

## 과배란 유도시 인간 난소로부터 얻어진 과립-황체화 세포의 자연세포사 검정

양현원 · 이승재\* · 윤용달\*\*

아주대학교 의과대학 산부인과, \*피엘 산부인과, \*\*한양대학교 자연과학대학 생물학과

### **Determination of Apoptosis in Granulosa-Luteal Cells Obtained from Hyperstimulated Human Ovaries**

**Hyun-Won Yang, Seung-Jae Lee\*, and Yong-Dal Yoon\*\***

*Department of Obstetrics & Gynecology, School of Medicine, Ajou University*

*\*PL Infertility Clinic, \*\*Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University*

#### **ABSTRACT**

Recent studies have demonstrated that apoptotic cell death plays an important role in the mechanism underlying follicular atresia and luteolysis. However, the mechanisms responsible for initiating these processes have not been elucidated. In *in vitro* fertilization (IVF) programs, it is highly possible that continuous and repeated administration of FSH/hMG and GnRH agonists for the usage of ovarian hyperstimulation may induce apoptotic death of granulosa cells leading to atresia in the human ovarian follicles.

The present study was performed to investigate whether FSH/hMG and GnRH agonists used for a longer period in controlled ovarian hyperstimulation has any effect on the apoptosis of granulosa-luteal (GL) cells obtained from hyperstimulated ovaries. To examine apoptotic cell death in the GL cells, cells were stained with acridine orange followed by observation under a fluorescence microscope. Typical apoptotic chromatin condensation and segregation were observed in some of GL cells. Similar but distinct staining of apoptotic GL cells was observed when the cells were examined by using *in situ* TUNEL method. The healthy-looking cells with normal nuclear morphology were not stained, whereas cells with pyknotic nuclei or with apoptotic nuclei were intensively stained. After examining the ultrastructural features of GL cells by TEM, it was confirmed that the majority of cells seemed to have normal nuclei while GL cells undergoing apoptotic cell death were rarely found. The DNA extracted from GL cells showed a typical pattern of fragmentation following DNA electrophoretic analysis.

We have confirmed that the apoptosis occurs in granulosa-luteal cells obtained from hyperstimulated ovaries. Technically, *in situ* apoptosis detection method is simple and reproducible and is well suited to identify the quality of oocytes retrieved from hyperstimulated ovaries.

**Key words:** Apoptosis, Granulosa-luteal cell, TUNEL method

## 서 론

난소내 세포들, 특히 과립 세포와 황체화 세포의 죽음은 난소 세포의 운명에 직접적으로 관여하며, 이러한 세포들의 죽음으로 인하여 난소내 난포의 폐쇄(atresia)와 황체퇴화(luteolysis)가 진행되는 것으로 알려져 있다 (Zelemik *et al.*, 1989). 포유동물의 경우 생식 시기 동안 난포의 99%이상이 폐쇄라고 불리는 퇴화 과정을 통해 죽어가는 것으로 보고되고 있다 (Byskov, 1974; 1978; 1979; Tsafiri & Braw, 1984). 난포의 폐쇄에 대한 연구는 과거에는 단순한 형태적 분석과 호르몬 측정 등을 통해 이루어졌으나 (Lee & Yoon, 1985; Kim *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1989), 최근에 자연세포사(apoptosis)라는 개념을 난포 폐쇄에 도입함으로써 그 원인을 밝히려는 새로운 연구들이 다양하게 진행되고 있다 (Tilly *et al.*, 1991; Hughes & Gorospe, 1991; Palumbo & Yeh, 1994; Jolly *et al.*, 1994).

자연세포사는 형태학적 또는 생화학적 기준에 의해서 세포의 괴사(necrosis)와 구별된다. 일반적으로 세포의 괴사는 세포막의 투과성 상실로 인한 세포의 팽창과 파열로 이어지는 과정으로 특징지을 수 있고, 유전자 전사물(mRNA)이나 단백질 합성을 필요로 하지 않으며, 또한 세포내 에너지를 이용하지 않는 것으로 보고되고 있다 (Aharoni *et al.*, 1995). 한편 자연세포사가 진행되는 세포들은 endonuclease의 활성화와 DNA 절편화에 따른 형태학적 변화를 보이며, 먼저 세포가 수축하면서 여러 조각으로 나뉘어지고, 염색질이 응축되어 apoptotic body(자연세포사 핵응축체)라고 하는 작게 응축된 핵의 형태를 보이는 것으로 알려져 있다. 또한 자연세포사가 진행되는 동안에는 세포막의 견고성을 그대로 유지하고 있기 때문에 세포질내 물질의 유출을 막아 세포괴사에서와 같은 세포의 팽창에 의한 파열 현상은 나타나지 않는 것으로 보고하고 있다 (Wyllie *et al.*, 1980; Wyllie, 1981).

