韓國家畜繁殖學會誌 21(3) : 265~274(1997)
Korean J. Animal Reprod.

PMSG 반복투여가 Rat의 과배란에 미치는 영향에 대한 면역조직화학적 연구
2. 투여회수에 따른 정상난포와 퇴축난포의 차이+

곽수동 · 고필옥 · 김종섭
경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

Immunohistochemical Study on the Superovulation Effected by Repeat of PMSG Administration in Rats
2. Healthy and Atretic Follicles Following Frequency of PMSG Administrations

Kwak, S. D., P. O. Koh and C. S. Kim
Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

The purpose of this study was attempted to investigate the appearances of healthy or atretic follicles in ovaries following repeats of pregnant mare serum gonadotropin(PMSG) treatments for superovulation in nulliparous rats.

Thirty two rats(Sprague-Dawely, about 200-250 gm) were randomized into 4 groups. Control group rats were sacrified at estrus phase confirmed by vaginal smear. PMSG-treated group 1 rats, PMSG-treated group 2 rats and PMSG-treated group 3 rats were sacrified at 48 hrs after injection once with PMSG 25 IU, after 2 repeated injection by a week interval, and 3 repeated injection, respectively.

The ovaries of rats were removed and then sections by paraffin embedding were stained with H-E or immunohistochemical staining using proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody (PCNA m Ab) and apoptotic kit.

The criteria of follicle classification was based as small follicles with preantral follicles with 2~4 layers of granulosa cells surrounding the oocyte, as secondary follicles with more than 5 layers of granulosa cells and early signs of antral cavity or with small clefts on either side of the oocytes, and as tirtiary follicles with a single medium sized antral cavity or large well-formed antral cavity, respectively.

The proportions of atretic follicles from small and middle follicles in immunohistochemical staining using PCNA m Ab were 17.9% and 21.3% in control group, 15.5% and 23.5% in PMSG-treated group 1, 24.3% and 26.7% in PMSG-treated group 2, 18.1% and 30.2% in PMSG-treated group 3, respectively.

+ 이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Groups with atretic follicles of higher proportion were ordered as PMSG-treated gorup 3, PMSG-treated group 2, PMSG-treated group 1 and control group. The proportions of positive cells in small, middle and large follicles were 31.1%, 33.5% and 28. 5% respectively. The follicles with positive cells of higher proportion were ordered middle, small and large follicles.

In immunohistochemical staining using apoptotic kits, small follicles in all 4 groups did not contain positive cells, and proportions of atretic follicles from middle and large follicles were 24.9, 30.7, 33.8 and 40.1% in control, PMSG-treated group 1, PMSG-treated group 2 and PMSG-treated group 3, respectively.

These results suggested that repeats of PMSG treatment increased proportion of atretic follicles in ovaries, and middle follicles are more quickly developing than small or large follicles
(Key words : PMSG, Ovary, Atretic follicles, PCNA, Apoptosis, Rat)

I. 서 론

소의 양쪽 난소에는 태생기에는 약 15만개, 돼지는 6만개 정도의 원시난포를 함유하고 있다. 이들 난포들은 태생기부터 발달과 퇴축이 진행되며 소모되고 있으며 동물이 성숙하여 성주기가 반복되고 있는 동안에도 매 성주기 마다 많은 수의 원시난포가 동원되어 발달을 시작하나 10% 정도로 일정한 수의 난포만 배란이 일어난다 (Chiras와 Greenwald, 1980; Hirshfield, 1984; Kaur와 Guraya, 1983; Nicoll와 Racey, 1985) 이와 같이 배란에 도달하는 난포의 수는 아주 적어 일생동안 수 백개에 불과하고 나머지 난포들은 성장 도중에 퇴축난포 (폐쇄난포, atretic follicle)가 되거나 성숙후에도 장기간 잔류한 병적인 상태의 난포낭종(follicular cyst)이 되기도 한다.

성주기마다 많은 난포가 성장이 시작된 후 어떻게 10% 정도만 선택되고 나머지는 퇴축되는지는 아직 불명한 상태이고 성장 중의 난포들 중에 중도에 퇴축난포가 되었음을 구별하기도 퇴축하는 말기를 제외하고는 거의 불가능하다 (Nayudu와 Osborn, 1992; 김 등, 1987; 김 등, 1992).

이때까지 퇴축하는 난포나 난포낭종을 가능한 초기에 현미경적으로 구별하려고 시도하여 여러 가지 방법이 보고되어 있다. 그 중에도 주로 조직학적 방법이 가장 많이 응용되고 있다 (Hirshfield, 1984; Kaur와 Guraya, 1983; Nicoll와 Racey, 1985; Billig 등, 1996. Butcher와 Kirkpatrick-Keller, 1984; Pedersen와 Peters, 1971; Tilly 등, 1995; Van Cappellen 등, 1993; Warembourg, 1974). 그러나 실제 조직학적 관찰에서는 한계가 불명확한 점이 너무 많고 퇴축이 일어나는 초기에는 정상난포와 구별이 불가능하다 (김 등, 1987). 그러므로 새로운 방법이 요구되고 있다.

