

황체기능의 내분비 제어

성 환 후

축산기술연구소

The Endocrine Control of Corpus Luteum Function

Seong, Hwan-Hoo

National Livestock Research Institute

SUMMARY

The corpus luteum (CL) is formed by the action of a surge of luteinizing hormone (LH) on the pre-ovulatory follicle. Luteal cells derived from granulosa and theca interna cells continue to secrete progesterone for about two weeks. LH in domestic animals is essential for the normal secretion of progesterone at all stages of the luteal phase.

For this process in the rodents, 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (20α -HSD) is indispensable. 20α -HSD is an enzyme that catabolizes progesterone to 20α -dihydroprogesterone (20α -OHP), which is recognized to be a biologically inactive steroid. This enzyme plays a critical role in the regulation of the rat luteal function and reported to be present in steroid-producing tissues such as the testis and adrenal gland.

We have purified 20α -HSD and found two distinct 20α -HSD molecules (HSD-1 and HSD-2). Their molecular weights are both estimated to be 33kd. The amino acid compositions of HSD-1 and HSD-2 are mostly similar, but there is a slight difference in the content of lysine.

We demonstrated that 1) CL of previous generations contribute more to whole ovarian 20α -HSD activity, 2) newly formed corpora lutea contain only 20α -HSD-1 activity, and 3) old CL express activities of each HSD isozyme as shown in the luteal tissue of cycling rats on the day of diestrus where only degenerating old CL exist.

The increase in 20α -HSD activity identified seems to be related to the increase in the numbers of 20α -HSD-positive cells. Interestingly, 20α -HSD-1 activities were strongly found in the follicle fluids and theca interna cells by immunohistochemical study. Thus, the activity of 20α -HSD may be related to a survival mechanism of those luteal cells and follicles remaining in the ovaries.

Luteal cells arise from two sources. The small luteal cells are all of theca cell origin, while the large luteal cells are mainly of granulosa cell origin.

CL of Korean Native Cattle, as those of other animal species, contains two morphologically and functionally distinct luteal cell populations, such as small and large luteal cells as well as nonluteal cells. In all reproductive states except in the late luteal phase, the bovine CL also contained more small luteal cells than large luteal cells.

Luteal tissue secretes a variety of growth factors (proteins) and the pattern of secretion changes during all stages of the luteal phase. These growth factors could be important in

regulating the function of the bovine corpus luteum and may act in a potential endocrine autocrine and paracrine mechanisms. Therefore, further work has to be done to elucidate the role of growth factors in the ovary, especially in the corpus luteum. Interest should be focussed on interaction of these growth factors in the regulation of luteal cell and the localization of cytokine synthesis in different luteal cells.

I. 서 론

포유동물에 있어서 임신유지는 progesterone의 존재가 필수적이다. 임신유지에 대한 progesterone의 작용은 중추신경계에 작용하여 성선자극호르몬(GTH)방출호르몬(GnRH, 10개의 아미노산으로 구성되어 있는 펩타이드 호르몬)의 분비를 억제하여 뇌하수체의 GTH의 일시적 급증(surge)을 방지하여 배란을 억제하고, 자궁에 수정란이 착상을 할 수 있는 내분비적 환경을 부여하고, 자궁평활근의 수축운동을 억제하여 태아의 배출을 방지하는 역할을 한다. 또한 성숙난포는 estrogen을 분비하여 중추신경계를 자극하고 GTH의 다량분비를 유도하여 배란을 하게 되고 배란 후 난포는 잔존하는 협막세포와 과립막세포가 수회의 분열작용이 반복되어 황체세포로 전환되어 progesterone을 분비하게 된다(Takahashi 등, 1978; Murakami 등, 1982).

Rat등의 불완전 성주기 동물은 다른 동물과 달리 교미자극이 없는 경우, 배란 후 형성된 황체는 progesterone을 분비하지 못하고 즉시 퇴행하기 때문에 짧은 성주기(4~5일)를 반복하게 된다. 그러나, 교미자극을 가하면 황체는 progesterone분비기능을 획득하여 임신 및 위임신(pseudopregnancy)을 유지하게 되는 내분비적 배경이 성립한다. 이때에는, 뇌하수체로부터 LH와 prolactin (PRL) surge가 수반되는데, PRL의 계속적인 분비는 rat에 있어서 기능 황체가 성립하는 유일한 제한인자가 된다(Matsuda 등, 1990). 만일 교미자극이 없는 경우, 배란 후 형성된 황체는 즉시 퇴행하게 되는데 이것은 황체조직 중에 20α -hydroxysteroid dehydrogenase(20α -HSD)의 활성이 높기 때문인데 이 효소는 생체 내에서 progesterone을 생화학적으로 불활성한 20α -dihydroprogesterone(20α -OHP)으로 대사하게 된다. 임신 말기의 황체는 progesterone 농도가 급격히 감소하게 되는데

이때에는 황체에서 20α -HSD활성의 상승으로 인해 progesterone을 20α -OHP로 대사하게 되기 때문이다(Matsuda 등, 1990; Seong 등, 1992). 이와 같이 20α -HSD는 rat에 있어서 난소와 황체기능의 내분비적 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다.

한편, 소에 있어서 황체는 다른 가축과 마찬가지로 주기적으로 반복되는 배란과 함께 형성되어 기능적 혹은 구조적으로 발달하고 임신이 성립되지 않으면 퇴행되어 백체로 변화되고 결국에는 난소의 조직에 완전히 흡수되는 특수한 조직이다(Lei 등, 1991). 황체세포는 난포의 과립막세포에서 유래된 대형황체세포(large luteal cell, LLC)와 협막세포에서 유래된 소형황체세포(small luteal cell, SLC)로 구성되어 있으며 이들 황체세포는 황체 전체의 약 40%를 차지하고 gap junction으로 서로 긴밀하게 연결되어 progesterone 분비기능을 하며(Hansol과 Dowd, 1986; Del Vecchio 등, 1994) 황체내의 비황체세포도 황체의 기능과 퇴행에 중요한 역할을 하게 된다(Lei 등, 1991).

본 논문에서는 rat를 비롯하여 설치류의 난소기능에 중요하게 작용하는 20α -HSD의 효소활성을 발현하는 세포와 발현시기, 뇌하수체 호르몬에 의한 발현조절 등에 대하여 검토하고 성숙난포의 배란, 황체형성의 과정에서 20α -HSD활성의 변화에 대한 생리적인 특성에 대해 고찰하였다. 또한, 소에 있어서 황체의 구성 성분 및 황체의 기능, 황체세포의 progesterone분비조절인자에 관련된 최근 연구결과들을 참고로 하여 한우의 황체기능에 관련된 본 연구실의 결과를 비교하여 고찰하고자 한다.

