

백서에서 Serine Protease 억제제가 난포성숙에 미치는 영향에 대한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

윤 병 구 · 이 진 용

Effect of Serine Protease Inhibitor on Follicular Development in the Rat Ovary

Byung Koo Yoon, M.D. and Jin Yong Lee, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

= Abstract =

Plasminogen activator (PA)-plasmin system in follicular fluid is involved in the process leading to follicular rupture at ovulation. It is well known that PA is closely associated with cellular differentiation and tissue remodeling on evidences from the study of normal and malignant tissues.

This study was designed to ascertain a potential role of PA in the ovarian folliculogenesis.

Immature Sprague-Dawley rats were injected with pregnant mare serum gonadotropin, followed by injection of serine protease inhibitor (SPI; mixture of 1 mol/L benzamidine and 1 mol/L - amino-caproic acid) into the unilateral ovarian bursa.

In the control study, mechanical effect of bursal injection and contralateral ovarian effect SPI were ruled out.

Total antral follicular areas relative to total ovarian cross-sectional areas was significantly lower in SPI-injected ovary than in saline-injected ovary. SPI injection decreased the relative antral follicular area by 33 % respectively.

Electron microscopic finding of granulosa cell in the atretic follicle showed the presence of pyknotic nucleus, blurring of nucleolemma, degeneration of mitochondria and dilation of endoplasmic reticulum.

After induction of ovulation with hCG, the number of oocytes released was significantly decreased in SPI-injected oviduct than in saline-injected oviduct.

From above results, author discussed that PA may play a role not only in ovulation but also in some processes of folliculogenesis.

Key Words : Serine protease inhibitor, Plasminogen activator, Folliculogenesis.

서 론

일정 수의 성장난포중 일부가 선택되어 하나의 우성 난포가 생성되는 기전에 대하여는 아직까지는 알려진 바가 매우 적다. 일련의 동물 실험 결과를 보면 성선자극호르몬에 대한 난포

의 반응은 항상 일정한 것이 아니라, 난포내 환경에 따라 크게 달라지는 것으로 알려져 있다 (DiZerega & Hodgen, 1981; Goodman & Hodgen, 1983). 원숭이에서 정상황체를 제거하거나 (Goodman & Hodgen, 1979) 정상배란주기가 확인된 여성에서 우성난포를 제거하면 (Nilsson et al., 1982), 다음 배란은 이제까지의 규칙성에서 벗어난 제거 후 12-14일에 일어나는 바 새로운 정상적인 난소주기를 이행한다.

*본 연구는 1992년도 서울대학교병원 지정진료 연구비의 보조로 이루어진 것임.

DiZerega & Hodgen (1981)은 포유동물의 난포 성숙과정에서 우성난포가 소실될 경우 즉시 이를 대체할 제 2의 우성난포 발현은 일어나지 않으며, 혈중 FSH농도의 큰 변화없이 새로운 난포집단(cohort)의 성숙이 시작된다고 보고하였다. 이와같은 사실을 볼 때 난포의 발달은 성선자극호르몬 뿐만 아니라 난소내 인자(intraovarian factor)가 간여하는 것으로 추정되고 있다(Chari et al., 1981; Cahill & Findlay, 1984; Channing et al., 1985).

난포액내에는 다양한 종류의 호르몬, 효소 그리고 펩티드 등이 존재하며 이들은 난포의 성장과 발달 그리고 배란과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그들중 문제의 난소내 인자로서는 자분비(autocrine) 혹은 측분비(paracrine)물질들이 거론되고 있다. 예컨대, Inhibin은 과립막 세포(granulosa cell)에서 생성되어 뇌하수체에서의 난포자극호르몬 분비를 억제하며(Rivier et al., 1986; Bicsak et al., 1986), 반대로 activin은 난포자극호르몬의 분비를 조장한다(Vale et al., 1986; Ling et al., 1986). 난포액내 prorenin(Sealey et al., 1987)은 난소의 prorenin-renin-angiotensin system을 형성하여 스테로이드 합성, 칼슘과 프로스타글란딘의 대사 조절 그리고 혈관형성을 자극한다고 알려져 있다(Itskovits & Sealey, 1987). 그러나 존재가 확인된 것들중 prostaglandin(Aksel et al., 1977), somatomedin(Adashi et al., 1985), relaxin(Bryant-Greenwood, 1982), lipoprotein(Gwynne et al., 1982), GnRH(Hsueh & Jones, 1981), follistatin(Sugino et al., 1988), glycosaminoglycan(Bushmeyer et al., 1985; Eppig, 1981), oxytocin(Schaeffer et al., 1984), GnRH-like protein(Li et al., 1987), substance P(Dees et al., 1985), luteinization inhibitor(Channing et al., 1982), gonadotropin binding inhibitor(Sluss & Reichert, 1984), 여러 가지의 placental protein(Seppala et al., 1984 & 1985; Julkunen et al., 1986), 각종 성장인자(Skinner et al., 1987; Mondschein et al., 1988; Neufeld et al., 1987) 그리고 플라스미노젠 활성물질(plasminogen activator: 이하 PA로 약함.) 등의 난포성숙 과정에서의 역할에 대하여는 알려진 바가 거의 없다(Tonetta & diZerega, 1989).