체외 수정 및 배아 이식(*In Vitro* Fertilization and

Embryo Transfer; IVF-ET) 시술에 있어서 과배란 유도는 필수적으로 시행해야 하는 과정으로 성숙된 양질의 난자를 많이 얻는데 그 목적이 있다. 그러나 과배란 유도 과정중에 환자에게 투여되는 human menopausal gonadotropin (hMG)와 follicle-stimulating hormone (FSH) 또는 gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa)를 지속적이고 반복적으로 사용할 경우 난소에 대한 antigonadal 효과를 보일 수 있으며 (Hsueh & Jones, 1981), 특히 GnRHa는 난소에 직접적으로 작용하여 난소내 과립 세포의 생리적 변화와 난자의 성장과 배란에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다 (Hillensjo & Lemaire, 1980; Corbin & Bex, 1981; Clack 1982; Naor & Yavin, 1982; Dekel *et al.*, 1983, 1985; Ma & Leung, 1985; Pellicer *et al.*, 1992).

따라서 본 연구는 먼저 체외 수정 및 배아 이식 시술 과정에서 얻은 과립-황체화 세포에서 자연세포사가 일어나는지를 확인하고, 이러한 자연세포사 확인 방법을 채취된 난자의 상태를 판단하는 기준으로 정립하기 위하여 여러 가지 방법으로 과립-황체화 세포를 염색하여 핵 상태를 관찰하고, 추출된 DNA에서 자연세포사의 지표가 되는 DNA 분절화 현상을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 과립-황체화 세포의 획득

과립-황체화 세포는 1995년 9월부터 1996년 8월까지 피엘 산부인과에서 체외 수정 및 배아 이식 시술(IVF-ET)를 시행하는 환자로부터 난자를 채취하는 과정에서 얻어 사용하였다. 과배란 유도는 FSH (Metrodin, Serono)와 hMG (IVF-M, LG Chem, Co., Korea)만을 투여하는 방법과 GnRHa (Buserelin acetate; Suprefact, Germany)를 장기간 투여하여 뇌하수체를 탈감각시킨 후 FSH/hMG를 투여하여 과배란을 유도하는 방법을 사용하였다. 난포의 성장은 초음파와 호르몬 측정으로 확인하였으며, 난포의 크기가 18

mm 이상이거나, 질식 초음파로 확인된 난포 한 개 당 estradiol ( $E_2$ )의 수준이 300~400 pg/ml 이상인 경우 hCG (Pergonal, Serono) 10,000 IU를 주사하였다. 주사 후 35~36 시간에 정맥마취를 시행한 후 질식 초음파를 이용하여 질벽을 통해 난소를 확인하고 17 G 난자 채취용 바늘로 난포액을 추출하였다. 각각의 난포에서 추출된 난포액은 배양 접시에 옮기고 해부 현미경하에서 난자의 상태를 판정한 후 배양하였다. 또한 추출된 난포액내 과립-황체화 세포들은 채취하여 배양액에 옮긴 후 혈구 세포들을 제거하기 위하여 40% percoll 위에 조심스럽게 올려놓고  $300 \times g$ 로 20 분간 원심분리를 하였다. 과립-황체화 세포층을 조심스럽게 획득하여 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 3번 세척한 후 DNA 추출을 위한 시료로써  $-20^\circ C$ 에서 보관하였고, 일부는 조직학적 관찰을 위하여 4% neutral buffered formalin (NBF, pH 7.4) 용액에 담가  $4^\circ C$ 에 보관하였다.

## 2. Acridine orange 형광 염색에 의한 자연세포사 판정

과립-황체화 세포들은 획득 후 즉시 도달한 후 1분간 실온에서 건조시켰다. 세포는 저장액 (D.W.:PBS = 1:1)으로 10분간 처리하고 고정액 (methanol:acetic acid = 1:1)으로 15분간 고정시켰다. 고정된 세포는 acridine orange (100 ng/ml)로 10분간 염색한 다음 증류수로 세척한 후 형광 현미경(Axioskop; Zeiss, Germany)하에서 관찰하였다.

## 3. Hematoxylin-eosin 염색에 의한 자연세포사 판정

획득된 과립-황체화 세포는 형태학적 관찰을 위하여 4% NBF에서 고정하고 alcohol series로 탈수시켰으며, xylene으로 투명화시킨 후 paraffin (Paraplast plus)을 침투시켜 포매하였다. 준비된 paraffin block은 박편절단기(microtome, Lipshaw)를 사용하여  $5\sim 6\mu m$ 로 절편을 만들었다. 그런 다음 xylene으로 paraffin을 제거하고 alcohol에 담근 후 증류수로 세척

하였다. Paraffin이 제거된 조직은 핵과 세포질을 각각 hematoxylin-eosin (H-E)으로 대조 염색하였다. 마지막으로 alcohol 과정을 거쳐 xylene에 옮긴 후 canadian balsam (Wako Pure Chemical Co.)으로 봉입하였다. H-E로 염색된 과립-황체화 세포들을 광학현미경(Axioskop; Zeiss, Germany)하에서 검경하여 핵 응축 (pyknotic nuclei) 또는 apoptotic body로 보이는 세포들을 관찰하였다.