II. 난소에 있어서 progesterone 분비와 20α -Hydroxysteroid dehydrogenase의 역할

성숙난포는 LH surge를 받아서 난자를 방출하고 협막세포와 과립막세포에서 유래하는 세포가 혼합된

어 황체세포로 전환하게 되며(Ryan, 1979; McNatty 등, 1984), 이때 estrogen분비는 급격히 감소되고 progesterone분비가 증가하는 기능적 변화가 일어난다. 이것은 progesterone을 testosterone으로 대사하는 효소인 17 α -hydroxylase의 활성이 LH surge에 의해 크게 저하되기 때문이다(Suzuki와 Tamaoki, 1979). 또한, rat 등의 불완전성주기 동물은 황체세포로부터 progesterone이 분비하기 위해서는 앞에서 설명한 바와 같이 LH외에 PRL분비가 필수적으로 요구된다(Smith 등, 1975). 즉, rat의 황체세포에는 17 α -hydroxylase활성의 저하와 함께 20 α -HSD 활성을 억제하는 것이 progesterone분비의 유지에 필요하다고 사료되며 이러한 작용을 PRL이 담당하고 있다(Takahashi 등, 1978). PRL은 교미자극에 의해 뇌하수체의 PRL 분비 조절기구에 변화가 일어나 1일 2회 PRL surge가 약11일까지 지속하게 된다(Smith와 Neil, 1976; Greef와 Zeilmaker, 1978). 임신 및 위임신이 성립되기 위해서는 교미자극후 뇌하수체의 LH에 의해 17 α -hydroxylase를 억제하고, PRL에 의해 20 α -HSD 활성을 특이하게 억제하여 황체세포에서 progesterone분비상을 약 2주간 획득하여 황체의 퇴행을 방지하며(Smith 등, 1975; Greef와 Zeilmaker, 1978; Naito 등, 1981; Murakami 등, 1982),

임신 및 위임신말기에는 PRL의 기능이 상실되고 황체세포로부터 20 α -HSD활성이 증가되어 progesterone이 20 α -OHP으로 대사되어 기능적 황체퇴행이 일어나게 된다(Takahashi, 1984; Matsuda 등, 1990).

따라서, 20 α -HSD활성이 황체의 성립과정과 함께 황체의 퇴행에도 중요한 역할을 하고 있다. 20 α -HSD는 난소의 황체뿐만 아니라 난포(Suzuki와 Tamaoki, 1979)와, 임신전기간의 난소와 태반조직에서도 20 α -HSD가 존재하여 분만시까지 태아를 보호해 주는 역할을 하고(Shiota 등, 1993; 성 등, 1995), Table 1는 난소이외의 각종 동물의 생체내 다양한 조직, 즉, progesterone을 분비하는 조직 외에 다른 steroid hormone을 분비하는 조직과 비 steroid hormone을 분비하는 조직에도 20 α -HSD가 존재하여 특정세포의 증식과 분화의 제어인자로서의 기능을 하고 있을 가능성이 높다고 사료된다.

Ⅲ. 20 α -HSD의 정제와 황체일령별 20 α -HSD의 활성

최근, 성숙 rat 난소 cytosol을 이용하여 DEAE-Toyopearl anion exchange chromatography에 의해 20 α -HSD분자의 정제를 실시한 결과 분자량은

Table 1. Distribution of 20 α -Hydroxysteroid dehydrogenase

Tissue	Species	Author	Journal
Ovary	rat	Wiest (1968)	Methods Enzymol. 15:638.
	rat	Mori & Wiest (1979)	J. Steroid Biochem. 11:1443.
	rat	Seong et al. (1992)	J. Reprod. Fertil. 96:573.
Testis	porcine	Sato et al. (1972)	J. Biol. Chem. 247:815.
	bull	Pineda (1985)	J. Steroid Biochem. 23:1001.
Placenta	human	Rabe (1982)	J. Steroid Biochem. 16:737.
	rat	Shiota et al. (1993)	Endocrine Journal 40:673.
Adrenal	pig	Nakajin et al. (1989)	J. Steroid Biochem. 33:1181.
Erythrocytes	human	Shirasawa et al. (1980)	Experientia 36:1159.
	bovine	Nancarrow et al. (1981)	Steroids 37:539.
	fetal		
	sheep	Chen et al. (1987)	Steroids 49:477.
	fetal		
Bone marrow cells	mice	Fuks & Weinstein (1979)	J. Immunol., 123:1266.

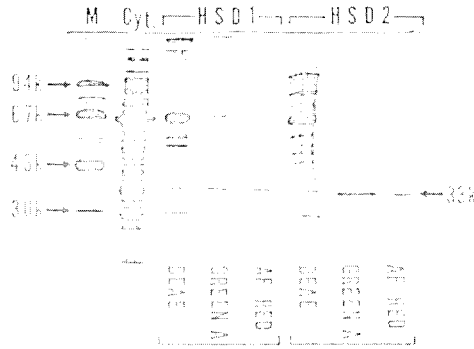


Fig. 1. SDS-PAGE of 20 α -HSD. Slab-gel-electrophoresis was carried out using 10% acrylamide gel under reducing conditions. Lanes represented from the left are: M, molecular maker; Cyt, ovarian cytosol fraction; HSD-1/DEAE, active fraction from the first peak upon DEAE-Toyopearl chromatography; HSD-1; Green A, active fraction of Matrex Green A affinity chromatography of HSD-1; Af Red, active fraction of Af Red-Toyopearl affinity chromatography of HSD-1; HSD-2/DEAE, active fraction the first peak upon DEAE-Toyopearl chromatography; HSD-2; Green A, active fraction of Matrex Green A affinity chromatography of HSD-2; Af Red, active fraction of Af Red-Toyopearl affinity chromatography of HSD-2 (Noda et al., 1991).

33kd로 동일하나 기질 친화성이 서로 다른 HSD-1과 HSD-2의 2종류의 isozyme가 존재하고 있다는 사실이 확인되었다(Fig. 1). 또한, HSD-1과 HSD-2는 16개의 아미노산으로 동일하게 구성되어 있으나, HSD-2에 비해 HSD-1에서 lysine의 함량이 다소 많이 함유되어 있었다(Table 2).

20 α -HSD활성이 난소의 이노 조직에 존재하고 있는가를 조사할 목적으로 정상성주기 rat의 발정휴지기(D2)의 난소로부터 분리된 황체와 황체 이외의 난소 조직을 분리하여 20 α -HSD 총활성 및 DEAE-Toyo-

pearl anion exchange chromatography에 의한 분리후의 HSD-1과 HSD-2활성을 측정하였다. 그 결과, 황체 이외의 난소조직에 비해 황체조직 중에는 극히 높은 20 α -HSD활성이 검출되어(Table 3), 난소의 20 α -HSD활성은 주로 황체조직에 의존하고 있음을 알 수 있다.

또한, 정상성주기 중인 rat 난소에는 적어도 3 내지 4세대의 성주기황체가 존재하며 황체가 형태적으로 완전히 소멸되기 위해서는 약 12일 정도가 필요하며 배란 직후의 신생황체와 위임신초기의 progesterone을 분비하는 기능황체에는 20 α -HSD활성이 극히 낮다는 보고(Mastuda 등, 1990)를 참고하면 황체조직에서 검출된 높은 20 α -HSD활성은 구황체에서 검출된 것이라 사료된다(Noda 등, 1992).

황체일령별 20 α -HSD의 변화와 내분비적 기능을 검토하기 위해서 Murakami 등(1978)의 방법으로 단일 세대의 황체를 가진 연속발정위임신(LL-PSP) rat를 사용하였다.

Fig. 2는 정상위임신(LD-PSP) rat와 연속발정위임신(LL-PSP) rat 난소 cytosol의 20 α -HSD 총활성

Table 2. Amino acid composition of HSD-1 and HSD-2

Amino acids	% composition		HSD 1 / HSD-2
	HSD-1	HSD-2	
Glycine	6.13	5.99	0.14
Alanine	5.14	5.08	0.07
Valine	5.04	4.95	0.09
Leucine	13.20	13.09	0.11
Isoleucine	4.98	5.09	0.11
Serine	5.77	5.57	0.20
Threonine	3.87	4.32	0.45
Aspartic acid	13.47	13.95	0.48
Glutamic acid	12.39	11.90	0.49
Lysine	7.33	5.99	1.34
Arginine	5.63	5.93	0.30
Methionine	1.19	1.89	0.70
Phenylalanine	3.71	3.72	0.01
Tyrosine	3.57	3.62	0.05
Histidine	2.88	2.94	0.06
Proline	5.71	5.99	0.28

(Noda et al., 1991)

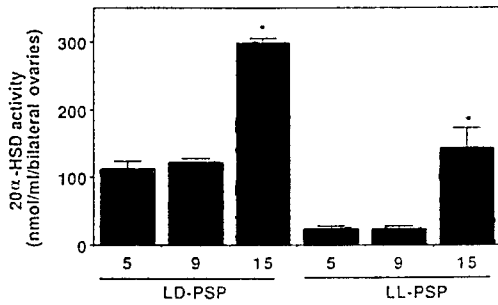


Fig. 2. Activity of ovarian cytosolic 20 α -HSD in pseudopregnant rats in (a) normal or (b) continuous light conditions. Each column and vertical bar represents the mean \pm SEM for 3~5 animals. The enzyme activity was expressed as nmol NADPH/min/ml, with 1 unit of activity defined as the amount that can induce 1 nmol NADPH/min/ml at 37°C. *Significantly different from corresponding values at days 5 and 9 of pseudopregnancy ($P < 0.05$) (Seong et al., 1992).

