

미성숙 생쥐에서 난포성숙호르몬 처리에 의한 난포의 퇴화

이창주^{1,2} · 고경수¹ · 김지향¹ · 김진규² · 윤용달^{1†}

¹한양대학교 자연과학대학 생물학과, ²한국원자력연구소

Follicular Degeneration After Treatment of Follicle Stimulating Hormone in Prepubertal Mouse Ovary

Chang-Joo Lee^{1,2}, Kyung-Soo Ko¹, Ji-Hyang Kim¹, Jin-Kyu Kim² and Yong-Dal Yoon^{1†}

¹Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

²Korea Atomic Energy Research Institute, Yusong, Taejon 305-353, Korea

요 약: FSH는 미성숙 설치류의 난포성장을 촉진하며, 강소형성 난포의 퇴화비율을 감소시킨다. 본 연구는 미성숙 생쥐에 난포성숙호르몬을 투여한 후 유발되는 난포의 조직학적인 변화를 규명하기 위해 시행되었다. 3주령의 ICR생쥐에 10 i.u.의 재조합 난포자극호르몬을 복강주사한 후 1일, 2일, 3일에 좌측 난소의 조직학적 변화를 관찰하였다. 강소형성전 난포의 경우 FSH 처리 후 시간에 따라 퇴화난포의 비율이 증가하였으나 강소형성 난포의 경우에는 유의한 변화를 보이지 않았다. 퇴화되는 양상은 난포 내 세포자연사하는 과립세포의 증가, 대식세포 및 다형다핵백혈구의 증가 등이 관찰되었다. 이상의 결과로 보아, 과량의 FSH 처리 후에 유발되는 난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사뿐 아니라 급성 염증반응을 수반하는 것으로 생각된다.

ABSTRACT: Follicle stimulating hormone (FSH) stimulates follicle growth, and inhibits the follicle atresia in the immature rodent ovaries. The present study was carried out to know the histological changes of ovarian follicles after FSH treatment in the prepubertal mice. Ten i.u. of recombinant FSH was i.p. injected on 3 weeks old mice. After the treatment, at 1, 2 and 3 days, left ovaries were collected for the histological study. The atretic ratio of preantral follicles increased with time after FSH treatment. However, in the case of antral follicles, there was no significant change in the ratio. The degenerating follicles contained apoptotic granulosa cells, macrophage, and polymorphonuclear leukocytes in the follicular cavity. The present results suggest that follicular degeneration caused by FSH hyperstimulation could be mediated by apoptosis as well as the acute inflammation.

Key words: Mouse, Follicle stimulating hormone, Atresia, Ovary, Follicle.

서 론

포유류에 있어 대부분의 난포는 배란되지 못하고 퇴화된다 (Byskov, 1978). 퇴화된 난포는 형태학적으로 과립세포의 핵이 응축하며 증식이 정지된다. 또한 협막세포층이 비대되며, 스테로이드 호르몬의 생합성능이 변화된다 (Hirshfield and Midgley, 1978; Braw and Tsafiri, 1980; Koering et al., 1982; Greenwald and Terranova, 1988; Lee et al., 1989; Yoon et al., 1990).

포유류 난포의 퇴화에 있어, 두 형태학적인 특징, 즉 첫째

는, 생식세포의 수적인 감소 (attrition), 두 번째로 출생 후에 난포가 배란되지 못하고 퇴화되는 atresia가 보고되고 있다 (Kaipia and Hsueh, 1997). 이러한 난포퇴화는 최근 과립세포의 세포자연사 (apoptosis)에 의하여 매개된다고 보고되었다 (Hughes and Gorospe, 1991; Billig et al., 1993; Hurwitz and Adashi, 1993; Hsueh et al., 1994; Tilly et al., 1995; Johnson et al., 1996; Gougeon, 1996). 즉, 난포의 퇴화는 내분비학적으로 조절되는 세포자연사를 매개로 하는데, 퇴화되는 난포는 협동적인 양상으로서 난소에서 제거된다 (Hsueh et al., 1994). 세포자연사는 조직 내 정상적인 세포의 항상성 유지를 위해 면역감시가 필요없는 (Kerr et al., 1994) 생리학적 과정이다 (Kaipia and Hsueh, 1997).