## 4. TUNEL 방법에 의한 자연세포사 판정

Paraffin 절편으로 준비된 과립-황체화 세포에서 자연세포사를 확인하기 위하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) 방법에 의한 *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag; Oncor, Gaithersburg, MD)를 사용하였다. 먼저 과립-황체화 세포를 4% NBF에 고정하고 paraffin을 침투시켜 포매하였다.  $5\sim 6\mu m$  두께로 절편된 과립-황체화 세포에서 paraffin을 제거시키고 Tris buffer로 세척하였다. 세포에 내재하는 peroxidase를 중화시키기 위하여 2%  $H_2O_2$ 를 상온에서 5분간 처리한 후 ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 5분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (TdT)을 첨가한 후  $37^\circ C$ 에서 90분간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 반응 정지 완충액을 상온에서 10분간 처리한 후 Tris buffer로 3번 세척하였다. 그런 다음 anti-digoxigenin-peroxidase로  $37^\circ C$ 에서 30분간 처리한 후 Tris buffer로 세척하고 3,3'-diaminobenzidine (DAB; 0.1% in Tris buffer)와 0.002%  $H_2O_2$ 가 포함된 용액으로 2~3분간 발색시켰다. 발색이 된 조직은 증류수로 세척하고 methylene blue로 2차 염색을 시행한 다음 alcohol series를 거쳐 탈수한 후 xylene으로 투명화시키고 canadian balsam으로 봉입하였다.

## 5. 전자 현미경에 의한 자연세포사 판정

과립-황체화 세포는 멸균된 0.1M cacodylate bu-

ffer (pH 7.4)로 한 번 세척하고 즉시 0.2M carcodylate buffer로 만든 Karnovsky's 고정액으로 전고정을 시행하였다. 10~15분 경과 후 세포들을 고정액이 들어 있는 시험관에서 꺼내 왁스위에 동일한 고정액으로 만들어진 방울안으로 세포들을 옮겼다. 1 시간 방치한 후 원래 고정액이 들어 있는 시험관으로 옮겨 세척하였고, 세척된 세포들은 5% sucrose를 포함하고 있는 0.1M carcodylate buffer (pH 7.4)로 옮겨 4°C에서 24 시간 방치하였다. 후고정은 1% osmium tetroxide를 사용하여 45~60분간 찬물속에서 시행하였다. 후고정된 세포들은 증류수로 3 회 세척하고 alcohol series를 거쳐 탈수시킨 다음 Epon 812를 사용하여 포매하였다. 초박편은 LKB8800 ultratome을 사용하여 만들었으며, uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 Hitachi 600 전자현미경하에서 검경을 시행하였다.

## 6. DNA 추출과 DNA 분절화 분석에 의한 자연세포사 판정

난포액으로부터 획득된 과립-황체화 세포에 0.2 ml 마쇄 완충액을 첨가하고 26 G 주사기를 사용하여 잘 섞어 주었다. 시료에 12.5 $\mu$ l의 10% SDS를 넣고 65°C에서 30분간 방치하였다. 여기에 35 $\mu$ l의 8M potassium acetate를 넣고 시료를 잘 섞은 후 60분간 단백질이 가라앉도록 얼음에 방치한 후 시료를 4°C, 5,000  $\times$  g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 1.5ml 미량원심분리 시험관으로 옮기고 동량의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1, V:V:V)를 첨가하여 DNA를 추출하였으며, 다시 동량의 chloroform: isoamyl alcohol (24:1, V:V)로 재추출하였다. 상층액을 1.5 ml 미량원심분리 시험관에 옮기고, 0°C에서 보관한 2.5 배 부피의 100% ethanol을 첨가하고 -70°C 초저온 냉동고에서 1 시간 이상 침전시켰다. 이들 시료를 4°C에서 14,000  $\times$  g로 30분간 원심분리하여 DNA를 추출하였고, 침전물은 50 $\mu$ l의 1X TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 용해시킨 후 1 $\mu$ l의 DNase-free RNase (500 $\mu$ g/ml; Boehringer-Mannhe-

im, IN)을 첨가하고 60분동안 37°C에서 방치하였다. 시료의 DNA를 동량의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol로 추출 후, 동량의 chloroform: isoamyl alcohol로 재추출하였다. 상층액을 모아서 0.1배 부피의 3M sodium acetate와 0°C에 보관한 2.5배의 100% ethanol로 DNA를 침전시키고 -70°C 초저온 냉동고에서 적어도 60분 이상 방치시켰다. 이것을 4°C에서 14,000  $\times$  g로 30분간 원심분리하고, 0°C에 보관된 0.2 ml의 80% ethanol로 세척하고 Speed-Vac Concentrator (Savant Instruments, NY)로 15분간 진공하에서 건조시켰다. 압축 결정물을 25 $\mu$ l의 증류수에 녹이고, 260nm의 흡광도에서 DNA 양을 측정한다. 다음 -20°C에 보관하였다. 이렇게 추출된 DNA를 lane당 5 $\mu$ g의 농도로 6% polyacrylamide gel (NOVEX)에 loading한 후 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel을 10% acetic acid 용액에 담가 loading dye가 빠질때까지 20~30분간 방치한 후 증류수로 2~3회 세척한 다음 염색액 (AgNO<sub>3</sub>, 0.2g; 37% formaldehyde, 300 $\mu$ l; D.W., 200ml)에 30분간 넣어두었다. 증류수로 5초간 세척한 후 developing 용액 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2g; 37% formaldehyde, 300 $\mu$ l; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 200 $\mu$ l; D.W., 200ml)에서 band가 보일때까지 흔들어 주었다. Band가 보이면 stop 용액 (10% acetic acid)에서 2분간 처리한 후 DNA 분절화 현상을 확인하였다.