난포액의 PA-plasmin system은 배란시 난포 파열과 관계가 있는 것으로 평가되고 있다. 즉,

과립막 세포에서 PA의 활성도는 배란시기가 가까와지면서 크게 증가하며(Beers et al., 1975), PA에 의하여 plasminogen으로부터 생성된 plasmin은 난포벽의 장력을 감소시킨다(Beers, 1975). 또한 plasmin은 교원효소(collagenase)를 활성화시켜 난포벽을 와해시켜 배란이 일어나도록 한다(Strickland & Beers, 1976). Reich et al.(1985)은 미성숙 백서에서 pregnant mare serum gonadotropin(이하 PMSG로 약함.)으로 난포성숙을 유도한 뒤 PA와 plasmin 등의 serine protease에 대한 억제제(serine protease inhibitor: 이하 SPI로 약함.) 50 μ l를 난소 점액낭(ovarian bursa)에 주사한 결과 human chorionic gonadotropin(이하 hCG로 약함.)에 의한 배란을 차단할 수 있다고 보고하였다. 이와같은 PA의 생성에 대한 보고도 접할 수 있다. 즉, 과립막 세포에서의 PA생성은 생리적 농도의 난포자극호르몬에 의해 유도되며 배란 직전에 최고 농도를 보이며(Reich et al., 1985) 태아의 초기 발달과정에서 영양배엽세포(trophoblast cell)의 침윤성도 PA의 생성과 평행관계가 있다고 한다(Strickland et al., 1976).

저자들은 난포의 성숙과정에서도 PA는 난포내 인자로서 간여할 것으로 판단하고 이를 검증하기 위해 PA억제제인 SPI를 점액낭에 투여한 백서난소에서 난포의 성숙경과 및 배란율의 변동상을 관찰하였는 바 난포성숙과 정종의 난소내 인자로서의 PA의 역할을 부분적으로 추구하고자 하였다.

본 연구의 목적은 Sprague-Dawley계 미성숙 암컷 백서를 대상으로 PMSG를 투여한 뒤, 난포성숙의 초기에 PA의 억제제인 SPI를 난소 점액낭에 투여하여 난소의 조직조건을 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하고 배란유도 후 배란율의 변화를 규명함으로써, 난포의 성숙과정에서 난소내 인자에서 PA의 역할을 확인하는 데에 있다.

연구재료 및 방법

1. 실험 동물

서울대학교병원 동물실험실에서 분양받은 40gm내외의 생후 24-27일된 Sprague-Dawley계 미성숙 암컷 백서를 사용하였다. 실험동물은 우리당 8-10마리씩 사육하였고, 사육실 온도는 25 $^{\circ}$ C내외로 그리고 습도는 55-60%로 유

지하였다. 실험동물은 오전 5시부터 오후 9시 까지 광선에 노출시켰고 사료와 식수는 충분히 공급하였다.

2. 난소 점액낭에 대한 SPI 투여

실험동물의 난포성숙을 유도하기 위하여 PMSG (Sigma Chemical Co., MO) 10 IU를 피하 주하였다.

1시간 30분뒤, 35mg/Kg의 pentobarbital sodium (Sigma Chemical Co.)을 복강내 주사하여 마취를 시행하였다. 실험 진행도중 필요한 경우 체중 Kg당 10-15mg를 추가 투여하였다. 마취중 백열등이나 보온담요를 사용하여 실험동물의 체온을 유지하였다. 마취 유도가 되면 양와위로 사지를 고정 한 뒤, 정중선 개복술을 시행하여 양측 난소 점액낭을 노출시켰다.

PMSG 투여 2시간 후 StereoZoom microscope (Bausch & Lomb, NY)하에서 30gauge바늘을 이용하여 SPI를 일측 난소점액낭에 주사하였고 반대편 점액낭에는 대조군으로 생리식염수를 동량 주사하였다. SPI로서 생리식염수에 녹인 1mol/L benzamidine (Sigma Chemical Co.) 과 1mol/L γ -aminocaproic acid (Sigma Chemical Co.)의 혼합물을 사용하였다.

난소 점액낭에 투여될 SPI의 적정량을 결정하기 위하여 예비실험 조사를 시행하였다. 25 μ l, 50 μ l 그리고 75 μ l를 각각 실험동물 5마리씩에 투여한 뒤, 양측난소의 antral follicle 면적비와 배란유도 후 양측난관에 관찰된 난자수를 아래에 기술된 방법에 의하여 각각 비교하였다. 25 μ l군의 경우 양측간 차이가 없었으나 50 μ l군과 75 μ l군의 경우 SPI가 투여된 측이 생리식염수가 투여된 대조군에 비하여 antral follicle의 면적비(표 1)와 배란된 난자수(표 2)는 유의하

Table 1. Determination of effective dose of serine protease inhibitor by the change of antral follicular area

SPI (μ l)	No. of rats	Total antral follicular/area /Total area of ovarian crosssection		p-value
		Saline	SPI	
25	5	0.27 \pm 0.02	0.27 \pm 0.05	0.674
50	5	0.34 \pm 0.03	0.19 \pm 0.03	0.001
75	5	0.25 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.007

Values were Mean \pm SEM. Significances of difference were analyzed by paired Student's t-test. SPI was injected into the ovarian bursa.

게 감소하였다. 또한 75 μ l를 주사한 경우 난소 점액낭의 과다한 팽배와 함께 투여된 일부가 주사바늘 천자부위로 역류됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 예비실험 결과 본 실험에서는 50 μ l의 SPI를 난소 점액낭에 주사하였다.

3. 난포성숙 초기에 투여된 SPI가 난포성숙에 미치는 영향

실험동물에서 PMSG 투여 후 난소의 antral follicle 면적비를 알아보기 위하여 대조군 5마리를 대상으로 PMSG투여 48시간 후 경추 탈구법으로 희생시켜 난소를 조사하였다. 실험군 15마리의 경우 PMSG 주사 2시간 후 양측 난소 점액낭에 50 μ l의 SPI와 동량의 생리식염수를 각각 투여하여 그 효과를 비교 분석하였다.