난포성숙호르몬 (follicle stimulating hormone, FSH)은 과립세포의 유사분열능을 촉진시켜 과립세포의 수를 증가시키며, 과립세포에서 FSH 자신의 수용체 수를 증가시키고, 난포액

본 논문은 1999년 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

†교신저자: 서울 성동구 행당동 산 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과 (우)133-791 (전)02-2290-0955 (팩)02-2299-0395 e-mail: ydyoon@email.hanyang.ac.kr

내 glycosaminoglycan의 분비를 증가시켜 난포의 크기를 증가시키는 작용을 갖는다. 또 FSH는 aromatase의 활성을 증가시키고, 황체형성호르몬 (luteinizing hormone, LH) 수용체의 수를 증가시키며, inhibin 등의 여러 다양한 성장인자를 지정하는 유전자의 발현을 유도한다 (Schelle and Schoemaker, 1996). 미성숙 개체에 FSH를 투여하게 되면 난포의 성장이 촉진되며, 감소형성 난포의 경우 퇴화되는 비율을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Harman et al., 1975). 또한, FSH는 과립세포의 세포자연사를 억제하는 주된 호르몬이라 보고되었다 (Chun et al., 1996). 그러나 과량의 외래적 FSH 처리에 의해 유발되는 난소 내 조직학적 변화는 정확히 알려져 있지 않다.

본 연구는 미성숙 생쥐에 난포성숙호르몬을 투여한 후 유발되는 난포의 조직학적인 변화를 규명하기 위해 시행되었다.

재료 및 방법

3주령 미성숙 생쥐 (ICR strain)를 한국화학연구소에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 실험이 진행되는 동안 각 군의 생쥐들은 23°C로 조절된 동물사육실 내 (12/12: 명/암)에 보관하였으며, 이때 물과 사료는 충분히 공급하였다.

0일 (12:00~13:00)에 FSH군의 경우 10 i.u./100 μ l (saline)의 재조합 난포자극호르몬 (Puregon, N. V. Organon)을 복강주사하였으며, 대조군은 동일량의 saline을 주사하였다. 0, 1, 2 그리고 3일 후에 좌측 난소를 절제하여 본 실험에 사용하였으며, 각 군의 개체수는 각각 3마리씩으로 하였다.

난포의 조직학적인 변화를 관찰하기 위하여 시간에 따라 적출한 각 생쥐 난소의 전고정 (2.5% glutaraldehyde/0.1M phosphate buffer, pH 7.3)을 실시하였다. 전고정이 끝난 시료는 0.1M phosphate buffer (pH 7.3)로 10분씩 3회 세척한 후, 후고정액인 osmium tetroxide (OsO_4)에 옮겨 4°C에 1시간 30분 동안 고정하고 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 이 조직편을 저농도 (50%)에서 단계적으로 고농도 (100%) alcohol 과정을 거쳐 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 epon 혼합액 [Poly/Bed 812 resin (Epon 812): Dodecenylsuccinic Anhydride : Nadic Methyl Anhydride: 2,4,6-Tri (dimethylaminomethyl) phenol (DMP-30) = 19.3: 12.3: 9.4: 0.6 ml, Polysciences Inc.]에 포매하여 60°C에서 72시간 동안 열중합시켰다. 각 시료는 초박절편편기를 사용하여 1 μ m 두께의 semithin 절편을 만들었다. 1% borax 수용액 내 1% toluidine blue O (TED PELLA, Inc)로 염색하였다.

난포는 감소가 형성된 감소형성 난포 (antral follicle)와 강

소가 형성되지 않은 감소형성전 난포 (preantral follicle)를 구분하여 관찰하였다. 조직학적인 관찰은 절편 중 가장 큰 절편을 선정하여 광학현미경 (Zeiss)으로 관찰하였다. 퇴화난포의 수를 해당되는 전체 난포에 대한 백분율을 계산하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 통계적인 유의성 검정은 Student's *t* test를 실시하여 *p* 값이 0.05보다 작은 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

정상 난자와 정상적인 형태를 갖는 과립세포로 구성된 전형적인 정상난포를 Fig. 1A로 나타내었다. 유사분열 중인 세포들을 관찰할 수 있었고, 기저막이 얇고 일정한 것이 확인되었다. 또한 세포자연사하는 세포들이 관찰되지 않았으며, 난포 내에 세포들의 잔유물도 관찰되지 않았다.