## 결 과

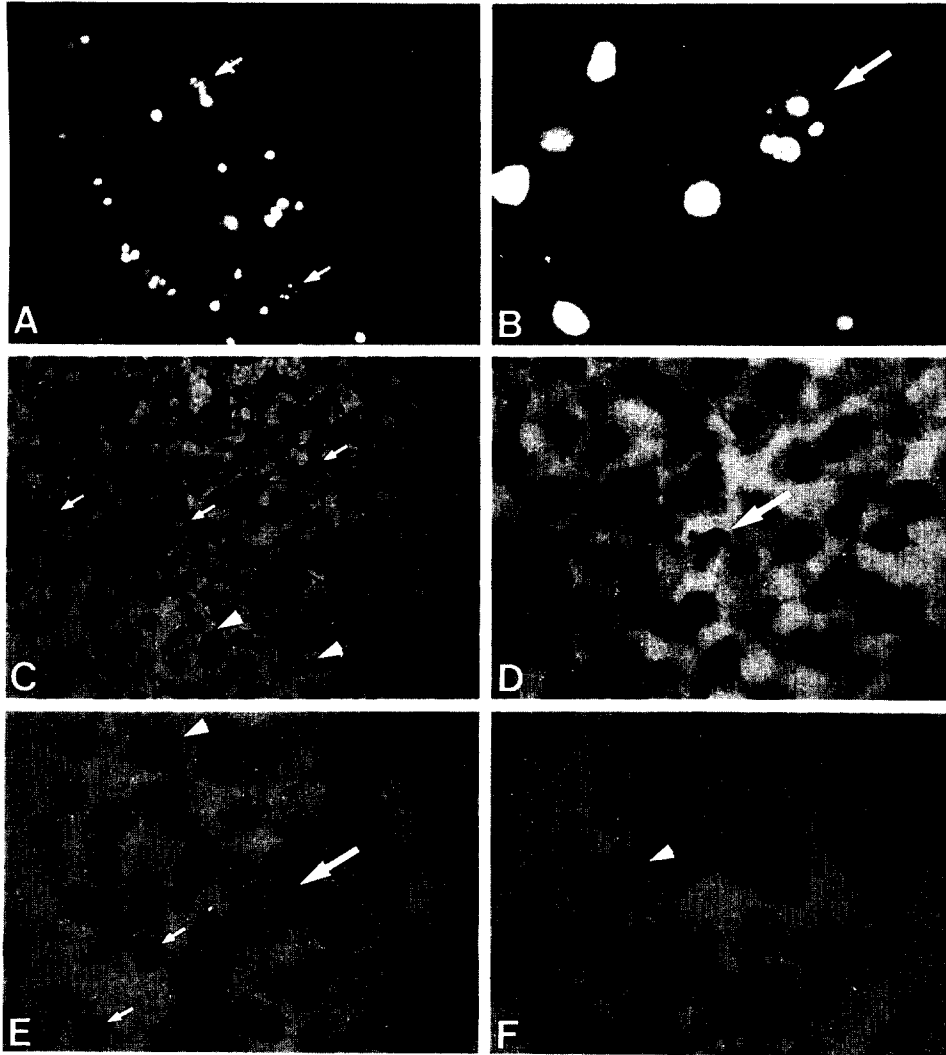
### 1. Acridine orange 형광 염색에 의한 apoptotic 세포의 관찰

난자 채취 과정에서 획득한 과립-황체화 세포를 acridine orange로 형광 염색한 결과 대부분 세포들이 핵이 둥글고 크게 염색되어 보이는 반면, 자연세포사가 진행되는 것으로 보이는 세포들은 건강한 세포들의 핵에 비하여 핵이 작은 조각으로 쪼개져 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 apoptotic nuclei를 보이는 세포의 비율은 전체의 1~2%로 극히 적은 수의 세포에서만 관찰할

수 있었다(Fig. 1, A,B).

획득한 과립-황체화 세포를 paraffin 절편으로 만든 후 H-E 염색하여 검경하는 방법은 세포들을 도달한 후 형광 염색하여 관찰하는 것보다 훨씬 많은 수의 세포를

2. H-E 염색에 의한 apoptotic 세포의 관찰



**Fig. 1. Light photographs of granulosa-luteal cells obtained from hyperstimulated human ovaries.**

Fluorescent images of apoptotic nuclei on human granulosa-luteal cells (A,  $\times 160$ ; B,  $\times 640$ ). White arrows indicate apoptotic nuclei. Note the fragmented bodies showing as apoptotic nuclei. Granulosa-luteal cells stained with hematoxylin-eosin (C,  $\times 200$ ; D,  $\times 400$ ). White arrow indicates to examples of cell death with apoptotic nuclei and white arrow-heads point to pyknotic nuclei. *In situ* detection of apoptotic cells on granulosa-luteal cells (E, F,  $\times 400$ ). Brown colored cells represent dead cells by necrosis (white arrow-heads) or apoptosis (white arrow). Note the healthy cells with round nuclei and cytoplasm membrane were not labelled and some of the granulosa-luteal cells (small white arrow) shown the pyknotic nuclei were labelled.

