韓國家畜繁殖學會誌 23(2) : 105~111(1999)
Korean J. Animal Reprod.

한우 황체세포의 Progesterone 및 IGF-I 분비에 대한 비장세포의 역할

성환후 · 민관식 · 박진기 · 박성재 · 양병철 · 이장형* · 장원경
농촌진흥청 축산기술연구소

Roles of Spleen Cells in the Regulation of Progesterone and IGF-I Secretion in the Hanwoo Luteal Cells

Seong, H. H., K. S. Min, J. K. Park, S. J. Park, B. C. Yang, J. H. Lee* and W. K. Chang
National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

The effects of exogenous spleen cells on the progesterone and insulin like-growth factor-I(IGF -I) secretions in luteal cells were studied by using *in vitro* luteal cell culture system in the Hanwoo luteal cells.

The corpora lutea(CL) were collected and pooled from the Korean native cattle(Hanwoo) ovaries from a local slaughter house. After enzymatic dissociation, combined large and small luteal cells(LLC and SLC)(1.0×10^6 cells/ml) were incubated in D-MEM media containing antibiotics and 10% FCS. Spleen cells(1.0×10^6 cells/ml) obtained from castrated adult male Hanwoo were added to luteal cells and co-cultured for 24 h in the absence or presence of luteinizing hormone(LH)(100 ng).

Progesterone contents from luteal tissues were increased at CL-3 stage during each stage of estrous cycle. Progesterone secretion from luteal cell culture by the presence of LH(100 ng/ml) was positively stimulated compared with control. However, progesterone secretion was not changed by the addition of 5, 10 and 20% of spleen cells in the absence of LH. Co-culture of luteal cells with 10% of spleen cells in the presence of LH(100 ng/ml) significantly enhanced after 24 h of culture.

IGF-I secretion from *in vitro* luteal cells co-culture by the addition of spleen cells(5%, 10% and 20%) was not significantly effected. Besides, in the presence of LH (100ng/ml), IGF-I secretions from luteal cells by addition of spleen cells were higher than control media. However, LH alone significantly increased IGF-I secretion at 24 h of culture.

These data provide the demonstrate that spleen cells can enhance LH action so as to stimulate progesterone secretion from Hanwoo luteal cells but have no effect to stimulate IGF-I secretion.

(Key words: Hanwoo, Ovary, Luteal cell, Spleen cells, Progesterone)

I. 서 론

한우에 있어서 난소내 황체는 배란전 성숙난포의 과립막세포에서 유래된 대형황체세포(large luteal ce-

* 한국농업전문학교(Korean National Agriculture College, R.D.A.)

ll; 이하 "LLC"라 함), 협막세포에서 유래된 소형황체세포(small luteal cell; 이하 "SLC"라 함), 영양아세포, 간질조직 및 모세혈관을 통해 유입된 혈액성분 등으로 구성되어 있으며, 이들 황체세포는 황체일령에 따라 황체세포에서의 progesterone 분비양상도 변하게 된다(Nelson 등, 1992; 성, 1995). SLC는 LH를 포함한 peptide hormone의 수용체를 가지고 있으며, LLC의 progesterone분비를 촉진하는 작용을 한다(McLean 등, 1992). 또한 LLC는 혈액내에 존재하는 대부분의 progesterone을 합성·분비하는 역할과 $PGF_{2\alpha}$의 수용체를 가지고 있으며 SLC와 서로 상호 작용하여 황체의 기능을 유지하는 역할을 한다(Parkinson 등, 1994).

성 등(1994)의 보고에서 난소의 황체세포의 체외배양에서 LH첨가는 progesterone분비를 증가시켰으며, $PGF_{2\alpha}$첨가는 LH의 기능을 억제하여 progesterone분비를 감소시킨다고 하여 황체의 progesterone 분비기능은 뇌하수체뿐만 아니라 자궁내막세포 등의 작용에 의해 조절된다고 하였다.