1) 광학현미경적 연구

적출된 난소를 10% 포르말린용액에 고정시킨 뒤 파라핀에 봉매하였다. 난소의 최대직경을 포함하는 종단면으로 조직절편을 제작하여 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경하(AO, NY)에서 관찰하였다. LEITZ ASM 68K (Ernst Leitz Wetzlar Co., West Germany)을 이용한 반자동 영상 분석법(semi-automatic image analysis system)에 의하여 난소절편 전체면적에 대한 antral follicle의 전체 면적비를 계산하였다. 정상난포와 퇴축난포의 감별기준은 과립막 세포의 핵 농축유도, 과립막 세포층의 무작위적인 분해 그리고 대식세포의 침윤 유무 등으로 하였다(그림 1). SPI주입에 따른 antral follicle의 면적비 변화를 비교 검토하였다.

2) 전자현미경적 연구

적출된 난소를 즉시 1mm³이하로 잘게 자른 후 phosphate buffer로 완충된 2.5% glutaraldehyde용액으로 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 고정하였다. 그 후 sucrose phosphate buffer로 4차례 세척하고,

Table 2. Effects of various amounts of serine protease inhibitor on the number of oocytes released into oviducts

SPI (μ l)	No. of rats	Number of oocytes released		p-value
		Saline	SPI	
25	5	9.5 \pm 1.7	10.8 \pm 3.0	0.564
50	5	7.8 \pm 0.6	3.4 \pm 0.09	0.006
75	5	0.7 \pm 1.1	1.8 \pm 1.1	0.008

Values were Mean \pm SEM. Significances of difference were analyzed by paired Student's t-test. SPI was injected into the ovarian bursa.

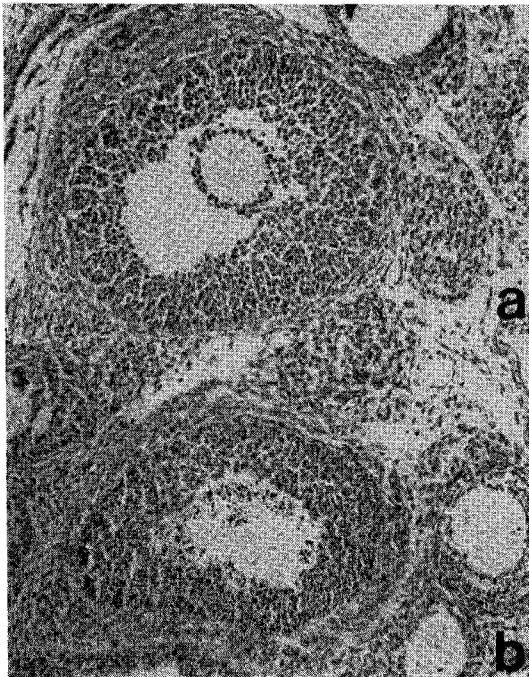


Fig. 1. Light microscopic findings of antral follicle (a) and atretic follicle (b) (H & E stain, $\times 200$). Atretic follicle shows the presence of pyknotic nuclei in granulosa cells, random dissolution of the granulosa cell layer, and macrophage infiltration into atretic follicle.

1% osmium tetroxide로 후고정을 시행하였다. 60% alcohol부터 propylene oxide까지 단계적으로 탈수시키고 Epon에 봉매하였다. Epon block을 trimming한 뒤 Sorvall MT2-B Ultramicrotome으로 박절편 (semithin section, $1\mu\text{m}$)을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학현미경적 검색을 시행하였다. 다시 이 Epon block을 trimming한 후 초박절편 (thin section, 70nm)을 만들고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM 1200EX (Jeol Ltd., Japan)투과 전자현미경으로 가속전압 75KV에서 관찰하였다. SPI 투여에 따른 과립막세포의 미세구조 변화를 검토하였다.

4. 난포성숙 초기에 투여된 SPI가 배란에 미치는 효과

1) 대조군

PMSG/hCG투여에 따른 정상 배란 난자수를 알아보기 위하여, 4마리의 실험동물을 대상으로 PMSG 10 IU를 피하주사하고 2시간 후 위수술을 시행하였다. PMSG투여 48시간 뒤, 5 IU

의 hCG (Sigma Chemical Co.)를 피하주사하여 배란을 유도하였다. 20시간 후 실험동물을 희생시킨 뒤 난관을 적출하였다. Hank solution (Difco Laboratories, MI)이 담긴 접시로 이동시켜 역반사현미경하에서 30gauge바늘을 사용하여 난자-난구 복합체 (oocyte-cumulus complex)를 세척해 내었다. 각각의 난자-난구 복합체를 1.5ml/ml의 hyaluronidase (Sigma Chemical Co.)가 포함된 Hank solution 1ml에 10-15분간 반응시켜 난구세포를 분산시키고 역반사조직 배양현미경 (Olympus Optical Co., Japan) K1하에서 난자 수를 관찰하였다.

2) 실험군

(1) 제 1군: 17마리를 대상으로 상기한 방법에 따라 PMSG를 투여한 뒤 $50\mu\text{l}$ 의 SPI와 동량의 생리식염수를 양측 난소 점액낭에 각각 주사하였다. hCG투여로 배란을 유도시킨 뒤 양측 난관에서 난자를 회수하였다. SPI투여가 배란된 난자수에 미치는 영향을 검토하였다.

(2) 제 2군: 난소 점액낭 주사가 배란에 미치는 기계적인 효과를 검토하기 위하여, 5마리를 대상으로 PMSG 투여 후 일측 난소 점액낭에만 $50\mu\text{l}$ 의 생리식염수를 주사하였다. hCG 투여 후 양측 난관에서 회수된 난자수를 비교하였다.

(3) 제 3군: 일측 난소 점액낭에 주입된 SPI가 혈류를 통하여 반대편 난소에 미칠 수 있는 가능한 영향을 평가하기 위하여, 4마리를 대상으로 PMSG주사 후 일측 난소 점액낭에서만 $50\mu\text{l}$ 의 SPI를 주사하였다. hCG로 배란 유도한 뒤 난소 점액낭 주사를 시행치 않았던 난관에서 회수된 난자수와 PMSG/hCG만 투여된 대조군의 난자수를 비교하였다.

