발생과 생식 제1권 제1호, 25~28(1997)
Dev. Reprod. Vol. 1, No. 1, 25~28(1997)

재조합 인간 난포자극 호르몬이 체외배양중인 태아 난소조직의 에스트로젠 합성에 미치는 영향

이경아 · 조화정 · 윤세진 · 도병록 · 고정재 · 한세열 · 윤태기 · 차광렬
차병원 여성의학연구소

Effect of Recombinant Human FSH on the Estrogen Synthesis by Human Fetal Ovarian Tissues Cultured *In Vitro*

Kyung-Ah Lee, Hwa-Jeong Cho, Se-Jin Yoon, Byung-Rok Do, Jung-Jae Ko, Sei-Yul Han, Tae-Ki Yoon, and Kwang-Yul Cha
Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul 135-081, Korea

ABSTRACT

The present study was conducted to determine the effect of recombinant human follicle stimulating hormone (rhFSH) on the estrogen synthesis by human fetal ovarian tissues. Fetal ovaries were 18~19 weeks old (18 wks:n=1, 19 wks:n=2). One case of 19-week-old fetal ovaries were obtained from anencephalic fetus. Obtained ovaries were cleaned and diced around 600 μm pieces, and cultured in the sandwich agar bed system for 21~23 days. Estrone (E_1) and estradiol-17β (E_2) in the medium was measured by radioimmunoassay. Amount of E_2 synthesis was greater than E_1 in both normal cases. In contrast, fetal ovaries from anencephalic fetus did not produce neither E_1 nor E_2 in the presence or absence of rhFSH. Results suggest that the fetal ovaries have a capacity of estrogen production at 18~19 weeks of gestation. Existence of FSH receptor is also supposed. Different results by anecephalic fetal ovaries suggest the difference in the development between normal and anencephalic fetal ovaries.

Key words: Estrogen synthesis, Fetal ovary, *In vitro* culture, Recombinant human FSH.

서 론

인간 태아의 정소는 테스토스테론의 생성능력을 갖고 있으며 태아가 생성한 남성호르몬은 자신의 발달에 필요한 것으로 잘 알려져 있다. 반면에 태아 난소의 스테로이드 생성능력에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 이전에 행하여진 몇몇 연구는 태아의 난소조직을 체외배양하면서 기질을 첨가하여 보았을 때 이를 이용하지 못함을 관찰하여 에스트로젠의 생성이 없었다고 보고하였다 (Block, 1964; Jungmann & Schweppe, 1968; Payne & Jaffe, 1974). 그러나 에스트로젠의 생성을 관찰하지 못한 것은 실제로 기질의 선택이 잘못되었거나 혹은 그 당시에 사용했던 태아난소의 연령이 너무 어렸을 것이라고 생각되고 있다 (Gondos & Hobel, 1973). 이렇게 태아난소의 에스트로젠 생성능력이 있을 것이라고 사료되는 이유는 태아난소에는 태아정소의 Leydig cell과 유사한 형태를 갖는 스테로이드를 생성할 수 있는 세포가 있다는 연구보고가 있기 때문이다 (Huhtaniemi, 1994). 따라서 본 저자들은 태아난소의

스테로이드 생성능력을 관찰하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

본 실험에는 한쌍의 18주령과 두쌍의 19주령 태아난소를 사용할 수 있었는데, 19주령중 한쌍은 무뇌증 태아로부터 얻어진 난소였다. 적출된 난소들은 DMEM으로 잘 씻어주었고 주위의 조직들도 깨끗이 제거하였다. 잘 정리된 난소들은 약 600μm 정도 크기의 절편으로 자른 다음, 미리 37℃로 데워진 DMEM으로 다시 한 번 씻은 후 배양에 이용하였다. 조직배양의 방법은 다음과 같이 sandwich agar bed system을 이용하였다. 이 배양방법은 조직의 3차 구조를 유지하기에 유리하며 배양기간중 가스 및 물질의 교류에 유리한 방법이다. 먼저 Millicell insert (Millipore, Bedford, USA)에 agar를 한층 부어 굳힌 후에 먼저 준비된 태아 난소조직의 절편을 5~7조각씩 그 위에 놓고 다시 한층의 agar를 그 위에 부어주었다. 윗층의 agar가 굳은 후에 그 위로 1ml의 배양액을 넣어 주었다. 이때 기본 배양액은 TCM-199으로 insulin, transferrin, selenium 그리고 0.6% BSA를 첨가하여 사용하였다. 조직배양시 여러가지 농도 (0, 0.01, 0.1, 1μg/ml)의 rhFSH를 첨가하여 그 영향을 관찰하였다. 조직은 37℃, 5% CO_2 배양기 내에서 3주일 동안 배양하였으며 3~4일 간격으로 배양액을 바꾸어 주었다. 채취된 배양액은 −70℃에서 보관하였다가 스테로이드 합성량을 측정하였다. 배양액의 에스트론 (E_1), 에스트라다이올 (E_2)을 방사선면역측정법으로 측정하였다. E_1은 DSL-8700 Kit (Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA)로 측정하였는데, E_1 antibody의 cross-reactivity는 estrone sulfate와는 2.02%, E_2와는 1.25%였고, sensitivity는 1.2pg/ml로, intra-assay 그리고 inter-assay coefficient variation은 6.46%와 9.1%였다. E_2는 Spectra Kit (Orion Diagnostica, Espoo, Finland)로 측정하였는데, E_2 antibody의 E_1과의 cross-reactivity는 0.97%였다. Sensitivity는 20pmol/ℓ였고, intra-assay와 inter-assay coefficient variation은 5.78%와 6.48%였다.