또한, Yamanouchi 등(1992)의 보고에 의하면 발정전기의 흰쥐에서 비장을 적출하였을 때 배란이 지연되고 혈중 progesterone농도가 크게 감소되었으나 동일 품종의 다른 흰쥐의 비장으로부터 회수한 비장세포를 혈관에 주입한 결과, 정상적인 배란과 progesterone이 정상적으로 높게 나타났다고 보고하여 비장이 황체의 기능에 중요하게 작용하는 것으로 추측된다. IGF-I(insulin like growth factor-I)은 체내 모든 조직에서 분비되어 체성장과 각 조직의 기능에 중요한 인자로 알려져 있다. Cassandra 등 (1991)과 Wather 등 (1995)의 보고에 의하면 황체세포의 체외배양에서 IGF-I이 합성·분비된다고 보고하여 IGF-I은 난소의 기능에 중요한 인자로 작용하고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 황체세포의 progesterone분비기능에서 IGF-I과 LH 및 비장세포와의 관계는 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구는 한우 난소로부터 분리한 황체세포를 체외배양하여 progesterone 및 IGF-I분비기능에 대한 LH 및 비장세포의 첨가효과를 검토하여 난소기능의 내분비적 조절기구에 대한 기초정보를 제공하는데 있다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 난소의 회수 및 황체조직의 분리

도축장에서 도축되는 한우중 정상적인 발정주기가 반복되는 것으로 추정되는 난소를 채취하여 3시간 이내에 황체조직을 분리하여 Ireland 등(1980)의 방법을 참고로 하여 발정주기중인 난소의 황체일령을 배란직후(CL-1), 초기(CL-2), 중기(CL-3), 말기(CL-4), 및 퇴행황체(CL-5)의 5단계로 구분하여 사용하였다.

2. 황체조직으로부터 세포질회수 및 황체세포의 배양

한우 난소의 황체중 조직내 progesterone 함량이 가장 높은 중기황체(CL-3)만을 회수하였으며(Fig. 1), 황체중량 5배의 50mM Tris-HCl용액(pH 7.4)으로 희석하여 균질화시킨 후 초원심분리(105,000g에서 60분간)를 실시하여 상층액을 회수하여 호르몬 분석시까지 −20℃에 보관하였다. 황체세포는 각 일령별로 구분된 황체조직을 50mM Tris-HCl 용액으로 세척하고 잘게 세절하여 0.25%의 collagenase용액(0.025mg DNase, 50mM EDTA, 50mM Dithiothreitol)에 옮겨 37℃의 진탕수조에서 60분간 배양하였다. 배양후, 800g에서 2~3회 원심분리를 실시하여 멸균 D-MEM 배양액(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Cat. No. 430-1600EA, GIBCO. USA; 10% FCS와 antibiotics 첨가)으로 세척하였다. 세척된 황체조직은 70μm의 여과기로 여과를 실시하여 황체세포를 분리하여 신선배양액으로 희석하였다. 회수된 황체세포는 0.25% trypan blue용액으로 생사 감별을 실시한 결과 약 98%의 생존율이 확인되었다. 회수된 황체세포는 haemocytometer를 이용하여 D-MEM 배양액 1ml당 1×10^6cell이 되도록 조절하였으며 대조구는 황체세포만을 배양하고 비장세포 5, 10, 20%와 LH 100ng(Sigma, L8650)을 각각 혹은 병용 첨가하여 전배양 6시간후 24시간 배양하였다.

처리당 반복수는 3두의 황체에서 각각 6반복으로 각 처리당 총 18반복으로 처리하였다. 배양후 회수된 배양액은 3,000g에서 5분간 원심분리하여 침전된 황체세포를 제거한 후 호르몬 분석시까지 −20℃의 냉동고에 보관하였다.

3. 비장세포의 분리

도축장에서 도축되는 한우 거세한 숫소로부터 비장조직을 추출하여 50mM Tris-HCl 용액(pH 7.4)으로 세척하고 잘게 세절하여 비장조직으로부터 비장세포를 회수하였다. 회수된 비장세포는 멸균 D-MEM 배양액으로 2~3회 세척하여 38℃에서 2시간 배양후 plate에 붙어 있는 세포만을 0.25% trypsin용액을 30분간 처리하여 D-MEM용액 1 ml당 1×10^{6}cell로 조절하여 5%, 10% 및 20%를 구분하여 황체세포에 첨가하여 배양하였다.

4. Progesterone 및 IGF-I 농도 분석

배양액내 progesterone농도는 Diagnostic Products Corporation(USA)의 Coat-A-Count kit를 이용한 radioimmunoassay(RIA)법으로 반응시킨 다음 γ-counter(LKB. Wallay 1277, Gamma Master)를 이용하여 계산하였다.