근래에는 bromodeoxyuridine(Brdur)와 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 등에 대한 단클론항체(monclonal antibody, m Ab)를 이용하여 면역조직화학적 방법으로 복제기에 형성되는 DNA의 일부 성분에 의해 증식세포를 검색하는 방법이 개발되어 응용되고 있고 (Meredith와 Butcher, 1985; Ohmori 등, 1992; Raza 등, 1985; 곽 등, 1993, 1994, 1996, 1997; 고와 곽, 1997), 또 apoptotic kit를 이용하여 소멸세포를 검색하는 방법이 개발되어 응용되고 있다 (Auletta등, 1994; Billig 등, 1994; Bom 등, 1991; Jolly 등, 1994).

난소낭종은 난포벽세포가 정지상태에 있거나 변성괴사가 일어나지만 성장난포는 성숙할 때까지 난포세포(과립막세)가 분열증식하고 퇴축난포는 난포세포는 분열증식하지 않고 정지상태이거나 생리적 정상적 변성소멸이 많이 일어난다 (Auletta 등, 1994; Bom 등, 1991; Jolly 등, 1994). 이러한 원리에 착안하여 면역조직화학적 방법으로 Brdur와 PCNA 등의 m Ab를 이용하고, apoptotic kit를 이용하여 과립막세포들 중의 증식세포와 소멸세포들의 출현양상을 조사하고 H-E 염색표본을 이용하여 이들 소견과 대비하여 퇴축난포와 정상난포의 구별이 가능할 것으로 생각된다.

난소에서 세포의 apoptosis에 대하여는 Auletta 등

(1994)은 퇴행하는 황체세포에서 소멸양성세포 비율에 대하여, Billig 등 (1994)은 GnRH가 난포의 과립세포막에 미치는 영향에 대하여, Jolly 등 (1994)은 과립막세포에 대하여 최근 소수예의 보고가 있고 소멸세포를 검색하는 kit도 1995년 부터 국내에서 소개하고 있다.

본 연구는 같은 랫드에 PMSG를 과배란에 3차까지 이용할 때에 이용회수에 따라 많은 난포들의 성장과정에서 중도 퇴축하는 양상에 대하여도 조사코자 면역조직화학적 방법으로 Brdur 및 PCNA 항체와 소멸세포 검색 kit를 이용하여 퇴축난포의 출현 양상을 조사코자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물 사육 및 성주기 조사

임신 경력이 없는 성숙 단계의 랫드 암컷(Sprague-Dawley, SD, 190~230 gm) 60두에서 질상피의 도말검사로써 4~5일의 정상적 성주기가 2회 이상 계속되는 것을 대상으로하여 이 중에 각 군별 10두씩 4개군으로 구분하였다.

2. 4개 실험군의 분류와 처치

제 1보와 같이 대조군, PMSG 1회 투여군, PMSG 2회 투여군, PMSG 3회 투여군 등의 4군으로 분류하고 난소를 채취하였다.

3. 면역염색에 의한 성장난포, 퇴축난포 및 난종성 난포의 조사

난소를 채취할 당일 ether로 마취하여 4% neutral buffered paraformaldehyde로 관류하고 개복하여 양측 난소를 채취한 후, 주위 지방조직을 제거하고 10% 중성 formalin으로 재고정하고 paraffin 절편 또는 동결절편을 만들어 일부 조직은 H-E 염색을 실시하고 일부 조직은 증식하는 과립막세포를 보유한 2차 난포에 대하여 조사하기 위하여 아래와 같이 (a) peroxidase antiperoxidase (PAP)법과 (b) avidin biotin peroxidase complex (ABC)법으로 면역염색을 동시에 실시하고 hematoxylin 으로 대조염색을 하였고 단, 조직절편에 Brdur m Ab를 이용할 rat는 각 군별로 2~3두씩 난소를 채취할 당일에 세포분열이 가장 많은 오전 8~9시에 Brdur(Sigma)를 체중 gm당 0.05~0.1 mg씩 복강내에 주사하고 1~2시간 경과시켰다. 또 소멸하는 과립막세포를 보유한 2차 난포 이상의 양상을 조사하기 위하여 아래와 같이 (c) Tunel 법을 실시하고 hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