결 과

19주령의 정상태아로부터 얻어진 난소의 경우 rh-FSH의 첨가없이도 기저의 E_2 합성량은 배양기간동안 점차로 증가하였으며 최고치는 약 35pg/ml/section이었다(Fig. 1A). rhFSH가 더해졌을 경우 E_2의 합성량은 매우 증가하였고, E_2 합성량은 rhFSH의 농도에 비례하여 증가하였으나 1μg/ml 보다는 0.1μg/ml에서 E_2의 합성량이 더 많았다. E_1의 합성은 E_2와 유사한 합성양상을 보였으나 합성량은 적었다 (Fig. 1B). 18주령의 난소를 배양한 결과도 19주령 난소에서 얻은 결과와 매우 유사한 결과를 보였다. 기저의 E_2 합성량은 최고치가 약 127pg/ml/section이었으며 rhFSH의 영향으로 E_2의 합성량은 매우 증가하였다 (Fig. 2A). 19주령과 마찬가지로 E_1의 합성량은 E_2 보다는 적었다.

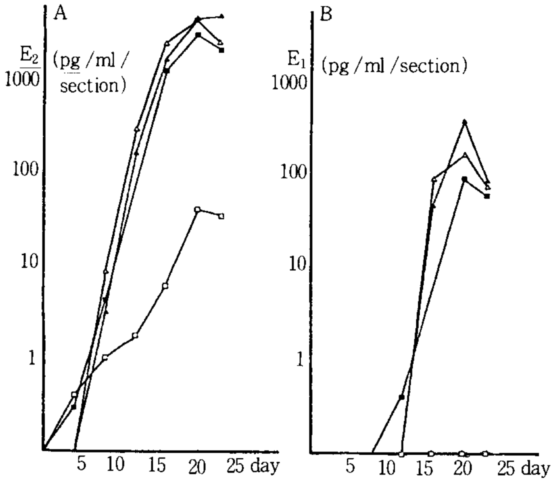

Fig. 1. Estrogen production by 19-week-old human fetal ovarian tissues cultured in the presence or absence of recombinant human FSH.
(A) Estradiol-17β(E_2) production, (B) Estrone (E_1) production. (□ : control, ■ : 0.01 μg/ml, △ : 0.1 μg/ml, ▲ : 1 μg/ml rhFSH)

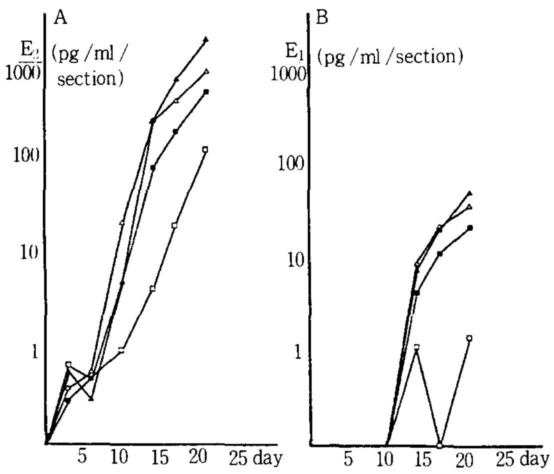

Fig. 2. Estrogen production by 18-week-old human fetal ovarian tissues cultured *in vitro* in the presence or absence of recombinant human FSH.
(A) Estradiol-17β(E_2) production, (B) Estrone (E_1) production. (□ : control, ■ : 0.01 μg/ml, △ : 0.1 μg/ml, ▲ : 1 μg/ml rhFSH)

여기에 결과를 그림으로 보이지는 않았으나 무뇌아로부터 얻은 19주령의 태아난소를 체외배양한 경우에는 E_1과 E_2의 합성량은 모두 최저측정치 이하로 측정되지 않았다.