또한, IGF-I의 추출 및 분석은 Diagnostic Systems Laboratories (DSL-5600, USA)의 immunoradiometricassay(IRMA) kit를 이용하여 배양액내에 IGF-I binding protein을 추출하여 분석하였다. 즉, IGF-I의 표준용액을 각각 0, 5, 20, 60, 200, 및 600ng /100μl buffer로 하고 회수된 각 배양액으로부터 추출된 시료 50μl씩을 1차 항체(anti-IGF-I)가 코팅된 시험관에 첨가 후 2차 항체를 각각 200μl씩(70,000~80,000cpm) 첨가하여 실온에서 180rpm으로 진탕하면서 3시간 배양한 후 상층액은 완전히 제거시킨 다음 48시간 이내에 γ-counter를 이용하여 IGF-I을 계산하였다.

5. 통계학적 분석

각 처리간의 유의성 검정은 Duncan 다중 검정법을 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 황체일령별 황체조직내 혈중 progesterone 함량

Fig. 1은 난소의 황체일령별 황체조직내 progesterone함량을 나타내었다. Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 초기(CL-2)와 중기(CL-3)황체조직에서 황체조직

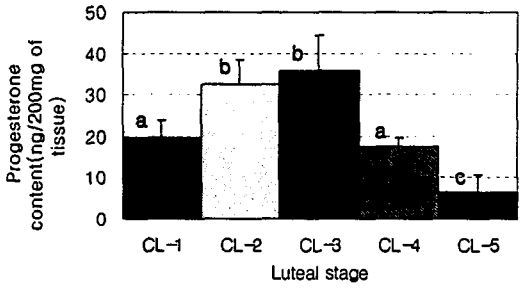

Fig. 1. Changes in cytosolic progesterone content of CL during each luteal stage in Hanwoo. Data shown are the mean±se of data obtained in 3~5 separate experiments(n=3~5). Symbols above bars indicate significance (p<0.05). CL-1: post ovulation, CL-2: early luteal stage, CL-3: middle luteal stage, CL-4: late luteal stage, CL-5: luteolysis.

200mg당 progesterone함량은 각각 32.5±5.9, 36.8±6.2ng로서 배란초기와 퇴행기의 황체조직에 비해 유의적으로(p<0.05) 높게 나타났다. 이때의 황체는 발정주기 중에서 혈중 progesterone농도가 대체로 높게 나타나는 시기이다. 반면에 퇴행기(CL-5)의 황체조직에는 200mg당 7.6±2.8ng으로 가장 낮게 나타났다.

2. 황체세포의 체외배양에 있어서 비장세포의 첨가효과

Fig. 2는 황체세포의 체외배양에서 비장세포의 첨과효과를 나타낸 결과이다. 배양시간은 24시간으로 LH와 비장세포를 첨가하지 않은 대조구를 100으로 정하고 거세숫소의 비장세포만을 5, 10 및 20%를 각각 첨가하여 배양한 결과 대조구에 비해 progesterone 분비는 약 65%전후로 낮게 나타났다. 이에 반해 LH 첨가구와 LH+spl.5%, LH+10% 및 LH+20%구에서는 대조구에 비해 다소 높게 분비되었으며 특히 LH+spl10%구에서는 182.4±7.8%로 유의적으로 (p<0.05) 높게 분비되었다.

이러한 결과로 보아 황체세포의 체외배양에서 비장세포단독만으로는 progesterone 분비기능을 촉진하

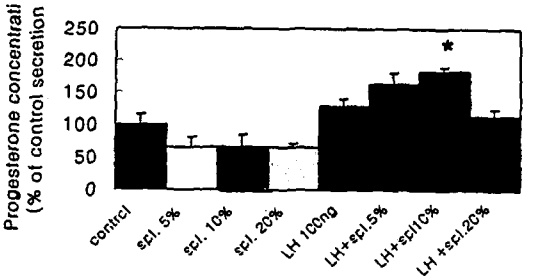

Fig. 2. Effect of spleen cell on progesterone secretion of luteal cell in the presence and absence of LH. Progesterone content in culture medium is expressed as a percentage of control secretion. Data shown are the mean±se of data obtained in separate experiments(n=3~5). *, p<0.05 vs control.