1) PAP 법의 과정

Paraffin 조직절편 →탈 paraffin → Blocking of endogenous peroxidase; 1% H_2O_2 in methanol (25 min) → Denaturation; 2 N HCl(2~3 hr) → Dipping in buffer (5 mins) → Normal serum and Primary antibody (Brdur m Ab or PCNA m Ab, Oncogene Science) ; PBGT + 1차 항체 (mouse anti-Brdur Ig G, overnight) → Washing → Secondary antibody; goat anti-mouse Ig G (3~4 hr) → Washing → Tertialy antibody; mouse PAP (2~3 hr) → Washing → DAB (5~10 min) → 1% H_2O_2 sol (10 min) → Washing → Counterstain → Mount

2) ABC법의 과정

Primary antibody까지는 PAP법과 같이 진행 → ABC kit의 biotinylated antibody (30 min) → Washing in buffer → Vectastain ABC regent A + B sol (30~60 min) → Buffer (10 min) → DAB → 위의 PAP 법과 같이 진행

3) Tunel 법 (Oncor사 제품의 In Situ apoptosis detection kit를 이용함)

paraffin 조직절편 → 탈 paraffin → Proteinase K (15 mins) → Washing → 2% H_2O_2 (5 mins) → Equilibration buffer (5 mins)→ TdT enzyme (1 hr) → Stop / Wash buffer (10 mins) → Anti-digoxigenin-peroxidase (30 mins) →PAP 법과 같이 계속하였다.

Ⅲ. 결 과

과배란을 유기하여 난자를 채취하기 위하여 성숙단계의 임신경력이 없는 동일 암컷 랫드에 PMSG를 반

복 이용할 때에 매 회수에 따라 난소내 원시난포가 동원되어 성숙난포가 되는 동안 중도에 얼마나 더 많은 난포가 퇴축난포가 되는지를 조사하기 위하여 증식세포를 규명하는 Brdur m Ab와 PCNA m Ab를 이용한 면역조직화학적인 방법으로 과립막세포의 양성반응을 나타내는 난포를 대상으로하여 조사하고 H-E 표본의 난포와 비교 검토하였다.

면역염색과 H-E 염색표본에서 정상난포와 퇴축난포의 형태를 조사한바 PCNA와 Brdur m Ab를 이용한 면역염색에서는 과립막세포의 양성반응세포 출현여부에 따라 용이하게 구별할 수 있었고 그 기준은 H-E염색에서는 난포의 과립막세포의 밀도가 느슨하고 배열이 불규칙하거나 난포벽이 얇은 소난포와 중난포는 면역염색에서 양성반응세포가 없는 퇴축난포였고 과립막세포층이 얇고 난포강과 경계가 명확한 중난포와 대난포는 면역염색에서 양성반응 세포가 전연 없는 난포로 이들 난포들은 퇴축난포였고 양성반응세포가 극소수이며 편재하거나 염색성이 약한 것은 퇴축난포였고 정상난포에서는 양성반응세포의 분포는 균등하거나 난구쪽 또는 기저막 쪽에 많이 분포하였다. 그러나 대난포 중에 완전 성숙한 정상난포는 과립막세포 중에 양성반응 세포가 관찰되지 않고 난포막에서만 소수 관찰되었으나 과립막세포의 배열상태가 치밀하고 균일하여 정상난포로 인정되었다.

Brdur mAb를 이용한 랫드와 PCNA mAb를 이용한 랫드 난소조직에서 난포의 과립막세포의 양성반응세포 비율의 차이를 조사한바 PCNA mAb를 이용한 랫드의 난포에서 양성세포 비율이 10% 이상 높아 PCNA항체를 이용한 면역염색으로 조사하였다(Fig. 1-4).

난포의 크기에 따라 제 1보의 기준과 같이 소난포, 중난포, 대난포로 구분하고 단, 성숙한 대난포는 양성반응 세포를 보유하지 않았으므로 전체 대난포는 제외하고 소난포와 중난포를 대상으로하여 위와 같이 과립막세포의 양성반응세포가 소난포는 1개 이상, 중난포는 5개 이상의 양성반응세포를 보유한 난포를 퇴축난포로 규정하고 퇴축난포의 비율을 조사한바 Table 1과 같이 대조군은 소난포는 17.9%, 중난포는 21.3%, 1회 투여군은 소난포는 15.5%, 중난포는 23.5%였고 2회 투여군은 소난포는 24.3%, 중난포는 26.7%였고 3회 투여군은 소난포는 18.1%, 중난포는 30.2%였다.

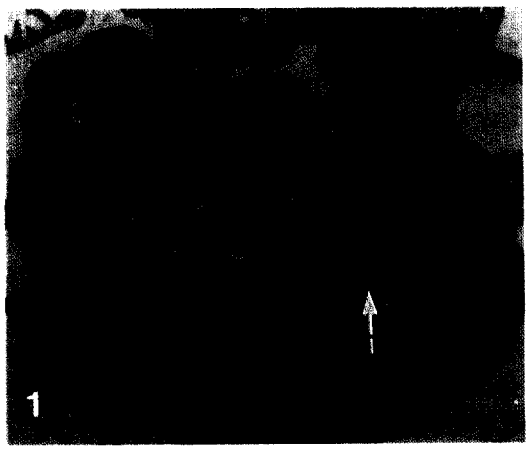

Fig. 1. Many developing or atretic follicles are seen in prepartion of a ovary in a rat of PMSG-treated group 1. Healthy developing follicles contained granulosa cells stained with brown color by PCNA monoclonal antibody. Immunohistochemical stain. ×10.