을 나타내었다.

다세대의 황체를 가진 LD-PSP rat의 난소 cytosol의 20 α -HSD총활성은 위임신 5일과 9일에 비해 위임신 15일에 급격한 상승을 나타내었다. 이에 반해, 단일세대의 황체를 가진 LL-PSP rat의 20 α -HSD 총활성은 위임신 5일과 9일에는 LD-PSP rat에 비하여 극히 낮은 활성을 나타내었으나 LL-PSP 15일째에는 역시 현저한 증가가 관찰되었다. LD-PSP rat에서는 위임신이 유기되기 이전의 성주기회귀중에 형성된 다세대

의 구황체가 존재하고 있는 것에 반하여, LL-PSP rat는 LL조건에서 3주 이상 배란이 정지된 상태이기 때문에 새롭게 형성된 단일세대의 기능황체 이외의 구황체는 존재하지 않는다. 따라서 위임신중기의 LD-PSP rat난소에서 검출된 높은 20 α -HSD활성은 위임신이 유기되기 이전의 성주기중에 형성된 복수세대의 구황체에서 유래하며, 기능황체의 20 α -HSD활성은 위임신말기(15일)부터 강하게 발현되어 progesterone 분비를 저하시키는 것으로 사료된다(Seong 등, 1992).

Fig. 3에서 LL-PSP 9일과 15일째의 난소 cytosol을 DEAE-Toyopearl anion exchange chromatography에 의한 분리한 결과 LL-PSP 9일째의 20 α -HSD활성은 극히 낮은 HSD-1이 검출되었고 HSD 2는 전혀 검출이 되지 않았으나 LL-PSP 15일째의 난소 cytosol에서는 LL-PSP 9일째에 비하여 HSD-1이 현저하게 증가되었고 HSD-2의 peak도 검출되었으며 HSD-1과 HSD 2의 비율은 3.7:1로 나타났다.

Fig. 3과 동일한 방법으로 측정된 LD-PSP와 LL-PSP의 각 시기별 HSD-1과 HSD-2활성을 Fig. 4에서 나타내었다. LD-PSP rat에서는 위임신 경과에 따라 HSD-1의 활성이 증가하였으나 HSD 2활성은 큰 변화는 없었다. 한편, LL-PSP에는 HSD-1은 5, 9일째에 낮은 활성을 보였고 15일째에는 극히 높게 나타났으나 HSD-2는 5, 9일째에는 검출되지 않았으나 15일째에서 처음으로 검출되어 LD-PSP와 LL-PSP의 위임신기간중 HSD-1과 HSD-2활성은 큰 차이를 보였다. 이 같은 차이는 각 rat의 난소의 세포구성의 차에 원인이 있다고 사료된다. 즉 상술한 바와 같이 LD-PSP rat의 난소에는 다세대의 황체가 존재하고 있으

Table 3. 20 α -HSD activities of the luteal and non-luteal tissue from the ovary of cycling rats on the day of diestrus before and after DEAE-Toyopearl anion exchange chromatography

Tissus	20 α -HSD activity			
	Unfractionated	Fractionated		
		HSD-1	HSD-2	Total
Luteal	102.1 \pm 19.8	53.5 \pm 28.6	54.2 \pm 9.9	108.4 \pm 15.5
Non-luteal	20.5 \pm 1.9*	11.9 \pm 0.7*	6.3 \pm 1.3*	18.1 \pm 2.5*

20 α -HSD activity is expressed as nmol NADPH /min per pair of ovaries.

Each value represents the mean \pm SEM for six animals.

*Significantly different from corresponding luteal tissue ($P < 0.05$) (Seong et al., 1992).

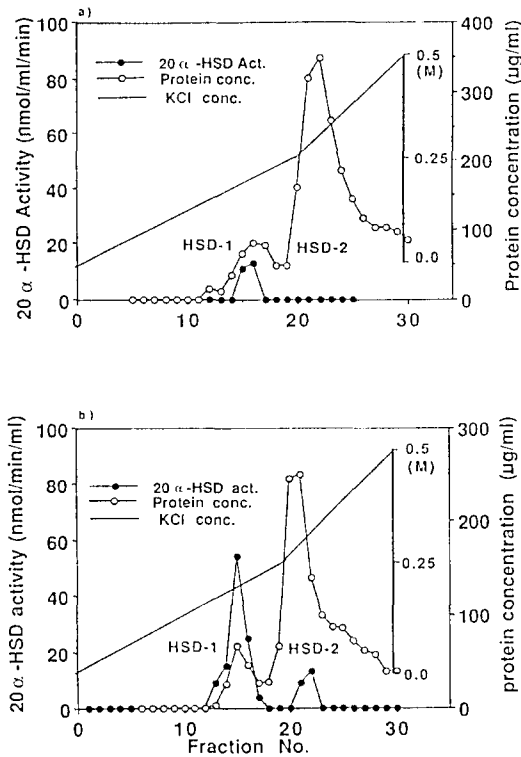


Fig. 3. High-performance liquid chromatography profiles of activities of 20α -HSD and protein concentrations in ovaries of rats in a preparative DEAE-Toyopearl anion-exchange column ($0.7 \times 6.7 \text{ cm}^2$, 650S) using (a) day 9 and (b) day 15 pseudopregnant rats in continuous light conditions. Chromatography was performed at 1 ml min^{-1} with a linear gradient of KCl (—) : for 0~50% $0.5 \text{ ml KCl l}^{-1}$ for 10 min. 50~100% for 5 min and 100% of $0.5 \text{ ml KCl l}^{-1}$ for 5 min. Activity of 20α -HSD was assayed using 20α -OHP as a substrate (Seong et al., 1992).

나 LL-PSP rat의 난소에는 단일세포의 황체만이 존재하고 있다. 따라서 기능황체에는 HSD-2가 출현하지 않고 황체퇴행기에 특이적으로 출현하는 것으로 사료되며 위임신 발기 이전에 검출된 LD-PSP rat의 난소중 HSD-2활성은 기능황체가 아니라 퇴행한 구세포의 황체에서 유래하는 것으로 시사된다. 이와 같은 결

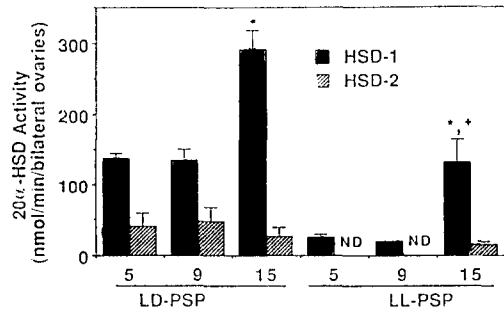


Fig. 4. Changes in activities of 20α -HSD-1 and 20α -HSD-2 in ovaries of pseudopregnant rats in normal light conditions (LD-PSP) and conditions of continuous light (LL-PSP). Activities were measured after ovarian cytosolic samples had been subjected to DEAE-Toyopearl anion-exchange chromatography on high-performance liquid chromatography. ND: not detected. Each column and vertical bar represents the mean \pm SEM for 3~5 animals. Within a measurement, means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$) (Seong et al., 1992).