5. 자료의 분석

통계처리는 통계처리 프로그램인 SPSS를 이용하였다. 실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고, 유의성 검정은 paired Student's t-test와 Wilcoxon rank sum test를 이용하였으며 유의 수준은 $p\text{-value}=0.05$ 로 정하였다.

연구 성적

1. 난포성숙 초기에 투여된 SPI가 난포성숙에 미치는 효과

1) 광학현미경적 연구

난소절편 전체면적에 대한 antral follicle의 면적비는 대조군의 경우 양측 난소난 통계적으

Table 3. Comparison of antral follicular areas relative to total ovarian crosssectional areas between right and left ovary

Rat No.	Total antral follicular area/ total area of ovarian crosssection		Lt/Rt
	Rt	Lt	
1	0.26	0.35	1.33
2	0.43	0.35	0.81
3	0.38	0.50	1.31
4	0.31	0.21	0.67
5	0.21	0.25	1.21
Mean ± SEM	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.05	1.07 ± 0.14

p=0.781, paired Student's t-test

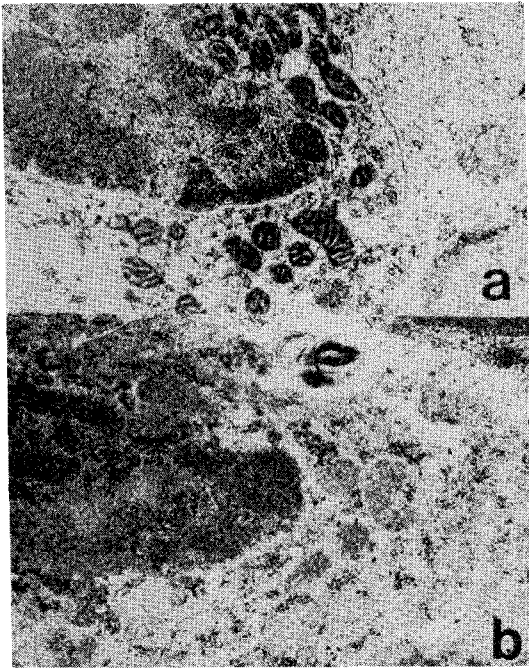


Fig. 2. Electron microscopic findings of granulosa cells in (a) antral follicle and (b) atretic follicle (a; $\times 20,000$, b; $\times 25,000$). Granulosa cell in the atretic follicle shows the presence of pyknotic nucleus, blurring of nucleolemma, degeneration of mitochondria and dilation of endoplasmic reticulum.

로 유의한 차이는 없었으며 (0.32 ± 0.04 vs. 0.33 ± 0.05 , $p=0.781$), 좌측 난소에 대한 우측 난소의 면적비는 1.07 ± 0.14 이었다 (표 3).

실험군의 경우 SPI가 투여된 난소의 상대적 antral follicle 면적비 (0.21 ± 0.03)는 생리식염수

Table 4. Effects of serine protease inhibitor on antral follicular areas relative to total ovarian crosssectional areas in 15 experimental rats

Rat No.	Total antral follicular area/ total area of ovarian crosssection		SPI/ saline
	Saline	SPI	
1	0.25	0.20	0.81
2	0.41	0.21	0.52
3	0.28	0.03	0.09
4	0.32	0.01	0.02
5	0.25	0.30	1.22
6	0.21	0.15	0.70
7	0.29	0.20	0.70
8	0.41	0.29	0.70
9	0.32	0.27	0.85
10	0.50	0.49	0.99
11	0.41	0.32	0.79
12	0.24	0.28	1.17
13	0.29	0.09	0.32
14	0.32	0.17	0.52
15	0.29	0.17	0.59
Mean ± SEM	0.32 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.67 ± 0.09

p=0.781, paired Student's t-test

SPI of $50\mu\text{l}$ /bursa was injected into one ovarian bursa and the same amount of saline into the contralateral ovary.

가 투여된 대조군 (0.32 ± 0.02)보다 낮았으며, 이는 통계적으로 유의하였다 ($p=0.001$, 표 4). 15례중 13례에서 면적비의 감소가 관찰되었고 생리식염수가 투여된 난소에 대한 SPI투여 난소의 면적비는 0.67 ± 0.05 로 평균 33%의 감소를 보였다 (표 4).

2) 전자현미경적 연구

퇴축난포의 과립막 세포는 전자현미경 소견상 antral follicle에 비하여 핵이 농축되었고, 핵막 (nucleolemma)이 불선명하였으며, 사립체 (mitochondria)의 변성과 내형질 망상물 (endoplasmic reticulum)의 팽배가 관찰되었다 (그림 2).

2. 난포성숙 초기에 투여된 SPI가 배란에 미치는 효과

대조군의 경우 PMSG/hCG 투여 후 관찰된 배란 난자수는 양측 난관사이에서 통계적으로

Table 5. Comparison of number of oocytes released into oviducts between right and left ovary in control animals

Rat No.	Number of oocytes released	
	Rt	Lt
1	7	5
2	8	7
3	6	7
4	7	10
Mean±SEM	7.0±0.4	7.3±2.1

p=0.836, paired Student's t-test

Table 6. Effects of serine protease inhibitor on the number of oocytes released into oviducts

Rat No.	Number of oocytes released	
	Saline	SPI
1	9	5
2	8	4
3	9	4
4	6	4
5	7	0
6	10	1
7	10	6
8	6	0
9	8	2
10	6	0
11	7	3
12	9	3
13	15	8
14	6	9
Mean±SEM	9.4±0.8	2.9±0.7

p<0.001, paired Student's t-test

SPI of 50μl/bursa was injected into one ovarian bursa and the same amount of saline into the contralateral ovary.