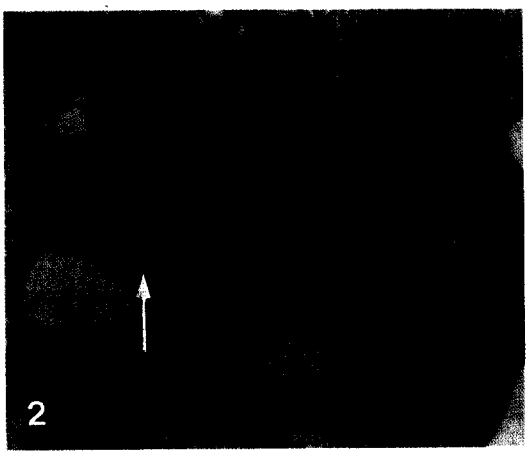

Fig. 2. Higher power of lower right area(arrow) in fig 1. some growing and healthy follicles (arrow is noted above fig 1) are stained with brown color and some nongrowing or atretic follicles are not stained. Imunohistochemical stain. ×25.

실험군별로 퇴축난포를 보유한 비율이 높은 순서는 3회 투여군, 2회 투여군, 1회 투여군, 대조군 순으로 PMSG투여 3군은 대조군보다 퇴축난포의 보유율이

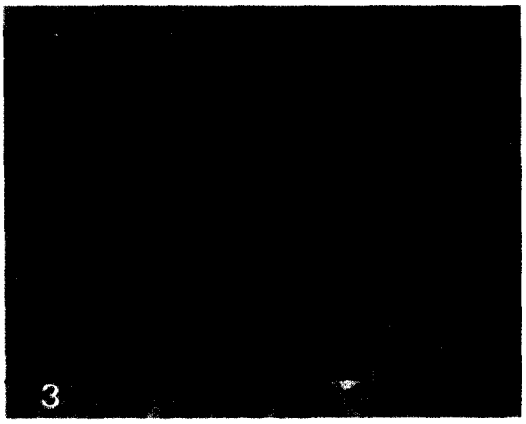

Fig. 3. Two small follicles with nucleolus(upper) and two large follicles (right upper) appeared to be stained with brown color by PCNA monoclonal antibody in PMSG-treated group 1. other follicles are not stained with above. Immunohistochemical stain. ×25.

Fig. 4. A large follicle with positive brown color(center) and some large follicles without positive brown color by PCNA monoclonal antibody are seen in PMSG-treated group 3. Immunohistochemical stain. ×25.

높았고 PMSG투여군 중에서는 투여회수가 증가할수록 비율이 높아 퇴축난포의 수가 증가됨을 알 수 있었다.

Table 1. The proportion(%) of atretic follicles from small and middle follicles by using PCNA monclonal antibody

Size of follicles	Control group	Group 1	Group 2	Group 3
Small	17.9	15.5	24.3	18.1
Middle	21.3	23.5	26.7	30.2

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

Group 1 : PMSG-treated group 1

Table 2. The proportion(%) of positive cells from granulosa cells in each follicle types

Small follicles	Middle follicles	Large follicles
31.1	33.5	28.5

난포의 발달의 속도를 추정하기 위하여 크기별 PCNA m Ab의 양성반응 세포보유 비율을 조사한바 Table 2와 같이 소난포는 31.1%, 중난포는 33.5%, 대난포는 28.5%로 중난포가 벽이 두텁고 세포수가 많고 양성반응세포의 비율이 높아 발달이 가장 왕성한 것으로 인정되었다.

난포에서 소멸세포를 보유한 퇴축난포를 조사하기 위하여 apoptotic kit를 이용한 Tunel법에 의해 난포내에서 양성반응세포의 분포를 조사한바(Fig. 5~6),

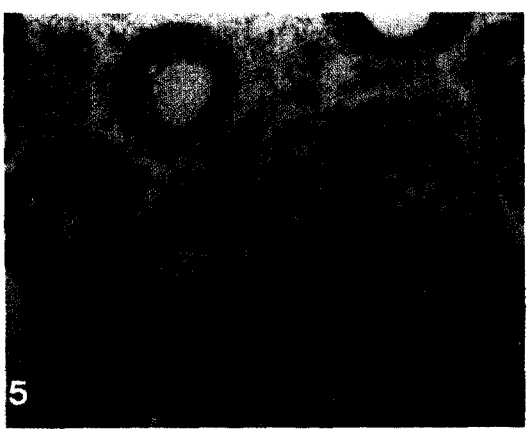

Fig. 5. Some atretic follicles with aopoptotic granulosa cells are seen to be stained with positive brown color by apoptotic kit in PMSG-treated group 1. Immunohistochemical stain by Tunel method. ×25.