과로 보아, HSD-1과 HSD-2의 발현은 서로 다른 조절기에 의해 지배된다고 사료된다. 즉, HSD-2활성은 위임신 11일경에 PRI이 발출할중에서 소실되는 시기 (Greef와 Zeilmaker, 1978)에 발현되었으며 황체의 퇴행기에 대량의 면역세포인 macrophage가 황체에 침입하여 세포의 phagocytosis 작용에 의해 형태적으로 퇴행이 일어난다고 보고되어 있다 (Mastuyama 등, 1990). 이 시기에 발현된 HSD-2는 황체에 침입한 면역세포에서 유래하며 HSD-1은 황체세포에서 유래할 가능성이 있다. 또한, 정제된 HSD-2에 대한 anti-mouse- 20α -HSD를 이용하여 항광면역조직화학적 방법으로 검토한 결과, LL-PSP 9일째의 rat 난소의 황체조직에는 20α -HSD의 양성세포와 음성세포가 공존하고 있으며 LL-PSP 15일째의 황체조직에는 20α -HSD의 양성세포가 차지하는 비율이 증가되었다. 따라서 위임신발기에 20α -HSD활성의 증가는 황체세포의 20α -HSD양성세포가 증가된다는 사실에 기인되는 것으로 사료된다 (Seong 등, 1992).

IV. 난포내 20 α -HSD효소 활성의 출현과 생리적 역할에 관한 연구

난소의 난포조직중에 20 α -HSD 활성이 존재하고 있다고 다수 보고되었다(Balogh 등, 1966; Leavitt 등, 1972; Eckstein 등, 1977; Eckstein과 Nimrod, 1979; Hsueh 등, 1984; Tsafirri와 Eckstein, 1986). 그러나, 이들 연구는 미성숙 rat에 임마혈청성 성선자극호르몬(PMSG)을 투여하여 다수의 난포발육을 촉진시킨 난소를 이용하였는데 이때에는 폐쇄난포가 다수 포함되어 있고, 혈중호르몬의 환경이 성숙 rat의 배란 전후의 시기와는 큰 차이가 있기(Mastuda 등, 1990) 때문에 난포에 대한 20 α -HSD활성의 내분비적 조절기구의 연구모델로서 적절하지 않다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 연속발정 rat난소내 20 α -HSD의 조직화학적 특성을 검토하고, 교미자극 혹은 LH, PRL을 투여하여 배란 전후의 난포의 20 α -HSD활성의 변화가 어떠한 호르몬에 의해 조절되는가를 검토하였다. 그 결과, 황체가 진히 존재하지 않는 연속발정 rat(LL-rat)의 난소내 20 α -HSD의 높은 활성이 존재하고 있음이 확인되었으며, 이러한 20 α -HSD활성은 난포액중에 존재하고 있음이 면역조직화학적으로 검



Fig. 5. Sections (5 μ m thick) of ovarian tissue from continuous-light rat ($\times 95$). The immunoreactivity with anti-20 α -HSD antibody is demonstrated by the indirect immunofluorescence. The fluid of large follicle was intensely stained (Seong et al., 1992).

출되었다(Fig. 5).

한편, DEAE-Toyopearl anion exchange chromatography에 의해 20 α -HSD를 분리한 결과, 난포액중에 존재하는 높은 20 α -HSD활성은 HSD-1만이 검출되었고 HSD-2는 전혀 검출되지 않았으며(Fig. 6) 이러한 결과는 western blot법에 의해서도 확인되었다(Fig. 7).

이들 LL-rat에게, hCG 단독 투여군에서는 처치후 48시간까지 20 α -HSD 활성은 높은채로 유지되었다. 그러나 교미자극 및 hCG와 동시에 PRL을 처치한 군에서는 24시간 이후 20 α -HSD활성은 크게 저하되어, PRL 처치 혹은 교미자극에 의해 신경계를 자극하여 내인성 PRL 분비가 유도되어 20 α -HSD활성을 억제하며 기능황체가 형성되었다 (미발표자료).

또한 난포에 있어서 20 α -HSD 양성세포에 대해서 조직화학적으로 검토한 결과, 연속발정 rat의 난소에서는 내협막 세포만이 강하게 염색되어 난포액 중에

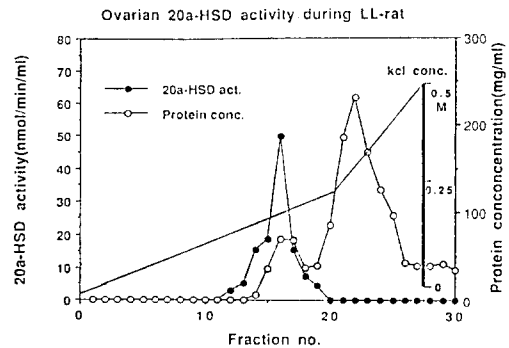


Fig. 6. High-Performance Liquid Chromatography profile of activities of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase and protein concentrations in ovaries of continuous-light rats on a preparative DEAE-Toyopearl anion-exchange column (0.7 \times 6.7cm, 650S). Chromatography was performed at 1ml/min with a linear gradient of KCl(-):for 0~50% 0.5 mol KCl/l for 5 min 50~100% for 5 min and 100% of 0.5 mol KCl/l for 5 min. activity of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase was assayed using 20 α -dihydroprogesterone as a substrate.

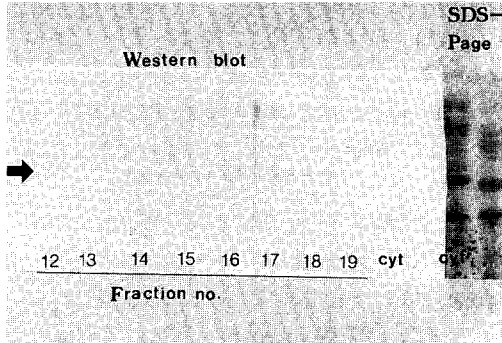


Fig. 7. Western blotting analysis of 20α -HSD in ovarian cytosol from continuous-light rat. Each sample was fractionated by DEAE-Toyopearl anion exchange chromatography. The antibody was in mice against purified 20α -HSD and purified on protein A sepharose. Only HSD-1 activity was observed between 12 and 19 of fraction.
Cyt ; Cytosol of LL-rat ovary.

20α -HSD를 분비하고 있는 세포는 내협막 세포임이 확인되었다 (비발표자료).

한편, 정상성주기 중에 있는 rat에 있어서는 발정전기에 LH surge 직전·직후의 내협막 세포는 강하게 염색되었으나 발정휴지기 제 1일의 내협막 세포는 염색되지 않고 성숙한 난포의 내협막 세포만이 20α -HSD 활성이 발현하고 있다는 새로운 사실이 확인되었다. 협막세포에 출현한 20α HSD는 progesterone을 20α OHP로 대사시키는 것으로 progesterone을 androgen으로 대사시키는 17α -hydroxylase와 결합함으로써 androgen 합성을 저해한다고 생각된다. 그 결과 연속발정 rat 혹은 정상성주기 rat의 LH surge를 받는 난포에 있어서 과립막 세포로의 androgen 공급이 감소함으로써 혈중 및 난포액 중의 estrogen 농도를 저하시키는 효과를 가지는 것으로 시사되었다. 또한, 난포액중에 분비된 20α -HSD는 난포액내에서 progesterone 농도가 일정수준을 초과하는 것을 방지하여 난포세포를 보호하는 등의 생리학적 의의가 있다고 사료된다.