대조군의 퇴화난포 (Fig. 1B)를 보면, 세포자연사 소체들이 감소 내에 부유되어 있었고, 유사분열세포와 침윤된 다형다핵백혈구가 관찰되었다. 난포성숙호르몬이 처리된 정상적인 감소형성전 난포는 Fig. 1C와 같았다. 이 경우 난자 및 투명대, 기저막 등은 정상적인 소견을 나타내었다. 퇴화한 감소형성전 난포 Fig. 1D의 경우에는 난포 내에 세포자연사 소체들 뿐 아니라 이들을 탐식하는 식균세포 그리고 다형다핵백혈구들이 난포 내로 침윤되어 세포자연사 소체 주변에 분포하는 것을 확인할 수 있었다. FSH 처리 2일 후에 관찰된 정상 감소형성전 난포에서는 유사분열 과립세포들이 관찰되었으며, 세포자연사 소체는 발견되지 않았다. FSH 처리 1일 후에 관찰된 퇴화 감소형성전 난포에서는 세포자연사 소체들이 존재하였으며, 이들을 탐식하는 식균세포가 관찰되었다. FSH 처리 2일 후에 관찰되는 퇴화 감소형성전 난포의 경우 세포자연사하는 다수의 과립세포, 세포자연사 소체, 식균세포, 그리고 다형다핵백혈구들이 관찰되었다. 퇴화한 감소형성전 난포에 있어, 난자와 난구세포의 연결이 소실되었으며, 식균세포들이 세포자연사 소체들을 탐식하는 것이 관찰되었다. 또한 다형다핵백혈구가 난포 내로 침윤되어 존재하는 것을 볼 수 있었다.

감소형성난포 및 감소형성전 난포에서 한 개 이상의 다형다핵백혈구를 포함하고 있는 난포수의 전체 난포수에 대한 백분율 (%)을 계산한 결과는 Table 1과 같았다. 대조군의 경우에 비해 FSH 처리 2일과 3일에 현저한 ($p < 0.05$) 수적인 증가를 볼 수 있었다.