관찰할 수 있었으며, 특히 획득한 과립-황체화 세포의 전체적인 상태를 조사하는데 용이하였다. H-E 염색 결과 건강한 세포들에서는 대부분 핵이 둥글고 크게 염색되어 보였고, 핵안에서 몇 개의 인들을 관찰할 수 있었다. 반면, 자연세포사가 진행되는 세포들은 핵이 작은 조각들로 응축되었으며 건강한 세포들의 핵에 비하여 진하게 염색되어 보였다. 그러나 H-E 염색으로 판정된 apoptotic 세포의 비율은 형광 염색 결과와 마찬가지로 극히 적은 수의 세포에서만 관찰할 수 있었다. 또한 과립-황체화 세포들 사이로 혈구 세포들을 관찰할 수 있었으나, H-E 염색으로는 붉게 염색된 적혈구만을 확인할 수 있었다(Fig. 1, C,D).

### 3. TUNEL 방법에 의한 apoptotic 세포의 관찰

Paraffin 절편으로 준비된 과립-황체화 세포를 TUNEL 방법에 의해 자연세포사를 확인한 결과 핵이 둥글고 큰 건강한 세포에는 염색이 되지 않았다. 반면 핵이 작은 원형으로 응축되어 있거나, 또는 작은 조각들로 절편화를 보이는 세포에서는 진한 갈색으로 염색된 것을 확인할 수 있었다. 또한 단순히 핵의 응축을 보인 pyknotic 세포에서도 일부 염색되는 것을 확인할 수 있었으나 대다수의 pyknotic 세포에서는 염색되지 않았다(Fig. 1, E,F).

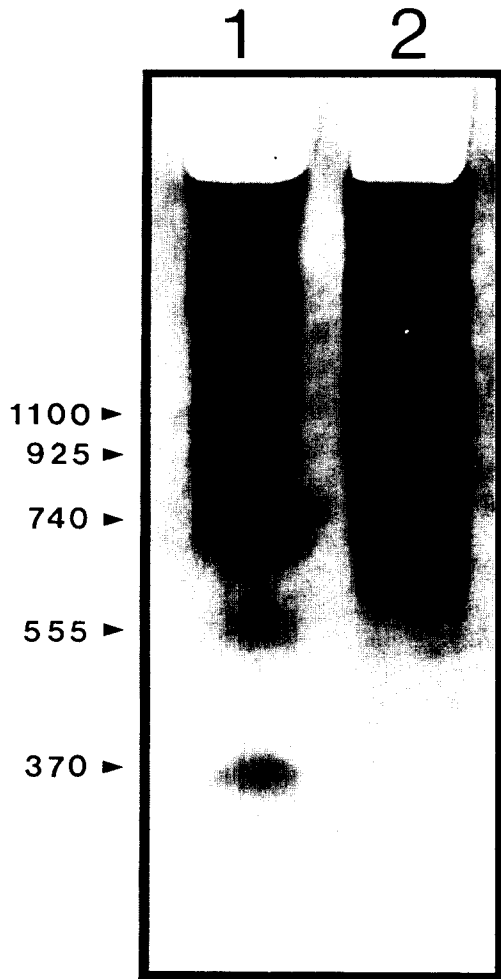
### 4. 전자 현미경에 의한 자연세포사 확인

획득된 과립-황체화 세포에서 나타나는 세포의 죽음을 좀 더 정확히 확인하기 위하여 전자 현미경하에서 세포의 미세구조, 특히 핵과 미토콘드리아의 형태를 관찰하였다. 건강한 과립-황체화 세포의 핵은 둥글고 핵내 염색질이 일양하게 핵 전체에 분포하는 것을 확인할 수 있었던 반면 자연세포사가 진행 중인 세포에서는 핵내 염색질이 불규칙하게 응축되고 절편화되어 있었고, 일부 핵막과 세포막은 터져 있었다. 또한 미토콘드리아들도 건강한 세포에 비하여 약간의 팽창을 확인할 수 있었으나, 세포 괴사가 일어나는 세포내 미토콘드리아에 비하면 안정되어 있었다. 이러한 자연세포사를 보이는 세



**Fig. 2. High magnificational electron microscopical features of human granulosa-luteal cells.**

Granulosa-luteal cells were pre-fixed in Karnovsky's solution and post-fixed in 1% osmium tetroxide. After dehydration the cells were embedded with Epon 812 resin and followed by dual staining with lead nitrate and uranyl. The various nuclear morphology of granulosa-luteal cells obtained from hyperstimulated human ovaries. A ( $\times 5,000$ ), healthy cell; B ( $\times 5,000$ ), apoptotic cell; C ( $\times 5,000$ ), necrotic cell. N, nucleus; M, mitochondria; L, lipid drop.