유의한 차이는 없었다 (7.0±0.4 vs. 7.3±2.1, p=0.836, 표 5).

실험 제 1군의 경우 SPI가 투여된 난관에서 관찰된 난자수 (2.9±0.7)는 생리식염수가 투여된 난관의 난자수 (9.4±0.8)보다 낮았으며, 이는 통계적으로 유의하였다 (p<0.001, 표 6, 그림 3). 17례중 16례에서 SPI투여에 따른 배란율의 감소를 관찰할 수 있었다.

일측 난소 점액낭에만 생리식염수가 투여된 실험 제 2군의 경우 양측난관에서 관찰된 배란

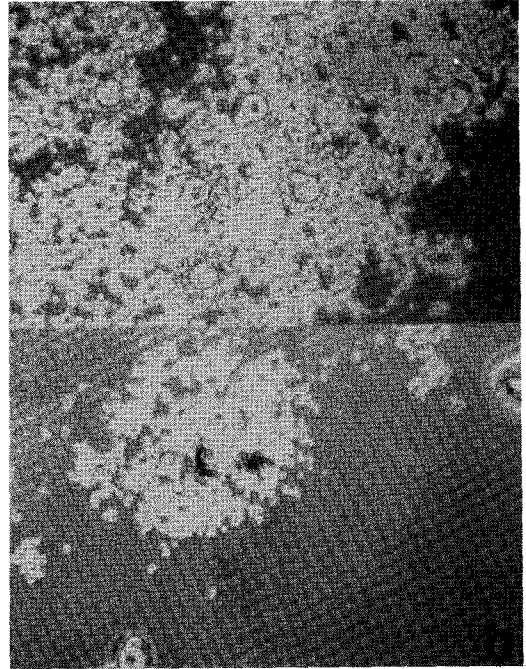


Fig. 3. Oocytes released from (a) saline-injected ovary and (b) serine protease inhibitor (SPI)-injected ovary (×100). Number of oocytes from SPI-injected ovary is lower than control.

Table 7. Effects of bursal saline injection on the number of oocytes released into oviducts in 5 experimental animals

Rat No.	Number of oocytes released	
	None	Saline
1	15	6
2	8	13
3	10	13
4	7	13
5	9	5
Mean±SEM	9.8±1.3	10.3±1.8

p=0.948, paired Student's t-test

난자수는 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (9.8±1.3 vs. 10.0±1.8, p=0.948, 표 7).

일측 난소 점액낭에만 SPI를 투여한 실험 제 3군의 경우 난소 점액낭 주사를 시행치 않았던 반대측 난관에서 관찰된 배란 난자수는 대조군의 배란 난자수와 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Wilcoxon rank sum test, p>0.107, 표 8).

Table 8. Effects of serine protease inhibitor (SPI) injection into one ovary on the number of oocyte release in the contralateral oviduct

Rat No.	Number of oocytes released			
	Control group*		Experimental group	
	Rt	Lt	Contra-lateral*	SPI
1	7	5	7	2
2	8	7	10	2
3	6	7	9	3
4	7	10	7	0

* : $p > 0.107$, Wilcoxon rank sum test

고 찰

난포액내의 단백성분은 대부분 혈청에서 유래한다(Perloff et al., 1955; Shalgi et al., 1973). 난포액에는 혈청과 같은 농도의 plasminogen이 존재하며, 혈중에 존재하는 대부분의 단백분해효소 억제제(protase inhibitor)도 포함되어 있다. 난포액의 단백분해능은 plasmin에 기인하며(Beers, 1975), 단백분해효소 억제제는 plasmin의 작용을 억제하여 난포벽의 통합성(integrity)을 유지한다. 따라서 PA는 난포내 단백분해능을 결정하는 중요한 효소로 알려져 있다.

PA는 최초로 분리된 기원에 따라 tissue-type PA (t-PA)와 urokinase-like PA (u-PA)로 나눌 수 있다(Astrup & Permin, 1947; Williams, 1951). 두 종류의 PA가 난소에서 모두 생성되나 정확한 생성 위치는 아직 확실치 않다. Canipari & Strickland (1985)에 의하면 과립막 세포는 t-PA를 생성하며 난포막 세포(the cal cell)는 u-PA를 만든다. 그러나 Ny등(1985)은 두 종류의 PA가 모두 과립막 세포에서 유래한다고 보고하였다. 과립막 세포의 PA생성은 두 종류의 성선자극호르몬 조절을 받는다. 난포자극호르몬은 주로 난포성숙의 초기에 관여하고 황체형성호르몬은 배란시기에 중요한 역할을 한다. 따라서 특정 성선자극호르몬에 의하여 생성된 PA는 난포성숙과정에서 서로 다른 기능을 수행할 것으로 추정된다.

난포자극호르몬은 cAMP를 매개로 하여 미성숙 과립막 세포에서 PA의 생성을 조절한다(Wang & Leung, 1983). Knecht (1986)는 백서의 과립막 세포 배양실험 결과, 과립막 세포의

PA 생성은 난포자극호르몬 투여 2시간 후부터 관찰되어 6시간에 절정을 보이며, 세포밖으로 분비는 대부분 24시간뒤에 일어난다고 발표하였다. 난포가 성숙함에 따라 과립막 세포는 황체형성호르몬에 대한 수용체를 갖게 되며, 황체형성호르몬 자극에 반응하여 더 많은 양의 PA를 생산한다(Wang & Leung, 1983). 성숙한 과립막 세포의 경우 PA 생성에 대한 황체형성호르몬의 효과는 더 늦게 나타나지만 결국 난포자극호르몬과 같은 정도의 PA 형성을 유도한다.