감소형성전 난포와 감소형성 난포의 난소 내 퇴화 비율을 계측하여 Fig. 2에 나타내었다. 퇴화되는 비율을 보면, 감소

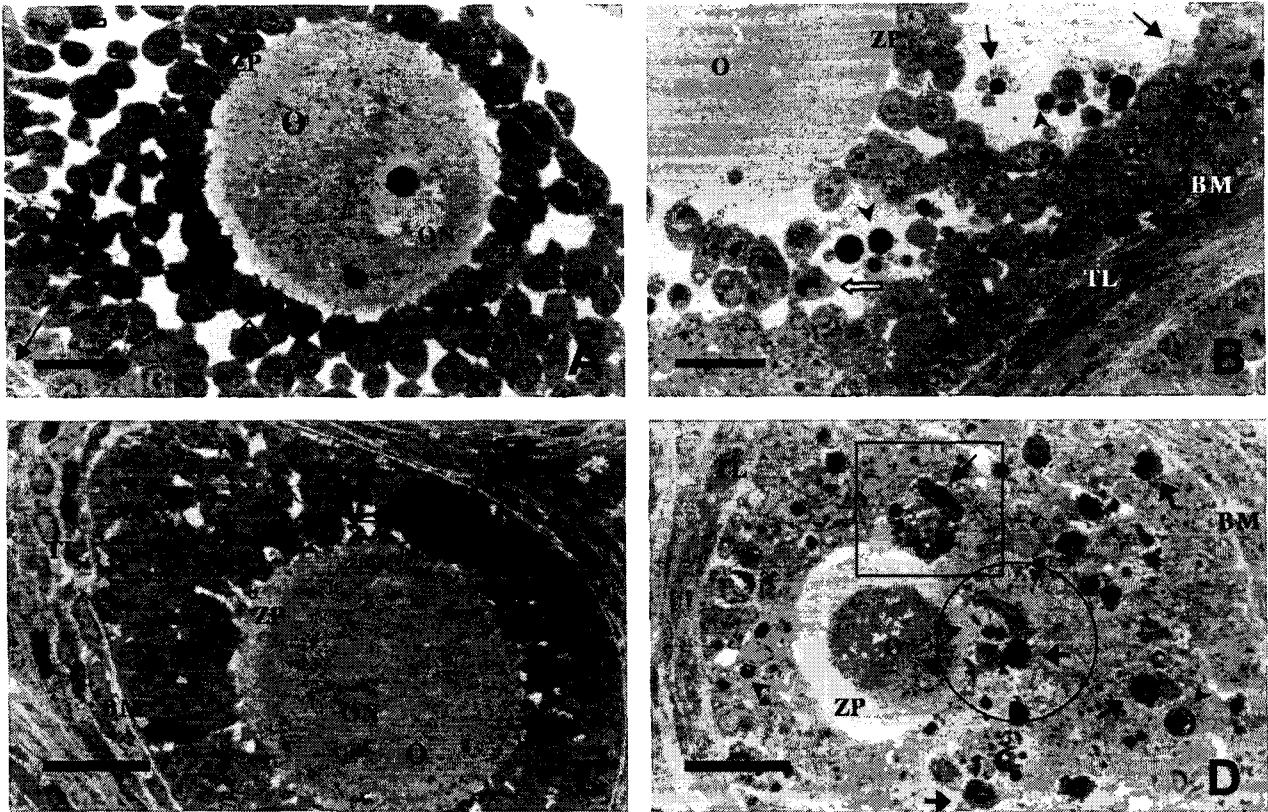


Fig. 1. Microphotographs of ovarian follicles in the control and FSH-treated immature mice. A, normal oocyte with normal granulosa cells. Mitotic cells (open arrows) were shown. Thin arrow means basement membrane; B, atretic antral follicle with numerous apoptotic granulosa cells (arrow heads) and cell debris (thin arrow). One mitotic cell (open arrow) and a polymorphonuclear leukocyte were shown; C, normal preantral follicle at 1 day after FSH-injection. A mitotic cell (open arrow) and no pyknotic granulosa cell were shown; and D, atretic preantral follicle at 2 days after FSH-administration. Apoptotic cells and bodies (arrow heads), polymorphonuclear leukocytes (thick arrows) were shown. In a box, one macrophage-like phagocytic cells (thin arrow) with numerous apoptotic bodies were observed. In a circle, a polymorphonuclear leukocyte (thick arrow) near the apoptotic cell (arrow head) was shown.

Abbreviations: O, oocyte; ZP, zona pellucida; BM, basement membrane; TL, theca layer; and ON, nucleus of oocyte. Bars, 20 μm

Table 1. Ratio of the number of follicle with polymorphonuclear leukocyte to total number of antral and preantral atretic follicle

	Days after FSH hyperstimulation			
	0	1	2	3
Ratio (%)	*29.3 ± 6.0 (50)	38.8 ± 20.1 (91)	53.1 ± 10.0 (93) [†]	45.4 ± 2.6 (117) [†]

*Data are obtained from the ratio (%) of the number of one or more polymorphonuclear leukocyte-bearing follicles to that of total number of atretic follicles in the largest cross sections and expressed as mean ± SEM. The number of mice used in this study was 3. The left ovaries were prepared for the histological observation. The numerals in parentheses mean the total number of atretic follicles observed in the present experiment. [†] p<0.05 significantly different when compared to the value at Day 0.

형성전 난포는 FSH 처리 3일에 현저하게 (p<0.05) 높은 비율을 나타내었으나, 강소형성 난포의 경우 유의한 차이를 보이지 않았다. 강소형성전 난포에서 정상 대조군의 퇴화비율 (%)은 27.34 ± 11.28이었으나, FSH 처리 3일 후에는 60.44 ± 9.03으로 증가하였다 (p<0.05). 강소형성 난포의 경우 FSH 처리 후 시간에 따른 퇴화비율의 유의한 변화를 볼 수 없었다.