이상의 연구에서 새로 형성된 기능황체는 극히 낮은

수준의 20α -HSD(HSD-1)이 존재하며 progesterone을 분비한다는 것이 확인되었다. 또한, 기능황체가 퇴행하는 시점에서 HSD-2가 출현하며 퇴행황체에는 높은 HSD-1과 HSD-2 활성이 공존하고 있으며, 연속발정 rat의 성숙난포의 내협막세포에서는 HSD-1이 생산되어 난포액 중에 분비되고 정상성주기 rat의 배란난포의 내협막 세포에 있어서도 LH급증의 출현시에 20α -HSD 활성이 발현하고 있다는 것 등의 새로운 사실이 밝혀졌다. 이들 결과로부터, HSD-1과 HSD-2의 발현은 서로 다른 조절계에 의해 지배되고 있는 것이 시사되며, 또한 이러한 두개의 isozyme은 서로 다른 세포에서 생산되어 다른 기능을 가질 가능성도 시사되었다. HSD-1과 HSD-2는 기능황체에 관여하고 있을 뿐만 아니라 특히 HSD-1은 난포액의 미세 steroid 환경을 조절하여 난포세포와 난포의 기능을 유지하는 것으로 사료된다

V. 소의 난소내 황체의 progesterone 분비 조절인자에 관한 연구

1. 황체의 구성성분

황체는 뇌하수체의 LH surge를 받은 성숙난포가 배란 후에 형태적 또는 기능적으로 큰 변화를 일으켜 난포의 과립막세포는 대형황체세포(LLC)로, 협막세포는 소형황체세포(SLC)로 전환되어 형성되며 이들 황체세포는 일정비율로 구성되어 있는데 그 비율은 중간에 다소 차이가 있고 황체일령이 진행됨에 따라 SLC가 LLC로 형태적 혹은 기능적으로 변화되며(성 등, 1995) 이들 양세포는 상호 긴밀한 관계를 유지하여 progesterone을 분비하게 된다(Lei 등, 1991; DEL Vecchio 등, 1994). 또한, fibroblast와 macrophage 등의 비황체세포도 다수 포함되어 황체의 기능유지에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다(Lei 등, 1991). 소에 있어서 황체의 진행단계별 황체세포의 비율은 Table 4에서 보는 바와 같이 초기와 말기의 황체세포는 약 25%로 나타났으나 중기황체와 임신황체의 황체세포는 약 40%로 나타나 progesterone분비가 높은 시기에는 황체내의 황체세포가 증가하는 것으로 나타났다(Lei 등, 1991).

흥미로운 사실은, 황체 내에 macrophage의 비율이 황체일령이 진행될수록 유의적으로 증가하는 결과가

Table 4. Cell composition of bovine CL from various reproductive states

Reproductive state	Percent of total cells (Mean \pm SEM)	
	Luteal cells	Nonluteal cells
Early luteal phase	25.8 \pm 0.3 ^a	74.2 \pm 0.1 ^a
Mid luteal phase	40.0 \pm 0.2 ^b	60.0 \pm 0.3 ^b
Late luteal phase	25.4 \pm 0.4 ^a	74.6 \pm 0.5 ^a
Corpora albicantia	—	—
Pregnancy	39.5 \pm 0.4 ^b	60.5 \pm 0.3 ^b

Three hundred to 450 cells were counted in a total area of 43,000 μm^2 from each CL.

^{a,b} The values in vertical columns with different superscript letters are different, $P < 0.05$ (Lei et al., 1991).

Table 5. Distribution of macrophages and fibroblasts in bovine CL from various reproductive states

Reproductive stage	Cells / 10,000 μm^2 (Mean \pm SEM)*	
	Macrophages	Fibroblasts
Early luteal phase	16.1 \pm 2.1 ^a	38.6 \pm 1.7 ^a
Mid luteal phase	31.4 \pm 1.8 ^b	33.4 \pm 1.0 ^b
Late luteal phase	97.7 \pm 1.5 ^c	65.8 \pm 1.5 ^c

* Twenty 10,000 μm^2 areas of each CL were used in counting these cells.

^{a,b} The values in vertical columns with different superscript letters are different, $P < 0.05$ (Lei et al., 1991).

Table 6. Characteristics of small and large luteal cells in pregnant rat corpus luteum

Cell size	DNA ($\mu\text{g} / 10^6$ cells)	Protein ($\mu\text{g} / 10^6$ cells)	Protein / DNA ratio
Small (SLC)	21.7 \pm 1.2 (n=5)	177 \pm 55 (n=3)	9.0 \pm 2.0
Large (LLC)	21.8 \pm 1.2 (n=5)	433 \pm 118 (n=3)	31.0 \pm 9.0
L / S ratio	1.0	2.5	3.5

(Nelson et al., 1992)

나타났다(Table 5). 말기황체에서 macrophage의 증가는 황체의 형태적 퇴행(luteolysis)에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 초기 및 중기황체에 존재하는 macrophage는 황체세포의 progesterone 분비에 관여하고 있는 것으로 알려져 있으며(Lei 등, 1991; Mastuyama 등, 1990), 황체조직내의 macrophage는 비장에서 생산되어 보세혈관을 통해 황체형성시에 침입한 것으로 추정된다(Mastuyama 등, 1990).

황체세포의 분리는 flow cytometry나 elutriation

등으로 주로 분리하지만 Ficoll용액이나 Percoll용액으로 분리할 수 있다. 본 연구실에서는 한우의 황체세포를 percoll density gradient법에 의해 SLC와 LLC를 분리한 결과 SLC는 약 95% 정도 순수분리되었으나 LLC군에서는 SLC가 다소 혼합되어 있었다. Table 6에서 SLC와 LLC의 세포수당 DNA함량은 거의 비슷하게 나타났으나 단백질함량은 LLC에서 약 2.5배로 높았으며 세포내 DNA당 단백질함량도 LLC에서 3.5배로 높았다(Nelson 등, 1992).

2. 황체세포(SLC와 LLC)의 progesterone분비기능과 조절인자

Table 7에서는 황체일령변 황체조직내의 progesterone량과 각 시기의 황체세포를 체외배양하여 배양액내의 progesterone분비량을 비교한 결과, 발정주기 5~10일의 CL-2의 조직과 발정주기 15~20일의 CL-4의 조직내의 progesterone 함량과 황체세포의 progesterone 분비기능은 유의적으로 감소되었다. 이 시기에는 황체세포의 비율이 급격히 감소되고(Lei 등, 1991) macrophage와 fibroblast의 비율이 유의적으로 증가하여 황체세포의 기능과 형태적인 퇴행현상이 일어나고 있는 것으로 사료된다.

황체황체의 형성과 progesterone 분비기능은 주로 뇌하수체전엽에서 분비하는 LH에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며 임신말기나 발정주기 말기에는 자궁내막세포에서 분비하는 PGF₂α가 유도되어 황체퇴행을 일으켜 황체의 수명을 결정한다. 즉, PGF₂α는 estradiol과 progesterone의 비율에 대한 변화로 인해 자궁내막에서 분비되고, 황체세포에서 다소적으로 합성되는 estradiol, oxytocin 및 PGF₂α와의 상호작용에 의해 황체세포에서 progesterone분비를 억제시

켜 황체의 퇴행을 일으키게 된다(Mcardle과 Holtorf, 1989; Baird, 1992; Kurusui 등, 1994; 정 등, 1994; 정 등, 1994). 또한, Garverick 등(1992)에 의하면 PGF₂α는 progesterone과 estradiol의 변화와 뇌하수체후엽에서 분비하는 oxytocin에 의해 자궁에서 유도되며 이것은 다시 황체세포의 oxytocin을 유도시켜 황체의 기능을 조절한다고 보고하였다.