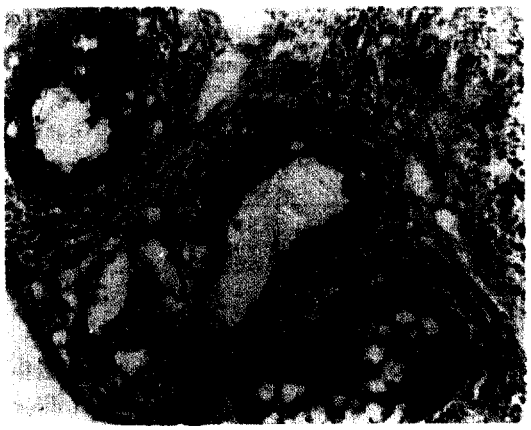

Fig. 6. Higher power of three atretic follicles in fig 5 are stained with brown color by apoptotic kit. Immunohistochemical stain by Tunel method. ×50.

난포내서 양성반응세포는 균등히 분포하거나 난포강 쪽에 많이 분포하였고 이탈된 세포나 핵붕괴된 세포가 많이 염색되어 난포의 퇴축은 난포강 부위에서 먼저 일어남을 알 수 있었다. 또 H-E표본에서와 Brudur 및 PCNA의 mAb를 이용한 면역염색의 정상난포와 퇴축난포의 기준과 비교한 바, Tunel법에 의할 때는 중난포와 대난포는 5개 이상의 양성반응세포를 보유한 난포는 퇴축난포로 규정되었고 소난포에서는 전체실험군에서 양성반응 난포가 관찰되지 않았다. 그래서 중난포와 대난포만을 대상으로하여 조사한바 이들 두 형의 난포를 합한 수 중에 apoptotic kit를 이용하였을 때의 퇴축난포의 비율은 Table 3과 같이 대조군은 24.9%, 1회 투여군은 30.7%, 2회 투여군은 33.8%, 3회 투여군은 40.1%가 퇴축난포로 투여회수가 증가할수록 퇴축난포의 비율이 높았고 PCNA m Ab를 이용한 면역염색의 퇴축난포의 비율과도 유사한 결과였다.

Table 3. The proportion(%) of atretic follicles from middle and large follicles by using apoptotic kits

Control group	Group 1	Group 2	Group 3
24.9	30.7	33.8	40.1

Group 1 : PMSG-treated group 1

Ⅳ. 고 찰

퇴축난포의 규정에 관하여서는 조직학적으로는 과립막세포 핵의 농축과 붕괴 및 배열, 난포막의 비대와 굴곡 섬유화 등의 소견(Hirshfield, 1984; Kaur와 Guraya, 1983; Billig 등, 1996; Nicoll와 Racey, 1985; Nayudu 와 Osborn, 1992; Butcher 와 Kirkpatrick-keller, 1984; Pedersen와 Peters, 1971; Van Cappellen 등, 1993; Warembourg, 1974)으로 구분하고 있으나 H-E 표본에서는 한계불명한 점이 많아 퇴축난포의 비율을 조사하기는 불가능하다.

^{3}H-thymidine(^{3}H-TdR)를 이용한 방사선자기법에 의한 정상난포의 조사에서 Hirshfield 등 (1984)은 rat에서 건강한 성장난포는 과립막세포가 증식하고 증식세포는 ^{3}H-TdR와 결합하여 표지됨을 착안하여 방사선 자기법으로 조사한 바, 모든 건강한 난포는 ^{3}H-TdR에 표지된다고 하였고 또 Pedersen와 Peters (1971)는 마우스에서 임신기간 중에 중간 크기의 난포는 5.6~20.9%, 대난포는 15.9~22.2%가 ^{3}H-TdR에 표지되었다고 하였고, Chiras 와 Greenwald(1980)는 과립막세포가 2~3층인 소난포는 60~80%가 ^{3}H-TdR에 표지되었다고 하였다.

전체난포중에 퇴축난포의 비율에 관하여는 Butcher와 Kirkpatrick-Keller (1984)는 SD 랫드에서 핵농축 등의 조직학적 소견에 의해 조사한 바, 본 조사의 중난포에 해당되는 160~280 ㎛ 되는 난포는 50%가 퇴축난포였고, 80 ㎛ 보다 적은 소난포나 400 ㎛ 보다 큰 대난포에서는 퇴축난포가 관찰되지 않았다고 하였다. Huseh 등 (1994)은 조사 방법의 제시 없이 강난포 중에서 퇴축난포의 비율은 랫드에서 강난포의 70%가, 마우스에서 50%가, 토끼에서 60%가, 사람에서 50~75%가 퇴축난포라고 하였다.