고 찰

본 연구결과는 인간 태아난소를 체외에서 장기간 배양하면서 스테로이드의 합성을 관찰한 최초의 보고로서, 18~19주령의 태아 난소가 실제로 에스트로젠을 합성할 수 있는 잠재능력이 있음을 보여주었다. 본 연구에서 얻어진 연구결과로부터 몇 가지 중요한 점을 나누어서 고찰해 볼 필요가 있다.

첫째로 태아난소가 에스트로젠의 생성능력을 갖고 있다는 사실이다. 1973년 Reyes 등은 인간태아의 정소, 난소, 부신에서 E_2를 거의 측정할 수 없었다고 발표한 바 있으나 그 때에 사용된 재료의 임신주령이 5~10주령이었기 때문에 그 이후로의 변화를 예측할 수 없는 경우라 볼 수 있다 (Reyes *et al.*, 1973). 그러나 1978년 George와 Wilson은 8주령의 태아난소가 테스토스테론과 안드로스틴다이온 등의 기질을 이용하여 상당량의 E_1과 E_2를 합성한다는 보고를 하였으며 이런 난소의 aromatizing 능력은 그 이후로 임신 주수가 늘어감에 따라 변화하지 않음을 보고한 바 있다(George & Wilson, 1978). 본 실험의 결과도 18~19주령의 난소가 스테로이드 합성능력을 갖고 있음을 확실하게 증명하고 있다.

둘째로 18~19주령의 태아난소가 에스트로젠을 생성하는데 rhFSH의 영향이 확실하게 있었다는 것이다. 아직까지 태아난소의 발달과정에 있어서 FSH의 필요성에 대해서는 확실하게 정리된 바가 없으며 FSH 수용체의 존재 여부에 대해서도 많은 연구가 되어있지 않은 상태이다. 본 실험의 결과는 rhFSH의 첨가로 E_1, E_2 모두 합성량이 상당히 증가하였기 때문에 태아난소 조직내에 FSH 수용체가 존재하리라는 추론을 가능케 한다. 실제로 FSH 수용체의 유전자 발현 여부 및 난소 조직내의 어느 세포에 FSH 수용체가 존재하는지 등의 여부를 RT-PCR과 *in situ* hybridization 방법으로 밝히는 실험이 현재 본 실험실에서 진행중이다.

마지막으로 본 실험결과 정상태아와 무뇌아로부터 얻어진 난소에서의 스테로이드 합성양상이 달랐다는 사실은 임신 32주까지는 뇌의 존재 여부에 관계없이 난소의 정상적인 발달이 이루어진다는 Baker와 Scrimgeour (1980)의 보고와 상치되는 것으로서 에스트로젠의 합성에 큰 결함이 있는 것이 실제로 태아 뇌의 존재 여부가 태아난소의 발달에 직접적인 영향을 준 것 때문이었는지는 좀 더 심도 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

결론적으로 임신 중기의 태아난소는 에스트로젠을 합성할 수 있는 능력을 갖고 있으며 FSH에 대하여 반응함으로 보아 이 시기의 난소에는 FSH 수용체도 존재함을 추론할 수 있다.

인용문헌

Baker TG, Scrimgeour JB (1980): Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. J Reprod Fertil 60:193-199.

Bloch E (1964): Metabolism of 4-^{14}C-progesterone by human fetal testes and ovaries. Endocrinology 74:833-845.

George FW, Wilson JD (1978): Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. J Clin Endocrinol Metab 47:550-555.

Gondos B, Hobel CJ (1973): Interstitial cells in the human fetal ovary. Endocrinology 93:736-739.

Huhtaniemi I (1994): Fetal testis – A very special endocrine organ. Europian J Endocrinol 130:25-31.

Jungmann RA, Schweppe JS (1968): Biosynthesis of sterols and steroids from acetate-14-C by human fetal ovaries. J Clin Endocrinol Metab 28:1599-1604.

Payne AH, Jaffe RB (1974): Androgen formation from pregnenolone sulfate by the human fetal ovary. J Clin Endocrinol Metab 39:300-304.

Reyes FI, Winter JSD, Faiman C (1973): Studies on human sexual development. I. Fetal gonadal and adrenal sex steroids. J Clin Endocrinol Metab 37:74-78.