Table 8은 한우에 있어서 초기 및 후기황체를 분리하여 Percoll density gradient법을 이용하여 SLC와 LLC의 비율을 검토하였다. 그 결과, SLC가 LLC가 유의적으로 많이 존재하고 있으며 초기황체에 비해 후기황체에서 LLC의 비중이 높은 것으로 나타났다.

또한, Table 9는 LLC와 SLC를 각각 혹은 혼합(SLC+LLC)하여 배양하여 배양액내의 progesterone 분비량을 검토하여 본 결과, LLC가 SLC군에 비해 극히 높은 progesterone 분비를 나타내었으나, LH를 첨가하였을 때는 SLC군에서 약 3배 정도의 높은 농도를 확인할 수 있었다. 이와 같이, 황체세포의 체외배양실험에서 LLC는 대부분의 progesterone을 분비하며 PGF₂α 및 oxytocin등의 peptide계 호르몬의 수용체가 존재하며, SLC는 일부의 progesterone을 분비하거나 뇌하수체의 LH수용체를 갖고 있으며

Table 7. Changes in cytosolic progesterone content of CL and progesterone secretion of luteal cells (10⁶cell) during each luteal phase in Korean Native Cattle (Hanwoo)

Luteal phase	Progesterone	
	Content (200mg of CL tissue)	Secretion (10 ⁶ live cells /ml in D-MEM*)
Estrous cycle		
┌ CL-1	29.09 ± 0.81 ^a	352 ± 25.7 ^a
├ CL-2	32.50 ± 0.79 ^b	448 ± 75.9 ^b
└ CL-3	32.68 ± 0.62 ^b	407 ± 29.1 ^{ab}
└ CL-4	17.54 ± 3.92 ^c	54.8 ± 3.7 ^c
Pregnancy		
┌ 2 month	31.15 ± 0.62 ^b	484 ± 81.5 ^b
└ 3 month	33.72 ± 0.60 ^b	-

Progesterone content of CL tissues and secretion of luteal cells were measured by radioimmunoassay using anti-progesterone and ³H-progesterone.

*Secretion of progesterone by luteal cells cultured in D-MEM (added 10% FCS and antibiotics) for 24hr.

Each value represents the mean ± SEM for 4-6 CL and different superscripts denote significant differences (P<0.05) (Unpublished).

Table 8. The mean composition (% of total cells) of the small and large luteal fractions from early and late luteal phase in Korean Native Cattle (Hanwoo)

Luteal phase	Luteal cell types*	
	Small luteal cells	Large luteal cells
Early	84.0 ± 8.5 ^a	13.5 ± 2.3 ^a
Late	69.7 ± 10.5 ^b	30.3 ± 4.1 ^b

* Cells classified according to size in a haemocytometer : small luteal cells 15~25 μ m, and large luteal cells >25 μ m (Rodgers et al., 1993)

^{2,6} The values in same columns with different superscripts are different (P<0.05).

Small and large luteal cells were separated by percoll density gradient with 5 steps (90, 70, 50, 40 and 30%) (Unpublished).

Table 9. Basal and LH-stimulated progesterone production (mean ± SEM) during 24hr incubation (after 12hr preincubation) of small and large luteal cell fractions

LH (ng / ml)	Progesterone production (ng / well)		
	SLC+LLC fraction	SLC fraction	LLC fraction
0	185 ± 20.5 ^a	13.5 ± 2.7 ^a	92.3 ± 12.8 ^a
100	235 ± 18.7 ^b	48.2 ± 4.5 ^b	110.5 ± 9.1 ^a

^{a, b} The values in same columns with different superscripts are different (P<0.05) (Unpublished).

Table 10. Changes in mRNA expression (expressed as percentage of pixels in a given area occupied by silver grains) for LHR, P450scc, and 3 β -HSD in bovine lutea corpora

Day of estrous	No. of heifers	LHR	P450scc	3 β -HSD
2	3	10.1 ± 2.5 ^a	15.5 ± 0.8 ^a	26.9 ± 2.9 ^a
4	4	23.0 ± 2.6 ^b	32.8 ± 4.3 ^b	37.7 ± 1.9 ^b
6	4	26.4 ± 1.0 ^b	33.9 ± 1.5 ^b	29.4 ± 2.5 ^{ab}
8	4	32.5 ± 3.7 ^b	36.0 ± 1.2 ^b	31.0 ± 1.8 ^b
10	4	45.1 ± 1.7 ^c	44.1 ± 2.9 ^c	21.1 ± 3.7 ^c
12	3	44.3 ± 2.3 ^c	46.0 ± 4.3 ^c	14.8 ± 2.4 ^c

mRNA's encoding LHR, P450scc and 3 β -HSD were localized within each corpus luteum by *in situ* hybridization using ovine LHR, bovine P450scc and ovine 3 β HSD cRNA probes (Bao et al., 1995).

일령이 경과하면서 형태적으로 혹은 기능적으로 LLC로 변화된다고 알려져 있다(Rodgers 등, 1983; Nelson 등, 1992; McLean 등, 1992).

Table 10은 소의 황체의 progesterone 합성에 중요하게 작용하는 LHR, P450scc와 3 β -HSD의 mRNA expression에 대해 황체일령별 변화를 검토하였는데 황체발달이 진행될수록 LHR는 SLC에, P450scc는 LLC에 각각 증가되었고 3 β -HSD는 초기와 중기황체의 LLC에서 주로 검출되어 황체세포의 progester-

one 합성에 중요하게 작용하는 것으로 보고하였다(Bao 등, 1995). 또한, *in vitro*에서 PGF_{2 α} 단독 처리는 황체세포의 progesterone 분비를 억제하지 않거나 오히려 증가시켰으며, LH 첨가에 의한 황체세포의 progesterone 분비 촉진기능을 PGF_{2 α} 가 특이적으로 억제하고, cytokine(IL-1, IFN, 혹은 TNF- α)은 황체내의 PGF_{2 α} 의 생산을 촉진하여 progesterone 분비를 억제하였다고 하였다(Kawakami 등, 1980; Wilbank와 Niswender, 1992; Seong 등, 1992; Gree-

ne과 Pate, 1995).

이들의 황체기능을 조절하는 인자로서, Yuan과 Lucy(1995)는 임신중기의 돼지난소의 황체세포의 체외배양에서 GH, PRL 및 IGF-1은 LLC의 progesterone분비를 촉진하였으며, LH는 SLC의 progesterone 분비를 촉진시켰다고 보고하여 SLC와 LLC는 서로 다른 호르몬과 성장인자에 의해 조절되고 있음을 알 수 있다. 또한, oxytocin이 소의 황체세포에서도 합성되고 IGF-1에 의해 촉진된다고 보고되었고(Mcardle와 Holtorf, 1989) 특히, IGF-1은 발정주기의 중기황체와 임신 1개월령의 소의 황체조직에서 높은 IGF-1이 검출되었으며 퇴행기의 황체와 임신 6~9개월령의 황체조직에는 IGF-1이 급격히 감소되었다고 보고하여 황체의 기능유지를 위해서는 황체 자체에서 autocrine/paracrine 양식에 의해 조절기능을 갖고 있는 것으로 사료된다(Einspanier 등, 1990). 또한, relaxin은 성숙난포의 내협막세포에서 존재하며 초기황체의 SLC에서 황체기능을 조절하는 것으로 보고되어 있으며(Duffy 등, 1995), Wang과 Milvae(1995)의 보고에 의하면 rat에게 PGF_{2α}처리후 2시간 만에 황체내의 heat shock protein 70이 급격하게 증가되고, P450scc mRNA가 현저히 감소되어 황체퇴행이 일어난다고 하였으며, Grazul-Bilska 등(1995)은 발정주기 중에 있는 소의 황체세포 배양에서 SLC와 LLC사이에 존재하는 gap junction의 기능을 촉진하는 단백질인 gap junction protein connexin 43(Cx43)이 발정주기중에 검출되었으며, 특히 초기황체의 황체세포에서 높은 농도가 검출되어 소의 황체의 성장과 분화 및 황체퇴행의 조절에 중요하게 작용하는 것으로 보고되었다.