고찰

난포 내 핵 응축하는 과립세포의 존재 유무는 과립세포의 세포자연사와 함께 난포의 퇴화를 규명하는 중요한 요인으로 알려져 있다 (Hurwitz and Adashi, 1992; Tilly et al., 1991)

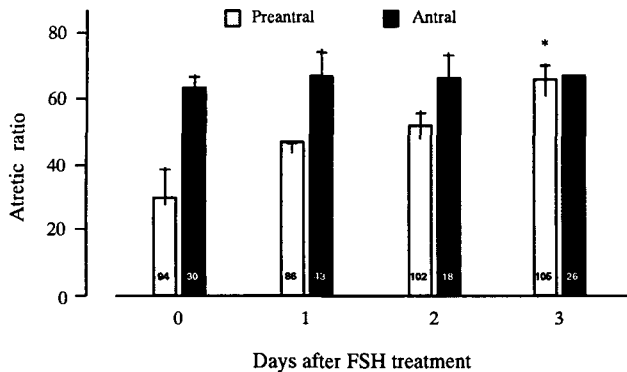


Fig. 2. Changes of atretic ratio (%) of preantral and antral follicles in the immature mouse ovary. At 0, 1, 2 and 3 days after ten i.u. of recombinant follicle stimulating hormone treatment, left ovaries were collected for the histological observation. Numerals in the bars mean the numbers of follicles observed. The ratio were presented as mean \pm SEM of three mice. *, $p < 0.05$ significantly different from the control (day 0).

난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사에 의해 매개되며 (Hsueh et al., 1994; Tilly et al., 1995; Johnson et al., 1996), 과립세포의 핵응축 (pyknosis)은 세포자연사의 한 과정으로 알려져 있다 (Gougeon, 1996). 본 연구는 미성숙 생쥐에 과량의 FSH를 처리한 후 시간에 따른 난포의 변화를 조직학적으로 규명하였다.

대조군의 퇴화난포에서는 유사분열 세포들을 많이 함유한 정상난포와는 달리 다수의 세포자연사 소체들이 강소 내에 부유되어 있었고, 유사분열세포뿐 아니라 침윤된 다형다핵백혈구가 관찰되었다. 또한 대식세포와 대식세포-유사 식균 세포들이 존재하였다. 대식세포를 가지고 있는 난포는 대부분 퇴화난포라고 보고 (Gaytan et al., 1998)되었는데, 대식세포의 난포 내 존재는 1) 많은 세포 부유물과 세포자연사 소체들과 같이 존재하는 경우와 2) 세포자연사 소체들의 대부분을 탐식하였고, 강소 내 세포부유물이 거의 존재하는 않는 경우, 그리고 3) 침윤된 다형다핵백혈구의 존재와 함께, 세포자연사 소체, 그리고 세포 부유물들이 함께 존재하는 경우가 있었다.

정상 대조군에 비해 FSH를 투여 받은 생쥐의 퇴화난포에는 세포자연사 소체들과 세포잔유물들이 포함되어 있으며, 특히 다형다핵백혈구와 대식세포와 유사한 식균세포들이 관찰되었다. 그러나, 세포자연사하는 과립세포와 세포잔유물을 포함하고 있어서 퇴화하는 난포로 확인되었다 하여도, 난포 내에 유사분열하는 과립세포들이 관찰되는 것으로 미루어 난포의 성장과 성숙에 관여하는 요인들에는 과립세포 자체의 생리적 활성도가 중요한 것으로 생각된다.

퇴화 난포의 경우, 난자와 난구세포의 연결이 소실되어 있고, 식균세포들이 세포자연사 소체들을 탐식하는 식균세포 혹은 식균세포-유사 세포들이 관찰되었고, 난포 내로 침윤된 많은 수의 다형다핵백혈구가 존재하였다. 강소형성 난포 및 강소형성전 난포에서 한 개 이상의 다형다핵백혈구를 포함하고 있는 난포수에 대한 전체 난포수의 백분율 (%)을 보면, FSH 처리 2일과 3일에 대조군에 비해 증가하였다. Gaytan 등 (1988)은 흰쥐에서 난포 내 대식세포와 세포자연사하는 과립세포가 출현하는 것은 사춘기 이전의 난포의 퇴화과정을 대식세포가 매개한다는 강한 증거라고 보고하였다. 본 연구에서 외래적으로 처리된 과농도의 FSH에 의한 난포의 퇴화는 세포자연사하는 과립세포를 탐식하는 대식세포뿐 아니라 다형다핵백혈구에 의한 급성염증반응을 수반하는 것으로 생각된다.