본 조사에서는 면역조직화학적 방법으로 PCNA mAb를 이용하였을 때 실험군별로 증식세포를 보유한 난포를 조사한 바, 대난포 중에 완전 성숙난포는 증식세포를 보유하지 않아 제외하고 소난포와 중난포를 대상으로하여 조사비교한 바, 대조군의 소난포와 중난포가 각각 17.9%, 21.3%로 Butcher와 Kirkpatrick-keller (1984)의 50%와 Huseh의 70%보다 월등히 낮았으나 Chiras와 Greenwald (1980)의 20~40%

와는 유사한 편이다. 그러나 apoptotic kit를 이용한 Tunel법으로 조사한 결과는 소난포는 관찰되지 않아 PCNA mAb를 이용하였을 때와는 상이하였고, Butcher와 Kirkpatrick-Keller (1984)의 소난포에서는 퇴축난포가 관찰되지 않았다는 소견과는 일치하였다.

성 hormone의 영향에 대하여는 Chiras와 Greenwald (1980)는 hamster에서 혈액내 FSH의 peak일 때 ^{3}H-TdR와 결합된 세포가 가장 많고 과립막세포가 2~3층인 난포는 60~80% 난포가 결합되었다고 하여 소난포 중에 퇴축난포가 20~40%임이 계산된다.

본 조사에서 퇴축난포의 비율이 PMSG 1회 투여군은 PCNA mAb를 이용하였을 때 소난포와 중난포에서 각각 15.5%, 23.5%였고 apoptotic kit를 이용한 Tunel법에서 중난포와 대난포의 합은 30.7%, 2회투여군은 PCNA mAb를 이용하였을 때 24.3%, 26.7%였고 Tunel법에서 중난포와 대난포의 합은 33.8%, 3회 투여군은 PCNA mAb를 이용하였을 때 18.1%, 30.2%였고 Tunel법에서 중난포와 대난포의 합은 40.8%로 Tunel법에 의해 apoptosis가 일어나는 난포의 비율을 PCNA에 의해 증식이 일어나지 않는 난포의 비율보다 월등히 높았다. 또 PMSG투여는 FSH투여보다 퇴축난포의 비율이 더 높은 편이고 PMSG 투여군이 대조군보다 또 투여회수의 증가에 따라 퇴축율이 높았다. 이러한 결과는 PMSG의 투여에 의한 광범한 많은 난포에 자극을 주기 때문으로 생각되며 PMSG의 과배란 응용시는 배란되는 난자도 많지만 난포의 발달과정에서 퇴축이 많아 난포의 소모가 많아지고 우수한 난자의 비율이 낮아짐을 알 수 있었다.

본 실험에서 이용한 PMSG는 임신말의 혈청에서 분리한 성선자극 hormone으로 난포의 발육 황체의 형성, estrogen과 luteininzing hormone(LH)의 분비촉진작용이 있어 난소의 기능향상을 위한 치료재로 많이 이용된다. 그러므로 PMSG는 난포에 과다 자극하여 난소기능을 일시적으로 향상시키면서도 과립막세포의 apoptosis를 많이 일으켜 퇴축난포의 비율을 높이는 역작용도 있음을 알 수 있었다.

난포의 크기에 따른 발달속도의 차이에 대하여는 언급된바 없고 과립막세포층에서 PCNA mAb의 양성반응세포의 분포에 대하여는 Oktay와 Schenken (1995)은 PCNA항체로 면역염색한 바, 랫드에서 원시난포는 염색되지 않았고 1차 난포, 전강난포, 강난포에서 과립막세포층에 양성반응세포가 균등히 분포하고 있었고 퇴축하는 난포는 소수 세포만이 제한적으로 관찰되었다고 하였고, Huseh 등(1994)는 퇴축난포의 소견인 과립막세포의 핵농축이 난포강쪽에 먼저 나타난다고 하였다. 본 면역염색에서는 중난포가 양성반응세포의 비율이 가장 높아 발달이 왕성한 것으로 생각되었고 성숙한 대난포는 정상인 난포이나 양성반응세포가 관찰되지 않아 발달이 중지되었음이 표시되고 있었다. 또 정상난포의 양성반응세포의 분포는 균등하거나 난구쪽 또는 기저막쪽에 많이 분포하였고 Tunel법에 의한 apoptosis 양성반응세포는 균등히 분포하거나 난포강쪽에 많이 분포하여 난포가 퇴축이 시작할 때는 난포강 부위에서, 발달할 때는 기저부에서 먼저 일어남을 알 수 있었다.

Hormone이 난포의 apoptosis에 미치는 영향에 대하여 Billig 등(1993, 1994)은 GnRH와 androgen은 난포의 과립막세포에서 DNA fragmentation을 증가시켜 apoptosis를 증가시키고 FSH와 estrogen은 DNA fragmentation을 감소시켜 apoptosis를 억제한다고 하였다.