는 작용을 하지 않고 LH가 progesterone 분비촉진기능을 유의적으로 관여하고 있음을 알 수 있었다.

3. 황체세포의 IGF-I분비에 대한 비장세포의 첨가효과

Fig. 3은 황체세포의 체외배양에 있어서 IGF-I분비에 대한 비장세포 및 LH첨가효과에 대해 나타내었다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 배양 24시간째에서 대조구는 약 58.3 ng/ml로 분비되었다. 또한, 비장세포

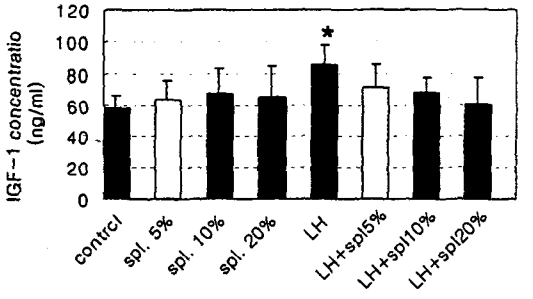

Fig. 3. Effect of spleen cell on IGF-I secretion of luteal cell in the presence and absence of LH. Data shown are the mean±se of data obtained in 3~5 separate experiments(n=3~5). *, p<0.05 vs control.

5%, 10% 및 20%첨가구에서는 각각 약 63.5, 67.8 및 65.2 ng/ml로 대조구에 비해 다소 증가되었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이에 반해 LH 100 ng/ml첨가구에서는 약 85.3 ng/ml로 대조구에 비해 유의적으로($p<0.05$) 증가되었으나 비장세포 첨가시에는 대조구와 비슷한 수준으로 유지되는 경향을 보였다.

Ⅳ. 고 찰

본 연구는 한우 난소의 황체로부터 분리한 황체세포를 체외배양하여 progesterone 및 IGF-I 분비기능에 대한 LH 및 비장세포의 첨가효과를 검토하여 난소기능의 내분비적 조절기구에 대한 기초정보를 제공하는데 있다.

본 실험에서 공시된 난소는 도축장에서 임신 및 번식장애축의 난소를 제외한 난소의 황체만을 회수하여 사용하였으며 황체일령은 Ireland 등(1980)의 방법에 의해 분리하였는데 Fig. 1에서 난소의 황체일령별 황체조직내 progesterone함량을 분석한 결과 초기황체와 퇴행황체에 비해 중기와 말기황체조직에서 progesterone함량이 유의적으로($p<0.05$%) 높은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 성(1995)과 성 등(1997)의 보고에서 정상발정주기중인 한우에서 발정주기가 진행됨에 따라 혈중 progesterone농도가 증가하다가 황체가 퇴행하는 시기에는 크게 감소되는 경향과 유사한 결과를 나타내었다. 즉, 혈중 progesterone 농도와 황체조직 중의 progesterone 농도는 정의 상관관계를 나타내고 있는 것으로 생각할 수 있다. 이와 같은 결과로서 미루어 혈액 중에 존재하는 progesterone의 대부분은 난소의 황체에서 합성·분비된다는 사실을 확인할 수 있었다.

황체세포의 배양시간에 따른 progesterone 농도는 24시간 배양에서 가장 높은 progesterone이 분비되었다는 보고(성 등, 1994)를 참고하여 본 연구에서는 24시간 배양하였다. 비장세포 단독첨가구는 비장세포의 농도와 관계없이 대조구에 비해 낮은 progesterone 분비를 나타내었다. 그러나 LH 100ng 첨가구에서는 대조구에 비해 유의적인 progesterone분비효과를 보였으며 LH + spl. 10%처리구에서 가장 많은 progesterone 분비를 보였다(Fig. 2). 이러한 결과로서

한우에 있어서 비장세포는 황체세포의 progesterone 분비기능에 직접 관여하지 않고 LH의 기능을 촉진시켜 황체세포의 progesterone분비기능을 촉진하는 작용을 하는 것으로 사료된다. 황체세포나 과립막세포의 체외배양에서 LH는 이들 세포의 스테로이드분비 기능을 촉진한다는 사실은 여러 보고자들에 의해 잘 알려져 있다(성 등, 1994; Kawakami 등, 1980; Nelson 등, 1992; Weber 등, 1987).