전체 난포 수에 대한 퇴화난포의 비율을 볼 때 강소형성전 난포는 FSH 처리 3일에 현저하게 ($p < 0.05$) 높은 비율을 나타내었다. 미성숙 rat의 경우, 생후 9~20일 사이에 혈청 FSH가 고농도로 존재한다는 보고 (Döhler and Wuttke, 1975; Rivier and Vale, 1987)로 보아, 본 연구에서 외래적인 FSH가 오히려 강소형성전 난포의 퇴화를 증가시키는 것을 사료된다. 그러나 강소형성 난포의 경우, 외래 FSH에 의한 퇴화는 진행되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 강소형성전 난포의 퇴화는 강소형성 난포의 퇴화 기전과는 상이하며, 외래적인 과량의 FSH의 처리에 의해 유발되는 난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사뿐 아니라 다형다핵 백혈구에 의한 급성 염증 반응을 수반하는 것으로 생각된다.

감사의 말씀

김지향은 한국학술진흥재단 기간세포연구팀 (BK21 핵심)의 장학금을 수혜 받았음.

인용문헌

- Billig H, Furu, Hsueh AJ (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133: 2204-2212.
- Braw RH, Tsafri A (1980) Follicles explants from pentobarbital-treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fert* 59: 259-265.
- Byskov AG (1978) Follicular atresia. In: Jones R (ed.), *The*

- Vertebrate Ovary. Plenum Press, New York, pp. 533-562.
- Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles : follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137: 1447-1456.
- Dohler KD, Wuttke W (1975) Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97: 898-907.
- Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE (1998) Ovarian follicle macrophages: Is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? *Biol Reprod* 58: 52-59.
- Gougeon A (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Rev* 17: 121-155.
- Greenwald GS, Terranova PF (1988) Follicular selection and its control. In: Knobil E and Neil J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, pp. 387-445.
- Harman SM, Louvet JP, Ross GT (1975) Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia. *Endocrinology* 96: 1145-1152.
- Hirshfield AN, Midgley AR (1978) Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 19: 606-611.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafiri A (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev* 15: 707-724.
- Hughes FM Jr, 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.
- Hurwitz A, Adashi EY (1992) Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol Cell Endocrinol* 84: 19-23.
- Hurwitz A, Adashi EY (1993) Ovarian follicular atresia as an apoptotic process. In: Adashi EY and Leung PCK (eds.), *The ovary*. Raven Press Ltd., New York, pp. 473-485.
- Johnson AL, Bridgham JT, Witty JP, Tilly JL (1996) Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-xlong gene expression. *Endocrinology* 137:2059-2066.
- Kaipia A, Hsueh AJ (1997) Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349-363.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2026.
- Koering MJ, Goodman AL, Williams RF, Hodgen GD (1982) Granulosa cell pyknosis in the dominant follicle of monkeys. *Fert Steril* 37: 837-844.
- Lee CJ, Yoon YD, Kim JH, Kim MK (1989) The relationship between the pyknosis of granulosa cells and the change of steroid concentration in porcine ovarian follicles. *Kor J Fertil Steril* 16: 35-40.
- Rivier C, Vale W (1987) Inhibin: measurement and role in the immature female rat. *Endocrinology* 120: 1688-1690.
- Schelle F, Schoemaker J (1996) The role of follicle-stimulating hormone in the selection of follicles in human ovaries: a survey of the literature and a proposed model. *Gynecol Endocrinol* 10: 55-66.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW (1991) Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129: 2799-2802.
- Tilly JL, Tilly KI, Klenton ML, Johnson AL (1995) Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136: 232-241.
- Yoon YD, Lee CJ, Do BR, Kim JH, Kim MK (1990) Biochemical studies on the metabolism of follicular maturation (II): Protein composition and steroid concentration in individually isolated medium-sized follicular fluid of pig ovary. *Kor J Zool* 33: 63-69.