퇴축난포와 과립막세포의 apoptosis에 관하여는 Billig 등 (1996)은 난포가 퇴축할 때는 과립막세포의 apoptosis가 일어난다고 하였고 Wandji 등(1996)은 퇴축난포를 퇴축이 단계에 따라 초기, 중기, 심한기의 3기로 구분한 바 있고 Huseh 등(1994)은 퇴축하는 강난포에서 과립막세포의 핵농축된 세포 비율이 퇴축의 1단계는 10%이하, 2단계는 10~30%, 3단계는 과립막세포 전체가 줄어든다고 하여 퇴축의 기에 따라 aopoptotic cell의 비율이 다를 것으로 생각된다. Jolly 등(1994)은 소에서 난포의 DNA를 분석한 결과 apoptosis는 퇴축난포의 초기소견이며 건강난포에도 76%에서 관찰되었다고 하였으나 퇴축난포의 한계기준에 대하여는 조사된 바 없다.

본 조사에서도 과립막세포의 apoptosis는 퇴축난포의 한 소견으로 중난포 이상에서 관찰되었고 한 난포에서 5개 이상의 양성반응세포가 있는 난포를 퇴축난포로 규정하였으나 건강하게 발달하는 난포에서는 관찰되지 않았다.

V. 적 요

과배란을 유기하기 위하여 성숙단계의 임신경력이 없는 동일 암컷 rat(SD)에 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)를 1회, 2회, 3회씩 반복 투여할 때에 이용회수의 반복에 따라 원시난포가 동원되어 성숙난포가 되는 동안 중도에 얼마나 많은 난포가 퇴축난포가 되는지를 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)의 monoclonal antibody (m Ab) 그리고 apoptotic kit를 이용한 면역조직화학적인 방법으로 과립막세포의 양성반응을 나타내는 난포를 대상으로하여 조사한 바는 다음과 같다.

난포를 크기에 따라 소난포, 중난포, 대난포로 구분하고 그중 소난포와 중난포를 대상으로하여 PCNA m Ab를 이용해 퇴축난포의 비율을 조사한 바, 대조군은 소난포는 17.9%, 중난포는 21.3%, 1회 투여군은 소난포는 15.5%, 중난포는 23.5%였고 2회 투여군은 소난포는 24.3%, 중난포는 26.7%였고 3회 투여군은 소난포는 18.1%, 중난포는 30.2%로 퇴축난포를 보유한 비율이 높은 순서는 3회 투여군, 2회 투여군, 1회 투여군, 대조군 순이었다.

난포의 발달의 속도를 추정하기 위하여 난포 크기별 양성반응 세포보유 비율을 조사한 바, 소난포는 31.1%, 중난포는 33.5%, 대난포는 28.5%로 중난포가 가장 발달이 왕성한 것으로 인정되었다.

Apoptotic kit를 이용한 면역염색에서 양성반응세포를 보유한 난포를 조사한 바 소난포에서는 전체 실험군에서 관찰되지 않았고 중난포와 대난포는 전체수 난포수 중에 대조군은 24.9%, 1회 투여군은 30.7%, 2회 투여군은 33.8%, 3회 투여군은 40.1% 였다.

이상에서 중난포가 가장 빠르게 발달하고 있음을 알 수 있었고 PMSG투여 3군은 대조군보다 퇴축난포의 비율이 높았고 PMSG 투여회수가 증가할수록 높아짐을 알 수 있었다.

VI. 인용문헌

1. Auletta, F. J., R. E. Williams, L. B. Kelm and H. Kenny. 1994. *In Situ* detection of apoptotic cells in the regressing sheep corpus luteum. Bibliography Reprod., p30
2. Billig, H., I. Furuta and A. J. W. Hsueh. 1993. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinology, 133: 2204-2212.
3. Billig, H., I. Furuta and A. J. W. Hsueh. 1994. Gonadotropin-releasing hormone directly inducees apoptotic cell death in the rat ovary : Biochemical and *in Situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. Endocrinology, 245-252.
4. Billig, H., S. Y. Chun, K. Eisenhauer and A. J. W. Hsweh. 1996. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated celldemise. Human Reprod. Update, 2(2): 103-117.
5. Bom, H. S., C. M. Yoon, D. S. Rew and S. K. Choi. 1991. Autoradiographic and immunohistochemical study on the proliferative kinetics of intestinal metaplasia. Korean J. Interanl. Medicine, 6(1): 8-15.
6. Butcher, R. L. and D. Kirkpatrick-Keller. 1984. Pattens of follicular growth during the four-day estrous cycle of the Rat. Biol. Reprod., 11:280-286.
7. Chiras, D. D. and G. S. Greenwald. 1980. Analysis of ovarian follicular development and thymidine incorporation in the cyclic golden hamster. Anat. Rec., 157: 309- 317.
8. Hirshfield, A. N. 1984. Continuous ^{3}H-Thymidine infusion: A method for the study of follicular dynamics. Biol. Reprod., 30:485-491.
9. Huseh, A. T. W., H. Billig and A. Tsafriri. 1994. Ovarian follicle atresia : A hormonally controlled apoptotic process. Endocrine Reviews, 15(6): 707-724.
10. Jolly, P. D., D. J. Tisdall, K. Heath, S. Lun and K. P. McNatty. 1994. Apoptosis of bovine granulosa cells occurs in healthy follicles or is an early event in follicle atresia. Biol. Reprod., 50:184.