과립막 세포에서 난포자극호르몬 자극에 의하여 초기에 생성되는 PA는 주로 70,000Mr의 t-PA이고(Knecht, 1987), 과립막 세포의 세포외 기질(extracellular matrix)에 선택적으로 존재하며 반감기는 5-7시간이다(Knecht, 1988). 그러나 성숙한 과립막 세포의 경우 난포자극호르몬이나 난포자극호르몬 처치 후 황체형성호르몬의 자극으로 t-PA와 u-PA의 두 종류의 PA가 생성되며 이들은 세포밖으로 분비된다(Ny et al., 1985; Reich et al., 1985). 세포밖으로 분비된 PA는 넓은 작용범위를 나타내지만, 세포 표면의 PA는 국한된 특정부위에서 작용할 것으로 추정된다.

세포의 기질은 세포기저막의 조성과 침착을 변화시켜 세포의 부착, 이동 그리고 상호작용 등을 조정함으로써, 상피세포의 구조적 특성과 표현형(phenotype)을 결정한다(Kleinman et al., 1981; Hadley et al., 1985). 분비된 PA는 세포기저막의 특정 단백질 성분을 변화시켜 상기한 조직 개조에 관여하는 것으로 알려져 있다. PA는 plasminogen을 plasmin으로 변환시켜 collagen, fibronectin, laminin, elastin 그리고 fibrin 등 세포외 기질의 구성요소를 분해한다(Werb et al., 1980; Liotta et al., 1981; Laug et al., 1983; Chapman et al., 1984; Mignatti et al., 1986). t-PA는 Salonen등(1985)에 의하면 세포외 기질에 존재하는 fibronectin과 결합할 수 있으나, u-PA의 경우 조직분해가 일어나는 세포외 기저막부위에서 아직 그 존재가 보고된 바 없다.

PA는 양막(Liotta et al., 1981), 폐포(Chapman et al., 1984), 섬유아세포(Fairbairn et al., 1985) 그리고 평활근(Werb et al., 1980)에서 세포외 기질의 변성에 관여한다고 이미 알려져 있다. 그러나 과립막 세포에서 PA가 세포외 기질의 특정 단백질에 작용하여 과립막 세포의

부착, 형태 그리고 이동 등 세포분화에 대한 기능을 수행하는지는 아직 확실치않다. Amsterdam 등(1981)은 과립막 세포의 배양실험결과 난포자극호르몬의 존재하에서는 세포들이 뭉치고 gap junction을 형성하며 상피세포의 모양을 유지하지만, 난포자극호르몬이 없을 경우 상기한 변화는 관찰할 수 없었다고 보고하였다. 이는 성선자극호르몬에 의해 유도된 특징 인자가 과립막 세포의 표현형을 조절한다는 사실을 암시한다.

PA는 종양침습, 배란, 배아착상 그리고 착상치유 등 세포와 세포의 기질사이의 상호작용에 좌우되는 다양한 과정에서 중요한 역할을 한다. 난소의 과립막 세포는 난자를 둘러싸고 있으며, 성선자극호르몬에 의하여 난자-난구 복합체를 형성하게 된다. 난포자극호르몬에 의해 과립막 세포에서 생성된 t-PA는 난포의 초기 발달과정에서 난포내 인자로서 난포의 구조적 변화를 일으키는 중요한 기능을 수행할 것으로 사료된다. 그러므로 PA는 이미 밝혀진 배란시의 역할이외에 난포의 초기 발달과정에서도 난포내 인자로서의 역할이 있을 것으로 추정된다.

본 연구에서 백서를 실험대상으로 삼은 이유는 첫째로 우선 백서난소의 해부학적 특성이 사람과 유사하여 연구가 많이 진전되어 있다는 점과 둘째는, 백서는 난소와 난관이 함께 난소 점액낭으로 완전히 둘러 싸여 있으므로 SPI의 국소적인 투여가 가능하다는 점, 세째로 일측 난소에서 배란된 난자는 동측 난관에서만 관찰되며 일측 난소에 국한된 SPI의 주사효과를 반대측 난소를 대조군으로 삼아 비교할 수 있다는 점, 네째로 백서는 한번에 다수의 난자가 배란되어 일회 임신으로 6-10마리의 새끼를 가지므로 SPI투여에 따른 배란율의 변화를 민감하게 보여줄 적당한 실험동물로 생각되었기 때문이다.

백서의 월경주기는 4-5일로 비교적 짧으며, 초경시기는 생후 6-11주이므로 본 연구에서는 실험상 번거로움을 피하기 위하여 이유시기인 생후 3주 전후의 미성숙 백서를 사용하였으며 난포성숙을 유도하기 위하여 PMSG를 투여하였다.

난포성숙의 초기에 투여된 SPI가 난소에 미치는 영향을 평가하기 위하여 난소조직 절편의 전체면적에 대한 antral follicle의 면적비를 광학현미경하에서 반자동 영상분석법을 이용하여 계산하였는데 난소의 무게를 비교하는 방법보

다는 보다 더 객관적인 평가법이라고 생각되었기 때문이다. 이 방법을 채택하여 실험한 본 실험에서 SPI는 생리식염수를 투여한 대조군에 비하여 antral follicle의 면적비가 평균 33%의 감소를 보였다. 조직학적 소견을 보더라도 퇴축난포에서 과립막세포의 전자현미경적 소견상 핵농축, 불선명해진 핵막과 함께 사립체의 변성이 관찰되었고, 내형질 망상물이 팽배되었으며 이는 일반적인 세포 껍사의 소견과 유사하였던 것이다.