**Fig. 3.** DNA fragmentation analysis of human granulosa-luteal cells obtained from follicles in IVF procedure (lane 1) and human chorionic villi cells as negative control (lane 2).

Extracted DNA were resolved by 6% TBE gel electrophoresis at 125 V for 60 min and then visualized with silver nitrate staining. Note the typical "ladder" pattern of DNA extracted from the human granulosa-luteal cells, which indicated the presence of DNA fragments to the size equivalent to single nucleosomes or oligonucleosomes. This pattern is characteristic of the apoptotic DNA fragmentation.

포들은 거의 찾아 볼 수 없었으며 많은 세포에서 세포

괴사가 진행중인 것을 확인할 수 있었다. 괴사가 일어나는 세포의 핵 모양은 전체적으로 둥글고 건강하게 보였으나, 핵내 염색질들이 엉켜 산만하게 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 핵막과 세포막은 터져 세포 내 소기관들이 흩어져 있었으며, 미토콘드리아 또한 심하게 팽창되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

### 5. 전기영동에 의한 DNA 분절화 양상 분석

획득한 과립-황체화 세포의 DNA 분절화 양상을 확인하기 위해 silver 염색을 한 결과 DNA가 370, 555, 740, 925, 1,100bp로 분절화된 것을 확인할 수 있었으며, negative control로 사용한 사람 용모막 세포에서는 이러한 DNA 분절화 현상을 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

## 고 찰

체의 수정 및 배아 이식 시술 과정에서 얻은 과립-황체화 세포들에 세포의 죽음을 확인하기 위하여 여러 가지 염색 방법으로 조사한 결과 극히 적은 몇 개의 세포에서만 자연세포사에 의해 세포가 죽어가는 것을 확인할 수 있었다.

먼저 난자 채취 과정에서 획득한 과립-황체화 세포를 바로 도말하여 acridine orange 염색법으로 확인한 결과 전형적인 자연세포사 양상이라고 볼 수 있는 핵들이 조그만 조각으로 쪼개져 응축되어 있는 세포들을 확인할 수 있었으며, 그 비율은 전체 세포의 1~2%로 몇 개의 세포에서만 관찰할 수 있었다. 이와 같이 핵이 응축되어 쪼개지고 세포질 또한 응축된 모양으로 되는 것은 자연세포사 과정 중 마지막 단계(Kerr *et al.*, 1994; Falcieri *et al.*, 1994)로써 단순히 핵의 응축된 모양만으로 자연세포사가 일어난 세포의 정도를 판정하는 것은 잘못된 것으로 생각된다. 또한 핵이 응축되어 있는 세포 이외는 모든 세포의 핵이 둥글고 건강하게 보임으로써 자연세포사의 초기 과정에 있는 세포 또는 세포 괴사에 의해 죽어가는 세포는 이러한 염색 방법으로 판정할 수 없다는 문제점을 가지고 있다. 또한 이 방법은 세

포의 상태를 간편하게 확인할 수 있었으나 도말 과정중 많은 세포들이 파괴되어 전체적인 과립-황체화 세포의 특성을 관찰하기에 어려움이 있었다. 따라서 획득한 전체 세포의 특성을 관찰하기 위한 방법으로 획득한 전체 세포 덩어리를 paraffin 절편을 만들어 염색을 시행하였다.

먼저 paraffin 절편에서 H-E 염색을 시행하여 검경한 결과 도말 후 관찰하는 것보다 훨씬 많은 수의 세포들을 관찰할 수 있었으며, 과립-황체화 세포들 외에 여러 세포들을 동시에 확인할 수 있었다. H-E 염색 결과 건강한 세포들 사이에서 자연세포사가 진행되는 것으로 보이는 세포들을 확인할 수 있었다. 이러한 세포들은 전체적으로 세포막이 불규칙하며, 핵이 여러 조각으로 쪼개져 있어 전형적인 apoptotic 세포의 형태를 보여주었다(Wyllie *et al.*, 1980; Wyllie, 1981; Kerr *et al.*, 1994). 그러나 H-E 염색으로 판정된 apoptotic 세포의 비율은 도말한 후 형광 염색으로 확인한 결과와 마찬가지로 극히 적은 수의 세포에서만 관찰할 수 있었다. 또한 H-E 염색 결과 pyknotic 세포라고 판단되는, 세포질은 거의 없고 핵만 작은 원형으로 응축되어 있는 세포들을 관찰할 수 있었으며, 채취된 난자의 상태에 따라 증감을 보여주었다. 이는 pyknotic 세포 수의 증가가 난포의 폐쇄와 관련이 있다는 보고(Palumbo & Yeh, 1994)를 뒷받침하는 자료라고 생각된다.

