biol. Reprod.* **17**: 787-795.
- Ernst, S. A., 1972. Transport adenosine triphosphatase cytochemistry I. Biochemical characterization of a cytochemical medium for the ultrastructural localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in the avian salt gland. *J. Histochem. Cytochem.* **20**: 13-22.
- Gomori, G., 1941. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathological conditions. *Arch. Pathol.* **32**: 189-199.
- Guraya, S. S., 1985. Follicular Atresia. In: *Biology of Ovarian Follicles in Mammals*. (Guraya, S. S. ed.). Springer-Verlag Press, Berlin, pp. 228-307.
- Ingram, D. L., 1962. Atresia. In: *The Ovary*. (Zuckerman, S. ed.). Academic Press, New York, pp. 247-273.
- Km, M. K., Y. H. Lee, J. H. Kim, and Y-D. Yoon, 1987. A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia. *Korean J. Zool.* **30**: 351-370.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrouch, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Richards, J. S., Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* **60**: 51-89.
- Ryan, R. J., 1981. Follicular Atresia: Some Speculation of Biochemical Markers and Mechanisms. In: *Dynamics of Ovarian Function*. (Schwartz, N. B. and M. H. Dunn, eds.). Raven Press, New York, pp. 1-11.
- Sadrkhanloo, R., C. Hofeditz, and G. F. Erickson, 1987. Evidence for wide spread atresia in the hypophysectomized estrogen-treated rat. *Endocrinology* **120**: 146-155.
- Schwalm, R. and G. F. Erickson, 1981. Functional and Morphological Changes in Rat Theca Cells during Atresia. In: *Dynamics of Ovarian Function*. (Schwartz, N. B. and M. H. Dunn, eds.). Raven Press. New York, pp. 29-34.
- Tsafiri, A. and R. H. Braw, 1984. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* **6**: 226-265.
- Wallach, E. E. and C. Noriega, 1970. Effects of local steroids on follicular development and atresia in the rabbit. *Fertil. Steril.* **21**: 253-267.
- Yoon, Y-D., C. J. Lee, B. R. Do, J. H. Kim, and M. K. Kim, 1990. Biochemical studies on the metabolism of follicular maturation II. Protein composition and steroid concentration in individually isolated medium-sized follicular fluid of pig ovary. *Korean J. Zool.* **33**: 63-69.

(Accepted February 29, 1992)

Localization and Activity of Acid Phosphatase of Porcine Ovarian Follicles

Jong Heup Kim, Chang Joo Lee, Hyun Soo Yoon, Yong-Dal Yoon, and Moon Kyoo Kim
(Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University,
Seoul 133-791, Korea)

In order to study the mechanism and the criteria of ovarian follicular atresia, the localization and activity of acid phosphatase (ACPase) of follicles have been histochemically investigated according to the size and the state of follicles, and the ovarian cycle in pig.

The reaction product by ACPase was localized at the granulosa cells and theca interna. At follicular phase, large and medium atretic follicles showed heavier reaction product than those of normal ones. At luteal phase, on the contrary of follicular phase, ACPase activity of the granulosa cells and theca layer decreased as the follicle size increased. However, atretic follicles showed strong activity also.

Therefore, the localization and measurement of ACPase activity can be used as one of the criteria for follicular atresia. These results strongly suggest that the mechanism of follicular atresia is different according to the size and the phase of follicles during ovarian cycle.

Explanation of Figures

Fig. 1. Microphotograph of a normal follicle of porcine ovary, showing well-developed normal granulosa cells and theca layer. Hematoxylin-eosin stain. ($\times 320$)

Fig. 2. Microphotograph of an atretic follicle of porcine ovary, showing considerably pyknotic granulosa cells floating into antrum and fibrous hypoplasia of theca layer. Hematoxylin-eosin stain. ($\times 320$)

Fig. 3. Microphotograph of acid phosphatase localization in a normal medium follicle at follicular phase of porcine ovary, showing very weak activity on granulosa cells and theca layer. ($\times 320$)

Fig. 4. Microphotograph of acid phosphatase localization in an atretic medium follicle at follicular phase of porcine ovary, showing weak activity on granulosa cells and theca interna. ($\times 320$)

Fig. 5. Microphotograph of acid phosphatase localization in a normal large follicle at follicular phase of porcine ovary, showing weak activity on granulosa cells and theca interna. ($\times 320$)

Fig. 6. Microphotograph of acid phosphatase localization in an atretic large follicle at follicular phase of porcine ovary, showing strong activity on pyknotic granulosa cells and theca interna. ($\times 320$)

Fig. 7. Microphotograph of acid phosphatase localization in a normal small follicle at luteal phase of porcine ovary, showing moderate activity on granulosa cells and strong activity on theca interna. ($\times 320$)

Fig. 8. Microphotograph of acid phosphatase localization in an atretic small follicle at luteal phase of porcine ovary, showing strong activity on granulosa cells and theca interna. ($\times 320$)

*A: antrum