본 실험에서 hCG투여 전 46시간 전에 SPI를 투여하고 hCG를 배란을 유도한 후 난관에서 관찰된 난자수는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 이와같은 결과는 Reich et al.,(1985)가 hCG투여 0-2시간 전에 SPI를 투여한 성적과 유사하지만 시간적 차이가 있으므로 단순히 그가 주장하는 SPI의 단순 배란억제 추론만을 지지하기는 아직 이르다. 그보다는 본 실험에서 난포성숙의 초기에 투여된 SPI에 의하여 antral follicle의 면적비가 감소한 점을 감안할 때 hCG투여 전에 이미 성숙 난포수가 감소한 결과 종국적으로 배란이 감소된다고 생각할 수 있다. 따라서 PA는 배란뿐 아니라 난포성숙과정에서도 중요한 역할을 수행한다고 일단 가정해 볼 수 있다.

그러나 Serine protease 억제제를 사용한 본 연구에서 SPI가 기존의 serine protease 억제작용 이외에 다른 효과를 갖고 있을 수 있기 때문에 단순히 PA의 작용이라고 평가할 수 만은 없다. 그러나 난소 점액낭으로 SPI를 주사하면서 배란시 PA의 역할을 규명하는데 무리가 없다고 하므로 (Reich et al., 1985), 본 실험의 결과를 난포성숙의 전과정 또는 어느 시점에서 난소내인자로서의 PA의 역할로 일단 해석하려는 것이다. 이를 뒷받침하기 위해서는 향후 효소억제제를 사용하지 않는 다른 실험방법의 개척이 필요하다고 본다.

결 론

난포의 성숙과정에서 PA의 역할을 규명하기 위하여, Sprague-Dawley계 미성숙 암컷 백서를 대상으로 PMSG를 주사한 뒤 난포성숙의 초기에 PA의 억제제인 SPI를 난소 점액낭에 투여하고 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 난소의 형태학적 변화를 관찰하였으며, hCG로 배란을 유도한 후 배란율에 미치는 영향을 분

석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SPI를 투여한 난소에서 난소절편 단면적에 대한 antral follicle의 면적비는 생리식염수를 투여한 대조군에 비하여 평균 33% 감소하였다.

2. 퇴축난포의 과립막 세포는 antral follicle에 비하여 핵이 농축되었고, 핵막이 불선명하였으며, 사립체의 변성과 내형질 망상물의 팽배가 관찰되었다.

3. 배란유도 후 SPI를 투여한 난관에서 관찰된 난모세포수는 생리식염수를 투여한 대조난관에 비하여 유의하게 감소하였으며 일측 난소점액낭에 SPI를 투여하더라도 반대측 난관에는 아무런 영향도 미치지 않았다.

이상의 결과로 보아 PA는 난포성숙과정에서도 난소내인자로서 중요한 역할을 할 것으로 고찰되었다.

인 용 문 헌

- Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, et al. : Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 1985, 6 : 400-420.
- Aksel S, Schomberg DW, Hammond CB : Prostaglandin F₂ production by the human ovary. *Obstet Gynecol* 1977, 50 : 347-350.
- Amsterdam A, Knecht M, Catt KJ : Hormonal regulation of cytodifferentiation and intercellular communication in cultured granulosa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78 : 3000-3004.
- Astrup T, Permin PM : Fibrinolysis in the animal organism. *Nature* 1947, 159 : 681-682.
- Beers WH, Strickland S, Reich E : Ovarian plasminogen activator : relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell* 1975, 6 : 387-394.
- Beers WH : Follicular plasminogen and plasminogen activator and effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 1975, 6 : 379-386.
- Bicsak TA, Tucker EM, Cappel S, et al. : Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology* 1986, 119 : 2711-2719.
- Bryant-Greenwood GD : Relaxin as a new hormone. *Endocr Rev* 1982, 3 : 62-90.
- Bushmeyer SM, Bellin ME, Brantmeier SA, et al. : Relationships between bovine follicular fluid glycosaminoglycans and steroids. *Endocrinology* 1985, 117 : 879-885.
- Cahill LP, Findlay JK : Inhibition of folliculogenesis by bovine follicular fluid in PMSG-treated ewes. *Biol Reprod* 1984, 30 : 36-40.
- Canipari R, Strickland S : Plasminogen activator in the rat ovary : Production and gonadotropin regulation of the enzyme in granulosa and thecal cells. *J Biol Chem* 1985, 260 : 5121-5125.
- Canipari R, Strickland S : Studies on the hormonal regulation of plasminogen activator production in the rat ovary. *Endocrinology* 1986, 118 : 1652-1659.
- Channing CP, Anderson LD, Hoover DJ, et al. : The role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular maturation. *Recent Prog Horm Res* 1982, 38 : 331-408.
- Channing CP, Gagliano P, Tannabe K, et al. : Demonstration of a gradient in inhibin activity, estrogen, progesterone and 4-androstenedione in follicular fluid, ovarian vein blood and peripheral blood of normal women. *Fertil Steril* 1985, 43 : 142-145.
- Chapman HA Jr, Stone OL, Vavrin Z : Degradation of fibrin and elastin by intact human alveolar macrophages in vitro : Characterization of a plasminogen activator and its role in matrix degradation. *J Clin Invest* 1984, 73 : 806-815.
- Chari S, Aumuller G, Daume E, et al. : The effects of human follicular fluid inhibin on the morphology of the ovary of the immature rat. *Arch Gynecol* 1981, 230 : 239-249.
- Dees WL, Kozlowski GP, Dey R, et al. : Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biol Reprod* 1985, 33 : 471-476.
- DiZerega GS, Hodgen GD : Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr Rev* 1981, 2 : 27-49.
- Eppig JJ : Regulation by sulfated glycosaminoglycans of the expansion of cumuli oophori isolated from mice. *Biol Reprod*