Yamanouchi 등(1992)은 발정전기의 흰쥐비장에서 회수된 macrophage를 과립막세포의 체외배양에 첨가한 결과 progesterone분비는 대조구에 비해 증가하였다고 보고하였으며, Matsuyama 등(1992)은 배란직전의 흰쥐에게 비장을 절제하였을 때 배란이 억제되었으나 동종의 다른 흰쥐 암컷의 비장세포를 추출분리하여 혈관에 주입하였을 때 정상적인 배란이 유기되어 비장세포는 난포의 배란시에 중요한 기능을 가진다고 보고하였다(Yamanouchi 등, 1992). Matsuyama 등(1987)과 Yamanouchi 등(1992)의 보고에서 성숙한 난포가 배란하여 황체가 형성될 때 비장에서 유래된 Macrophage가 황체형성시에 유입되어 황체의 progesterone분비에 중요하게 작용한다고 보고하였다(Lei 등, 1991). 이와 같은 보고와 본 연구의 결과를 종합하면 비장세포는 황체세포의 배양에서 LH의 progesterone분비기능을 촉진하는 역할을 담당하고 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서 황체세포의 배양에서 IGF-I을 분비하며 LH첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 IGF-I을 분비하는 것으로 나타났으나 비장세포를 5%, 10% 및 20%순에 따라 첨가하였을 때는 대조구에 비해 다소 낮은 농도의 IGF-I을 분비하였다.(Fig. 3) 따라서 비장세포는 황체세포의 IGF-I의 분비에 관여하지 않고 비장세포의 첨가비율만큼 상대적으로 황체세포의 수가 감소되어 IGF-I 분비가 감소되는 것으로 사료된다. Ohyama 등(1995)은 rat 정소로부터 회수한 leydig cell의 배양에서 IGF-I은 testosterone의 분비를 촉진시키며 소의 과립막세포의 체외배양에서 progesterone분비를 촉진시켜(Spicer 등, 1993; Lavranos 등, 1996) 생식선의 기능에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한, 성 등(1997)의 보고에서 한우의 발정주기중 혈중 IGF-I 농도변화는 혈중 progesterone농도와 정의 상관관계를 보였다고 한다. Wather 등(1995)은 면양의 과립막세포의 체외배양에서 IGF-I은 6일 이후 유의적으로 증가되었으며 초기황체세포에서 유의적으로 높은 IGF-I을 분비하였다고 보고하였다. 이러한 결과로서 IGF-I은 생식세포의 스테로이드호르몬의 분비기능을 촉진하는 기능을 하는 동시에 생식세포가 직접 IGF-I을 분비하여 생식기능을 조절하는 작용을 하는 것으로 사료되며 IGF-I이 생식세포에 작용할 때 비장세포에서 유래된 인자는 관여하지 않는 것으로 추측된다.

V. 적 요

본 연구는 한우 난소의 황체세포를 분리·체외배양하여 progesterone과 IGF-I 분비기능에 대한 비장세포의 첨가효과를 검토하여 난소기능에 대한 기초정보를 제공하는데 있다. 도축장에서 도축되는 한우 난소로부터 황체를 분리·효소처리하여 LLC와 SLC(1×10^6 cells/ml)를 회수하였으며 10% FCS와 antibiotic가 첨가된 D-MEM배양액에 24시간 체외배양하였다. 비장세포는 성숙한 거세한우의 비장에서 회수하여 5%, 10% 및 20%를 황체세포에 각각 첨가하여 공배양하였다. 황체일령별 조직내 progesterone농도는 발정주기중 중기황체 (CL-3)가 유의적으로 높았다.

비장세포를 5%, 10% 및 20%를 각각 황체세포에 첨가하여 배양한 결과, 배양액 중의 progesterone 농도는 대조구에 비해 유의적인 차이가 발견되지 않았으나 LH(100ng/ml)첨가구와 비장세포 5%, 10%, 20%첨가와 함께 LH를 각각 공배양구에서 대조구(LH+BP)에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높은 progesterone분비를 나타내었다. 한편, 황체세포의 체외배양에 있어서 IGF-I은 일정하게 분비하였으나 비장세포와 LH+비장세포 5%, 10% 및 20%와의 공배양은 대조구에 비해 큰 차이가 없었으나 LH단독처리구만이 대조구에 비해 유의적으로($p<0.05$) 높은 수준을 보였다.