이상과 같이, 소에 있어서 정상적인 발정주기의 반복과 퇴행 및 임신유지는 LH와 PGF_{2α}의 황체세포에 대한 작용외에 특정시기의 황체조직에서 분비하거나 보세혈관을 통해 유입한 황체기능 조절인자에 의해 autocrine/paracrine양식에 의해 복합적으로 작용하는 것으로 사료된다.

VI. 요약

성숙난포는 LH 급증에 의해 배란이 유도되고 황체가 형성되며 난포의 과립막세포와 내협막세포의 기능

적 분화로 인해 황체세포로 전환되어 약 2주간 progesterone을 분비하게 된다. 가축에 있어서 LH는 일정기간 황체로부터 정상적인 progesterone을 분비하는데 중요하게 작용한다. 이 과정에서 rat를 비롯한 설치류는 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD)가 필수적으로 필요하다. 20 α -HSD는 progesterone을 생리학적으로 활성이 없는 20 α -dihydroprogesterone(20 α -OHP)으로 대사하는 효소로서 rat 황체기능 조절에 중요한 역할을 담당하며 난소뿐만 아니라 정소와 부신 등에서도 존재하고 있다고 알려져 있다.

20 α -HSD를 정제한 결과 분자량은 33kd로 동일하나 성질이 다른 2종류의 isozyme, HSD-1과 HSD-2가 존재하고 있고 아미노산 조성은 거의 비슷하지만 lysine의 함량이 다소 차이가 있다. 20 α -HSD 활성은 퇴행된 구세대의 황체에서 대부분이 존재하며 새롭게 형성된 신생황체에는 20 α HSD-1 활성만이 존재하고 발정휴지기의 rat의 황체조직에서 검출된 각 20 α -HSD isozyme의 높은 활성은 구황체에서 주로 존재한다. 또한 20 α -HSD 활성의 증가는 20 α -HSD의 양성세포수의 증가와 깊은 관련이 있으며 흥미있는 사실은, 면역조직화학적인 방법에 의해 난포액과 성숙난포의 내협막세포에 20 α -HSD의 높은 활성이 확인되었다. 20 α -HSD 활성은 난소에 존재하는 황체세포와 난포의 생존기구에 깊은 관련이 있는 것으로 사료된다.

한편, 한우에 있어서 황체는 다른 동물과 마찬가지로 황체세포는 난포의 힘막세포 유래의 소형황체세포(SLC)와 과립막세포 유래의 대형황체세포(LLC)와 비황체세포로 구성되며 SLC와 LLC는 크기뿐만 아니라 형태적, 기능적 및 호르몬에 대한 반응에 차이가 있다. 퇴행기의 황체를 제외한 번식주기 중에 있는 소의 황체는 대형 황체세포에 비해 소형 황체세포가 많이 포함되어 있으며 황체조직에는 다양한 성장인자를 분비하며 황체일령에 따라 분비양상이 다르다.

소의 황체기능의 제어에는 LH 및 PGF_{2α}에 황체 자체에서 합성되거나 황체형성시 유입된 성장인자가 autocrine/paracrine양식에 의해 중요하게 작용한다. 급후, 난소내 황체기능을 해석하기 위해서는 황체세포의 성장인자의 합성과 생리적 역할, 황체세포의 기능에 있어서 이들 성장인자의 역할과 상호관계에 대해 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Ⅶ. 인용문헌

1. Baird, D. T. 1992. Symposium 4. Control and Manipulation of Corpus Luteum Function. Chairperson: D. Schams (Germany); Luteotrophic control of the corpus luteum. *Animal Reproduction Science*, 289:95-102.
2. Balogh, K., W. R. Kidwell and W. G. Wiest. 1966. Histochemical localization of rat ovarian 20α -hydroxy-steroid dehydrogenase activity initiated by gonadotrophic hormone administration. *Endocrinology*, 78:75-81.
3. Bao, B., G. W. Smith, Z. Z. Xu, M. F. Smith, R. S. Youngquist and H. A. Garverick. 1995. Expression of luteinizing hormone receptors (LHR), cytochrome P450 side chain cleavage (P450_{sc}), and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) mRNAs in bovine corpora lutea during the early-to mid-luteal phase. *Biology of Reproduction, Suppl.*, Vol. 52. P. 67.
4. Chen, Q., C. D. Nancarrow, and F. Sweet. 1987. Isolation of 3β , 20α -hydroxysteroid oxidoreductase from sheep fetal blood. *Steroids*, 49:477-496.
5. Del Vecchio, R. P., J. K. Thibodeaux and W. Hansel. 1995. Contact-associated interactions between large and small bovine luteal cells during the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, 12:25~33.
6. Eckstein B., M. L. N. Raanam, S. Cohen and A. Nimrod. 1977. The appearance of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in preovulatory follicles of immature rats treated with pregnant mare serum gonadotropin. *J. Steroid Biochem.*, 8:213-216.
7. Einspanier, R., A. Miyamoto, D. Schams, M. Mller and G. Brem. 1990. Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-1 in luteal tissue during the oestrous cycle and pregnancy of cows. *Reprod. Fert.*, 90:439-445.
8. Fuks, A. S. and Y. Weinstein, 1979. 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (20α -HSD) activity in New Zealand mice T lymphocytes and bone marrow cells: effect of age, sex, and castration. *J. Immunol.*, 123:1266-1271.
9. Garverick, H. A., W. G. Zollers, Jr. and M. F. Smith. 1992. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Animal Reproduction Science*, 28:111-124.
10. Grazul-Bilska, A. T., L. P. Reynolds, M. L. Johnson, A. Jablonka-Shariff, J. Bilski and D. A. Redmer. 1995. Connexin 43 (CX43) in bovine corpora lutea (CL) throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, Vol. 52. P 109.
11. Greef, W. J. and G. H. Zeilmaker. 1978. Regulation of prolactin secretion during the luteal phase in the rat. *Endocrinology*, 102: 1190-1197.
12. Greene, M. L. and J. L. Pate. 1995. Differential effects of cytokines on bovine luteal cells from early, mid and late stages of the estrous cycle. *Biology of Reproduction Suppl.*, Vol. 52. P. 65.
13. Hansol, W. and J. P. Dowd. 1986. Hammond memorial lecture, New concepts of the control of corpus luteum function. *J. Reprod. Fert.*, 78:755-768.
14. Hsueh, A. J. W., E. Y. Adashi, P. B. C. Jones and T. H. Welsh. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.*, 5:76-113.
15. Kawakami, S., T. Ochi and M. Shine. 1980. Effects of FSH, LH and PGF₂ α on the cell number and steroid secretion by bovine granulosa and luteal cell *in vitro*. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 25:30-36.
16. Leavitt, W. W., R. W. Lowenhaupt, G. C.