- 1981, 25 : 599-608.
- Fairbairn S, Gilbert R, Ojakian G, et al. : The extracellular matrix of normal chick embryo fibroblasts : Its effect on transformed chick fibroblasts and its proteolytic degradation by the transformants. *J Cell Biol* 1985, 101 : 1790-1798.
- Goodman AL, Hodgen GD : Between-ovary interaction in the regulation of follicle growth, corpus luteum function and gonadotropin secretion in the primate ovarian cycle. II. Effects of luteectomy and hemiovariectomy during the luteal phase in cynomolgus monkeys. *Endocrinology* 1979, 104 : 1310-1316.
- Goodman AL, Hodgen GD : The ovarian triad. *Recent Prog Horm Res* 1983, 39 : 1-73.
- Gwynne JT, Strauss II JR : The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev* 1982, 3 : 299-329.
- Hadley MA, Byers SW, Suarez-Quian CA, et al. : Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation and germ cell development in vitro. *J Cell Biol* 1985, 101 : 1511-1522.
- Hodgen GD : The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril* 1982, 38 : 281-300.
- Hsueh AJW, Jones PBC : Extra-pituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 1981, 2 : 437-461.
- Itskovitz J, Sealey JE : Ovarian prorenin-renin-angiotensin system. *Obstet Gynecol Survey* 1987, 42 : 545-551.
- Julkunen M, Apter D, Seppala M, et al. : Serum levels of placental protein 14 reflect ovulation in nonconceptional menstrual cycles. *Fertil Steril* 1986, 45 : 47-50.
- Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR : Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 1981, 88 : 473-485.
- Knecht M : Production of a cell-associated and secreted plasminogen activator by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1986, 118 : 348-353.
- Knecht M : Hormonal and immunological characterization of the cell-associated plasminogen activators produced by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1987, 120 : 2174-2179.
- Knecht M : Plasminogen activator is associated with the extracellular matrix of ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1988, 56 : 1-9.
- Laug WE, DeClark YA, Jones PA : Degradation of the subendothelial matrix by tumor cells. *Can Res* 1983, 43 : 1827-1834.
- Li Ch, Ramasharma K, Yamashiro D, et al. : Gonadotropin-releasing peptide from human follicular fluid : Isolation, characterization, and chemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84 : 959-962.
- Ling N, Ying S, Ueno N, et al. : Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986, 321 : 779-782.
- Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, et al. : Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement of basement membrane. *Can Res* 1981, 41 : 4629-4636.
- Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB : Tumor invasion through the human amniotic membrane : requirement for a proteinase cascade. *Cell* 1986, 47 : 487-498.
- Mondschein JS, Canning SF, Hammond JM : Effects of transforming growth factor- β on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone on [3 H]thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology* 1988, 123 : 1970-1976.
- Neufeld G, Ferrara N, Schweigerer L, et al. : Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1987, 121 : 597-603.
- Nilsson L, Wikland M, Hamberger L : Recruitment of an ovulatory follicle in the human following follicleectomy and luteectomy. *Fertil Steril* 1982, 37 : 30-34.
- Ny T, Bjersing L, Hsueh AJW, et al. : Cultured granulosa cells produce two plasminogen

- activators and antiactivator, each regulated differently by gonadotropins. *Endocrinology* 1985, 116 : 1666-1668.
- Perloff WH, Schultz J, Farris EJ, et al. : Some aspects of the chemical nature of human ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 1955, 6 : 11-17.
- Reich R, Miskin R, Tsafirri A : Follicular plasminogen activator : involvement in ovulation. *Endocrinology* 1985, 116 : 516-521.
- Rivier C, Rivier J, Vale W : Inhibin-mediated feedback control of follicle stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 1986, 234 : 205-208.
- Salonen EM, Saksela O, Vartio T, et al. : Plasminogen and tissue type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem* 1985, 260 : 12302-12307.
- Schaeffer JM, Liu J, Hsueh AJW, et al. : Presence of oxytocin and arginine vasopressin in human ovary, oviduct and follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984, 59 : 970-973.
- Sealey JE, Cholst I, Glorioso N, et al. : Sequential changes in plasma luteinizing hormone and plasma prorenin during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 63 : 1-7.
- Seppala M, Wahlstrom T, Koskimies AI, et al. : Human preovulatory follicular fluid, luteinized cells of hyperstimulated preovulatory follicles, and corpus luteum contain placental protein 12. *J Clin Endocrinol Metab* 1984, 58 : 505-510.
- Seppala M, Koskimies AI, Tenhunen A, et al. : Pregnancy proteins in seminal plasma, seminal vesicles, preovulatory follicular fluid and ovary. *Ann NY Acad Sci* 1985, 442 : 212-226.
- Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, et al. : Proteins of human follicular fluid : The blood-follicle barrier. *Fertil Steril* 1973, 24 : 429-434.
- Skinner MK, Lobb D, Dorrington JH : Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology* 1987, 121 : 1892-1899.
- Sluss PM, Reichert Jr LE : Porcine follicular fluid contains several low molecular weight inhibitors of follicle-stimulating hormone binding to receptor. *Biol kReprod* 1984, 30 : 1091-1104.
- Strickland S, Beers WH : Studies on the role of plasminogen activation in ovulation. *J Biol Chem* 1976, 251 : 5694-5702.
- Strickland S, Reich E, Sherman MI : Plasminogen activator in early embryogenesis : enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* 1976, 9 : 231-240.
- Sugino H, Nakamura T, Hasegawa Y, et al. : Identification of a specific receptor for erythroid differentiation factor on follicular granulosa cell. *J Biol Chem* 1988, 263 : 15249-15252.
- Tonetta SA, diZerega GS : Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev* 1989, 10 : 205-229.
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, et al. : Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 1986, 321 : 776-779.
- Wang C, Leung A : Gonadotropins regulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 1983, 112 : 1201-1207.
- Werb Z, Banda MJ, Jones PA : Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages. *I Exp Med* 1980, 152 : 1340-1357.
- Williams JRB : The fibrinolytic activity of urine. *Br J Exp Pathol* 1951, 32 : 530-537.