그러나 이러한 H-E 염색 방법에 의한 세포 죽음에 관한 연구는 간단하게 수행할 수 있으나 실험실마다 그 판정 기준이 달라서 서로 다른 결과들을 보고할 수 있는 문제점을 가지고 있다. 따라서 최근에는 세포의 DNA 분절화 분석을 통하여 세포의 죽음을 확인하고 있다. 1970년대 초부터 고정된 조직 절편에서 *in situ* 방법에 의한 DNA 분절화를 확인하기 위하여 노력해 왔으며 (Modak & Bollum, 1970; 1972), 이 방법은 방사성 표식자의 이용을 피하면서 감도를 증가시키기 위한 방향으로 계속 변형 발전되어 왔다(Dawson & Lough, 1988; Fehsel *et al.*, 1991; Gavrieli *et al.*, 1992; Ansari *et al.*, 1993; Wijsman *et al.*, 1993; Gorczyca

*et al.*, 1993). 이러한 원리로 최근에 *in situ* 자연세포사 확인 키트들이 개발되고 있으며, 세포의 죽음을 간단하게 확인할 수 있는 방법으로 널리 사용되고 있다 (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Gavrieli *et al.*, 1992; Ansari *et al.*, 1993; Palumbo & Yeh, 1994). 본 실험에서도 *in situ* 자연세포사 확인 키트를 이용하여 paraffin 절편으로 준비된 과립-황체화 세포에서 세포의 죽음을 확인한 결과 핵이 둥글고 큰 건강한 세포에서는 염색이 전혀 되지 않은 반면 핵이 작은 원형으로 응축되어 있거나, 또는 작은 조각들로 절편화된 세포에서만 진한 갈색으로 염색된 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 보아 pyknosis가 진행중인 세포에서도 DNA 분절화가 일어나며, 이는 pyknosis가 자연세포사와 같은 과정에 의해 진행될 수 있다는 것을 보여준다. 또한 흥미롭게 pyknotic 세포 주위에 흩어져 있는 많은 수의 세포들에서 염색이 된 것을 관찰할 수 있었는데, 이러한 것은 핵안의 염색질들이 작은 원형으로 뭉쳐져 자연세포사 또는 pyknosis가 완전히 완료되기 전에 DNA 분절화가 먼저 일어난 세포에서 염색된 것으로 보인다.

이러한 DNA 분절화가 일어나는 특정 세포의 위치를 알아내는 *in situ* TUNEL 방법의 유용성은 난소내에서 일어나는 특정 세포의 자연세포사 현상의 연구에 새로운 방법을 제시해 주고 있으며, 특히 배양된 세포에서 자연세포사 현상을 연구하는데 필요한 방법이라고 판단된다. 그러나 *in situ* TUNEL 방법으로는 자연세포사와 세포괴사가 일어나는 세포들을 구별하기 어렵다. 따라서 정확한 자연세포사 현상을 확인하기 위해서는 *in situ* 분석과 전기영동을 통한 DNA 분절화 확인 방법을 결합하는 것이 중요하다. 세포에서 추출된 DNA를 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하여 형광 transilluminator로 확인하는 방법은 쉽고 간단하여 보편적으로 사용하고 있으나, 분절화된 DNA band를 분명하게 확인하기가 어렵고, 한 번에 많은 양의 시료를 필요로 하는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점은 방사성 동위 원소를 가지고 분절화된 DNA를 tagging한 후 autoradiography 방법으로 확인함으로써 극복할 수 있었



다. 그러나 이 또한 방사성 동위 원소의 사용에 따른 제한이 많으며, 시약이 고가라는 문제점을 가지고 있어 일반 실험실에서 다량의 실험을 하는데는 제약이 많다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 전기영동 후 DNA 분절화를 silver 염색으로 확인한 결과 DNA가 370, 555, 740, 925, 1100bp로 분절되어 있는 것을 분명하게 확인할 수 있었다. 이러한 DNA의 분절화 현상은 자연 세포사의 가장 대표적인 특징으로 (Wyllie *et al.*, 1984; Zelemik *et al.*, 1989),  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 에 의존적인 endonuclease의 활성화에 의해 일어나며, 이 효소는 규칙적으로 핵산 단위의 DNA로 특이적으로 절단함으로써 DNA는 185~200bp 크기의 다중체로 절편을 형성하게 된다. 따라서 이것을 전기영동 후 염색하여 관찰하면 DNA band가 뚜렷한 사다리 모양을 보이는 것을 확인할 수 있다. 반면 세포괴사는 무작위적인 DNA 분절로 인하여 전기영동 후에 도말 양상(smear pattern)을 보이는데, 이는 자연세포사에서 일어나는 DNA 분절화 양상과 뚜렷하게 구분이 된다 (Wyllie, 1984; Arends *et al.*, 1990; Gaido & Cidlowski, 1991). 또한 이러한 DNA 분절화는 apoptotic body와 핵의 응축(pyknosis)과 같은 세포 죽음의 형태학적 특징에 선행하여 나타나는 현상으로 인식되고 있다 (Greenwald & Shyamal, 1994).