이상의 결과로, 비장세포는 황체세포에 작용하여 LH의 progesterone 분비기능을 촉진시킴으로서 황체세포의 progesterone 분비를 촉진하는 기능이 있으나 IGF-I의 분비기능은 없는 것으로 사료된다.

Ⅵ. 인용문헌

1. Cassandra, X. C., P. L. Keyes, and J. C. Kostyo. 1991. Insulin-like growth factor-I stimulates steroidogenesis in rabbit luteal cells. Endocrinology, 128:1702-1708.
2. Ireland, J. J., R. L. Murphee and P. B. Coulson. 1980. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. J. Dairy Sci., 63:155~160.
3. Kawakami, S., T. Ochi and M. Shine. 1980. Effects of FSH, LH and $PGF_{2\alpha}$ on the number and steroid secretion by bovine granulosa luteal cell *in vitro*. Jap. J. Anim. Reprod., 26(1):30-36.
4. Lavranos, T. C., P. C. O'Leary, and R. J. Rodgers. 1996. Effects of insulin-like growth factors and binding protein-I on bovine granulosa cell division in anchorage-independent culture. J. Reprod. Fertil., 107:221-228.
5. Lei, Z. M., N. Chegini and Ch. V. Rac. 1991. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. Biol. Reprod., 44:1148-1156.
6. Matsuyama, S., K. Shiota, M. Nishihara and M. Takahashi M. 1992. Splenic macrophage enhance prolactin and lutenizing hormone action in rat luteal cell cultures. Endocrinol. Jpn., 39(1):51~57.
7. 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, (3) 2203-2212.
8. 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, 130(2):954-966.
9. Ohyama, K., M. Ohta, Y. Nakagomi, T. Yamori, T. Sano, Y. Shimura, K. Sato and S. Nakazawa. 1995. Effects of growth hormone and Insulin like-growth factor-I on testosterone secretion in premature male rats. Endocrine J., 42:817-820.
10. Parkinson, T. J., A. Turvey and L. J. Jenner. 1994. Amorphometric analysis of the corpus luteum of the cow during the estrous cycle and early pregnaney. Theriogenology, 41:1115-1126.
11. Spicer, L. J., E. Alpizar and S. E. Echternkamp. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor-I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, prgesterone production, estradiol production and(or) insulin-like growth factor-I production *in vitro*. J. Anim. Sci., 71:1231-1241.
12. Wather, D. C., C. M. Perks, A. I. Davis, and P. A. Denning-Kendall. 1995. Regulation of insulin-like growth factor-I and progesterone synthesis by insulin and growth hormone in the ovine ovary. Biol. Reprod., 53:882-889.
13. Weber, D. M., P. A. Fields, L. J. Romrell, S. Tumwasorn, B. A. Ball, M. Drost and M. J. Fields. 1987. Functional differences between small and large luteal cells of the late-pregnant vs. nonpregnant cow. Biol. Reprod., 37:685-697.
14. Yamanouchi, K., S. Matsuyama, M. Nishihara, K. Shiota, C. Tachi and M. Takahashi. 1992. Splenic macrophage enhance prolactin-induced progestin secretion from mature rat granulosa cells *in vitro*. Biol. Reprod., 46, 1109~1113.
15. 성환후, 오성종, 양보석, 이명식, 백광수, 정진관, 조병대. 1994. 한우 난소 황체세포의 체외배양에 있어서 progesterone분비에 대한 LH 및 $PGF_{2\alpha}$의 첨과효과에 관한 연구. 한국축산학회지, 36:623-629.
16. 성환후. 1995. 황체기능의 내분비제어. 한국가축

번식학회지, 19(4):307-322.
17. 성환후, 우제석, 임석기, 고응규, 백광수, 박진기, 구용법, 이장형, 1997. 한우에 있어서 발정주기중 혈중progesterone 및 Insulin-like growth factor-I농도의 변화. 한국축산학회지, 39(3):237-242.
(접수일자 : 1999. 4. 2. /채택일자 : 1999. 6. 7.)