- Blaha, A. L. Kennan and R. K. Meyer. 1972. Steroidogenic function of luteinized ovarian grafts in the hepatic portal circulation of ovariectomied rats. *Endocrinology*, 90:362-370.
17. Lei, Z. M., N. Chegini and Ch. V., Rac. 1991. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biology of Reproduction*, 44:1148-1156.
 18. Mastuda, J., K. Noda, K. Shiota and M. Takahashi. 1990. Participation of ovarian 20α -hydroxysteroid dehydrogenase in luteotropic and luteolytic processes during rat pseudopregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 88:467-474.
 19. Matsuyama, S., K. Shiota and M. Takahashi. 1990. Possible role of transforming growth factor- β as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell cultures. *Endocrinology*, 127:1561-1567.
 20. Mcardle, C. A. and A. P. Holtorf. 1989. Oxytocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture : Effects of Insulin-like growth factor I, Insulin and prostaglandin. *Endocrinology*, 124:1278-1286.
 21. McLean, M. P., S. E. Nelson, J. T. Billheimer and G. Gibori. 1992. Differential capacity for cholesterol transport and processing in large and small rat luteal cells. *Endocrinology*, 131:2203-2212.
 22. McNatty, K. P., D. A. Health, K. M. Henderson, S. Lun, P. R. Hurst, L. M. Ellis, G. W. Montgomery, L. Morrison and D. C. Thurley. 1984. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J. Reprod. Fert.*, 72:39-53.
 23. Mori, M. and W. G. Wiest. 1979. Purification of rat ovary 20α -hydroxysteroid dehydrogenase by affinity chromatography. *J. Steroid Biochem.*, 11:1443-1449.
 24. Murakami, N., M. Takahashi, Y. Suzuki, K. Homma, 1982. Responsiveness of dispersed rat luteal cells to luteinizing hormone and prolactin during the estrous cycle and early pseudopregnancy. *Endocrinology*, 111:500-508.
 25. Murakami, N., M. Takahashi and Y. Suzuki. 1978. Conditions for establishment of reflex ovulation in light estrous rats. *Endocrinol. Japan*, 25:299-303.
 26. Naito, H., M. Takahashi and Y. Suzuki. 1981. Light-and-dark signal for the initiation of prolactin surges in cervically stimulated rats. *Endocrinol. Japan*, 28:151-156.
 27. Nakajin, S., Y. Kawai, S. Ohno, and M. Shinoda, 1989. Purification and characterization of pig adrenal 20α -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid Biochem.*, 33:1181-1189.
 28. Nancarrow, C. D., M. A. Sharaf and F. Sweet. 1981. Purification of 20α -hydroxysteroid oxidoreductase from bovine fetal erythrocytes. *Steroids*, 37:539-553.
 29. Nelson, S. E., M. P. Mclean, P. G. Jayatilak and G. Gibori. 1992. Isolation, Characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology*, 132:954-966.
 30. Noda, K., K. Shiota, H-H. Seong, and M. Takahashi. 1992. Changes in two kinds of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase during the luteal phase in the rat. *J. Reprod. Develop.*, 38:49-53.
 31. Noda, K., K. Shiota and M. Takahashi. 1991. Purification and characterization of rat ovarian 20α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1979:112-118.
 32. Pineda, J. A., M. E. Salinas and J. C. Warren. 1985. Purification and characterization of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase from bull testis. *J. Steroid Biochemistry*, 23(6A):1001-1006.

33. Rabe, T., L. Kiesel, and B. Runnebaum, 1982. Partial characterization of the cytoplasmic 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (EC 1.1.1.149) of the human placenta at term. *J. Steroid Biochem.*, 16:737-743.
34. Roders, R. J., J. D. O'shea and J. K. Findlay. 1983. Progesterone production in vitro by small and large ovine luteal cells. *J. Reprod. Fert.*, 69:113-124.
35. Ryan, K. J. 1979. Granulosa-Theca cell interaction in ovarian steroidogenesis. *J. Steroid Biochem.*, 11:799-800.
36. Sato, F., Y. Takaki, and M. Shikita, 1972. 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase of porcine testes: Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 247:815-823.
37. Seong, H-H., K. Shiota, K. Noda, A. Ogura, T. Asano and M. Takahashi. 1992. Expression of activities of two 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in rat corpora lutea. *J. Reprod. Fert.*, 96:573-580.
38. Shiota, K., H-H. Seong, K. Noda, N. Hattori, A. Lkeda, A. Ogura, S-I. Ltagaki, M. Takahashi, and T. Ogawa. 1993. 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat placenta. *Endocrine J.*, 40:673-681.
39. Shiota, K., N. Furuyama, A. Ogura, N. Hattori, H-H. Seong, K. Noda and M. Takahashi. 1990. Rat placental lactogens (PL): Novel PL Molecules and Regulation of their Secretion. *Placenta Conference (Tokyo Japan)*, 2:66-77.
40. Shirasawa, E., M. Takeshita and Y. Yoneyama. 1980. Purification of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase from human erythrocytes. *Experientia.*, 36:1156-1161.
41. Smith, M. S., M. E. Freeman and J. D. Neil. 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96:219-226.
42. Smith, M. S. and J. D., Neil, 1976. Termination at midpregnancy of the two daily surges of plasma prolactin initiated by mating in the rat. *Endocrinology*, 98:696-701.
43. Suzuki, K. and B. I. Tamaoki, 1979. Enzymological studies of rat luteinized ovaries in relation to acute reduction of aromatizable androgen formation and stimulated production of progestins. *Endocrinology*, 104:1317-1323.
44. Takahashi, M., K. Shiota and Y. Suzuki, 1978. Preprogramming mechanism of luteinizing hormone in the determination of the lifespan of the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 102:494-498.
45. Takahashi, M. 1984. Functional differentiation of the rat luteal cells. In: *Endocrine Correlates of Reproduction* (Ochiai, K., Y. Arai, T. Shiota and M. Takahashi, eds.) *Japan Sci. Soc. Press, Tokyo /Springer-Verlag, Berlin*, P. 305-315.
46. Tsafiriri, A. and B. Eckstein. 1986. Changes follicular steroidogenic enzymes following the preovulatory surge of gonadotropins and experimentally- induced atresia. *Biol. Reprod.*, 24:783-787.
47. Wang, W. and R. A. Milvae. 1995. Expression of luteal mRNA encoding cholesterol side-chain cleavage enzyme during the bovine estrous cycle and after PGF $_2\alpha$ administration. *Biology of Reproduction. Suppl.*, Vol. 52, P. 108.
48. Wiest, W. G., W. R. Kidwell and K. Balogh. 1968. progesterone catabolism in the rat ovary: A regulatory mechanism for gestational potency during pregnancy. *Endocrinology*, 82:844-859.
49. Wiltbank, M. C. and Niswender. 1992. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the

- corpus luteum in domestic ruminants, *Animal Reproduction Science*, 28:103-110.
50. Yuan, W. and M. C. Lucy. 1995. Effect of GH on *in vitro* progesterone synthesis and Gene expression of LH, FSH and GH Receptors and steroidogenic enzymes in porcine Luteal cells during Mid-pregnancy. *Biology of Reproduction*, Suppl., Vol. 52. P. 66.
51. 성환후, 오성종, 양보석, 이명식, 백광수, 정진관, 조병대. 1994. 한우난소 황체세포의 체외배양에 있어서 progesterone분비에 대한 LH 및 $PGF_{2\alpha}$ 의 첨가효과에 관한 연구. *한국축산학회지*, 36: 623-629.
52. 성환후, 오석두, 이병오, 윤창현. 1995. 임신 rat 난소에 있어서 20α -Hydroxysteroid dehydrogenase(20α -HSD)의 분포와 생리적 역할에 관한 연구. *한국축산학회지*, 37:59-65.
53. 정진관, 성환후, 오성종, 양보석, 이명식. 1994. 한우에 있어서 발정주기중 황체의 특성과 혈청중 Progesterone수준 변화에 관한 연구. *한국축산학회지*, 36: 32-38.