11. Kaur, P. and S. S. Guraya. 1983. Follicular growth and kinetics during the estrous cycle, pregnancy and postpartum in the indian mole rat. Am. J. Anat., 166: 469-482.
12. Meredith, S. and R. L. Butcher. 1985. Role of decreased numbers of follicles on reproductive performance in young and aged rats. Biol. Reprod., 32: 788-794.
13. Nayudu, P. L. and S. M. Osborn. 1992. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95: 349-362.
14. Nicoll, M. E. and P. A. Racey. 1985. Follicular development, ovulation, fertilization and fetal development in tenrecs. J. Reprod. Fert., 74:47-55.
15. Ohmori, K. , Y. Hong and M. Fujiwara. 1992. *In situ* demonstration of proliferating cells in the rat central nervous system during experimental autoimmune encephlomyelitis. Evidence suffesting that most infiltrating T cells do not proliferate in the target organ. Lab. Invest., 66(1): 54-62.
16. Oktay, K., R. S. Schenken, and J. F. Nelson. 1995. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. Biology of Reproduction, 53: 295-301.
17. Pedersen, T. and H. Peters. 1971. Follicle growth and cell dynamics in the mouse ovary during pregnancy. Fertil. Steril., 22(1): 42-52.
18. Raza, A., C. Spiridonidis, K. Ucar, G. Richard and H. D. Preisler. 1985. Double labeling of S-phase murine cells with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe. Cancer Research, 45:2283-2287.
19. Tilly, K. I., B. Banerjee, P. P. Banerjee and L. Jonathan. 1995. Expression of the p53 and Wilm's tumor suppressor genes in the rat ovary : Gonadotropin repression *in vivo* and immunohistochemical localization of nuclear p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. Endocrinology, 136: 1394-1402.
20. Van Cappellen, W. A., P. Osman and H. A. M. Meijs-Roelofs. 1993. Model of antral follicle dynamics during the 5-day cycle in rats based on measurement of antral follicle inflow. J. Reprod. Fertil., 99:57-63.
21. Wandji, S. A., V. Srsen, A. K. Voss, J. J. Eppig and J. E. Fortune. 1996. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. Biol. Repod., 55; 942-948.
22. Warembourg, M. 1974. Radioautographic study of the guinia pig uterus after injection and incubation with ^{3}H-progesterone. Endocrinology, 94:665- 670.
23. 고필옥, 곽수동. 1997. 성 hormone이 rat 자궁 발달에 미치는 영향에 대한 proliferating cell nuclear antigen 항체의 면역조직학적 응용. 대한수의학회지, 37(2):235-462.
24. 곽수동, 고필옥, 김종섭. 1997. 과배란 유기된 rat 난소에 퇴축난포와 성장난포에 대한 면역조직화학적 연구. II 동원된 난포의 퇴축과 성당에 대하여. 대한수의학회, 37(1) :79-86.
25. 곽수동, 김종섭, 강정부. 1994. 닭의 대퇴부 골단조직의 세포증식에 대한 면역조직학적 관찰. 대한수의학회지, 34(2): 237-242.
26. 곽수동, 박성식, 강원화. 1993. Anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody를 이용한 Rat위와 장의 분열세포 분포에 대하여. 대한수의학회지, 33(4): 597-603.
27. 곽수동. 1996. 17 β-estradiol이 progesterone target cell 분포에 미치는 영향에 대한 면역조직화학적 연구. 2. 면역조직화학적 방법에 의한 증식세포수의 영향에 대하여. 대한수의학회, 36(1): 101-108.
28. 김문규, 이양한, 김종흡, 윤용달. 1997. 돼지 난소내 여포의 폐쇄에 따른 미세구조의 변화에 관한 연구. 한국동물학회지, 30(4) : 351-370.
29. 김종웅, 김성인, 윤용달, 김문규. 1992. 생쥐, 쥐

및 돼지의 난소내 난포의 폐쇄에 관한 조직화학적 연구. 한국가축번식학회지, 16(2); 165-173.

(접수일자 : 1997. 8. 18. / 채택일자 : 1997. 9. 20.)