이상의 결과에서 체외 수정 및 배아 이식 과정에서 획득된 과립-황체화 세포에서 자연세포사에 의한 세포의 죽음이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 위와 같이 정립된 자연세포사 확인 방법은 앞으로 체외 수정 및 배아 이식 과정에서 획득된 난자의 상태를 정확히 판정하는데 도움이 될 것으로 생각되며, 과립-황체화 세포의 자연세포사에 연구에 필요한 자료가 될 것으로 사료된다.

### 인용문헌

- Aharoni D, Dantes A, Oren M, Amsterdam A (1995): cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. *Exp Cell Res* 218:271-282.
- Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA (1993): *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 170:1-8.
- Arends ML, Morris RG, Wyllie AH (1990): Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136:593-608.
- Byskov AG (1974): Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 37:277-285.
- Byskov AG (1978): Follicular atresia. In: Jones RE(ed.), *The vertebrate ovary: comparative biology and evolution*. New York: Plenum, pp 533-562.
- Byskov AG (1979): Atresia. In: Midgley FAR, Sadler WA(eds.), *Ovarian Follicular Development and Function*. New York: Plenum, pp 41-58.
- Clack MR (1982): Stimulation of progesterone and prostaglandin  $E_2$  accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells. *Endocrinology* 110:146-152.
- Corbin A, Bex FJ (1981): Luteinizing hormone-releasing hormone agonists induce ovulation by hypophysectomized rats: Direct ovarian effect. *Life Sci* 29:185-192.
- Dawson BA, Lough J (1988): Immunocytochemical localization of transient DNA strand breaks in differentiating myotubes using *in situ* nick-translation. *Dev Biol* 127:362-367.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Horz MA, Lassota P, Traganos F (1992):

- Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13:795-808.
- Dekel N, Sherizly I, Tsafirri A, Naor Z (1983): A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and a gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. *Biol Reprod* 28:161-166.
- Falcieri E, Zamai L, Santi S, Cinti C, Gobbi P, Bosco D, Cataldi A, Betts C, Vitale M (1994): The behavior of nuclear domains in the course of apoptosis. *Histochemistry* 102:221-231.
- Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H (1991): Analysis of TNF alpha-induced DNA strand breaks at the cell level. *Am J Pathol* 139:251-254.
- Gaido ML, Cidlowski JA (1991): Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J Biol Chem* 266:18580-18585.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z (1993): Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53:1945-1951.
- Greenwald GS, Shyamal KR (1994): Follicular development and its control. In: Knobil E, Neil JD (eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Vol 2:629-724.
- Hillensjo T, Lemaire WJ (1980): Gonadotropin-releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes *in vitro*. *Nature* 287:145-146.
- Hsueh AJW, Jones PBC (1981): Extrahypothalamic actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 2:437-461.
- Hughes FM, Gorospe WC (1991): Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415-2422.
- Jolly PD, Tisdall DJ, Health DA, Lun S, McNatty KP (1994): Apoptosis in granulosa cells in regulation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod*. 51:934-944.
- Kerr JFR, Harmon BV (1994): Apoptosis - Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2026.
- Kim MK, Lee YH, Kim JH, Yoon YD (1987): A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia. *Kor J Zool* 30:351-370.
- Lee CJ, Yoon YD, Kim JH, Kim MK (1989): The relationship between the pyknosis of granulosa cell and the change of steroid concentration in porcine ovarian follicles. *Kor J Fertil Steril*. 16:35-40.
- Lee YK, Yoon YD (1985): Changes of the concentration of steroid hormones in the porcine follicular fluid on atresia. *Kor J Fertil Steril*. 12:83-98.
- Ma F, Leung PCK (1985): Luteinizing hormone-releasing hormone enhances polyphosphoinositide breakdown in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 130:1201-1208.

- Modak SP, Bollum FJ (1970): Terminal lens differentiation. III. Initiator activity of DNA during nuclear degeneration. *Exp Cell Res* 62: 421-432.
- Modak SP, Bollum FJ (1972): Detection and measurement of single-strand breaks in nuclear DNA in fixed lens sections. *Exp Cell Res* 75:307-313.
- Naor A, Yavin E (1982): Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipid labeling in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 111: 1615-1619.
- Palumbo A, Yeh J (1994): *In situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol Reprod* 51:888-895.
- Pellicer A, Tarin JJ, Miro F, Sampaio M, Santos MJ, Remohi J (1992) : The use of gonadotropin releasing-hormone analogues (GnRH<sub>a</sub>), in *in-vitro* fertilization: some clinical and experimental investigations of a direct effect on the human ovary. *Human Reprod* 7:39-47.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW (1991): Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and post ovulatory regression. *Endocrinology* 129:2799-2801.
- Tsafirri A, Braw RH (1984): Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 6226-6265.
- Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van del Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH (1993) : A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *in situ* end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41:7-12.
- Wyllie AH (1981): Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis, In: Bowen ID, Lockshin RA (eds.) *Cell Death in Biology and Pathology*. Chapman & Hall, London, pp 9-34.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D (1984): Chromatin cleavage in apoptosis: associated with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142:67-77.
- Zelemik AJ, Ihrig LL, Bassett SG (1989): Developmental expression of Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology* 125:2218-2220.