

<중 설>

## 태아기 사람 난포의 형성과 분화

도병록<sup>1,2</sup> · 이창주<sup>2</sup> · 송강원<sup>2</sup> · 윤현수<sup>1,2</sup> · 노성일<sup>1</sup> · 윤용달<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>미즈메디병원 여성의학연구소

<sup>2</sup>한양대학교 자연과학대학 생명과학과

## Formation and Differentiation of Human Fetal Ovarian Follicles

Byung-Rok Do<sup>1,2</sup>, Chang Joo Lee<sup>2</sup>, Kang Won Song<sup>2</sup>,  
Hyun Soo Yoon<sup>1,2</sup>, Sung Il Roh<sup>1</sup> and Yong-Dal Yoon<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>Infertility Research Center, MizMedi Hospital

<sup>2</sup>Department of Life Science, Hanyang University

**요 약:** 포유류 원시난포의 분화에는 뇌하수체에서 분비되는 gonadotropins 외에도 다양한 성장인자들 뿐 아니라 스테로이드 호르몬 등이 관여하며, 난황낭에서 기원된 생식세포들과 중신에서부터 유입되는 기질세포들의 복잡한 상호작용에 의해 이루어진다. 특히 사람의 경우 태아기에 분화가 시작된 원시난포들은 성장을 개시한 후 배란이 되거나 혹은 폐쇄되어 난소에서 제거되는데, 일부 원시난포는 성장이 개시되기까지 50년 이상 원시난포의 상태로 유지된다. 그러나 원시난포의 분화 및 성장정지, 성장개시의 기전에 관하여는 현재까지 정확하게 밝혀져 있지 않다. 본 논문에서는 태아 및 신생아의 난소에서 gonadotropin의 수용체, 성장인자와 성장인자 수용체, 그리고 스테로이드호르몬 수용체의 발현을 조사하였다. 이 결과들을 바탕으로 사람 원시난포의 형성, 성장정지를 조절하는 기전 그리고 원시난포의 성장개시에 영향을 미치는 요인을 알아보았다.

**ABSTRACT:** The regulatory mechanisms of the initiation and the formation of ovarian follicles during fetal stage of mammals are largely unknown. In addition to the gonadotropins secreted from pituitary, various growth factors, and steroid hormones are believed to be involved in the differentiation and initiation of growth of primordial follicles consisting of primordial germ cells migrated from yolk sac and streamed cells from mesonephric somatic cells. In human, primordial follicles that have already initiated differentiation at fetal stage undergo either folliculogenesis to ovulate or atresia after growth. Some of primordial follicles remain without growth for 50 years or longer. The objective of this paper is to review the mechanism of the formation, growth arrest, and initiation of primordial follicles in human fetal and neonatal ovaries.

Key word; Human, Ovary, Follicle formation, Follicle growth arrest, Follicle growth initiation.

## 서 론

포유류에서 난포의 분화와 발달은 뇌하수체에서 분비되는 난포성숙호르몬(FSH)과 황체형성호르몬(LH), 다양한 성장인자들 그리고 스테로이드호르몬 등이 관여하는 매우 복잡한 과정으로, 종과 개체발생의 시기에 따라 다양한 양상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 원시생식세포에서 원시난포로의 분화, 성장, 강소 형성, 선택(selection) 및 각 시기별 난포의

폐쇄기전 등에 대한 다양한 보고들이 있으나 현재까지 난포 형성 및 성장조절의 기전에 대해서는 정확하게 규명되어 있지 않다.

따라서 본 논문에서는 기존의 학설 및 새로운 실험 등을 통해 원시난포의 형성, 성장정지 및 성장개시의 조절기전에 관여하는 생식소 자극호르몬, 성장인자, 스테로이드의 난소 내 발현과 분포 그리고 난포의 형성 및 성장정지 기전에 관하여 살펴보고자 하였다.

### 1. 원시난포의 형성과 분화

원시난포(primordial follicle)의 형성시기는 동물의 종류에 따라 다양한 차이를 보인다. 태아시기의 난소는 매우 빠른

<sup>†</sup>교신저자: 서울 성동구 행당동 산 17번지, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과 (우)133-791 (전) 82-2-2290-0955 (팩) 82-2-2294-0955 e-mail: ydyoon@email.hanyang.ac.kr.

분화와 발달을 통해 짧은 시간 내에 다양한 변화를 거친다(Hartshorne, 1996). 사람의 경우 임신초기 난황낭의 내배엽(endoderm of yolk sac)에서 나타나는 원시생식세포(primordial germ cell, PGC)가 지속적으로 분열하면서, 임신 5~7주경에는 복강 내 생식용기(genital ridge)로 이동한다. 이후 분열을 계속하여 체강상피(coelomic epithelium) 아래쪽에서 중배엽성 세포군인 간층적 기질세포(mesenchymal somatic cell) 및 중신 체질세포(mesonephric somatic cell)와 섞이며, 이동한 대부분의 PGC가 난원세포(oogonium)로 발달한다(McKay et al., 1953). 8주 경에는 감수분열과 난원세포의 퇴화가 처음으로 관찰되며, 16주 경에는 원시난포의 존재가 관찰되고, 20주 경에는 생식세포의 수가 약 100만개로서 최고에 달하며, 전 태아기를 통하여 가장 높은 FSH 농도를 보인다. 24주 경에는 원시난포들이 퇴화하기 시작하며(Byskov, 1986), 결과적으로 임신중기 최고에 이르렀던 생식세포의 수가 점차로 감소하게 된다(Peters, 1976). 28주 경에는 난원세포의 분열이 감소하면서 퇴화가 증가하고, 일부 원시난포가 성장을 개시한다. 그 결과 출생 시에는 생식세포의 수가 약 10~20만개 정도로 감소하며(Himmelstein-Braw et al., 1976), 거의 대부분의 생식세포가 원시난포 형태로 존재하고 일부는 강소를 형성한다(Gondos et al., 1971; Peters et al., 1978).

일반적으로 포유류의 난포형성과정에서 나타나는 세포들은 체강상피(coelomic epithelium), 중신의 간층적(mesenchyme of the mesonephros), 중신사구체에서 유래된 세포들(cells from the mesonephric glomeruli and tubules), PGC 등 최소한 4 종류 이상으로 이루어진다. 양의 경우 과립세포는 중신의 사구체에서 기원하며, 사구체와 관상표피(tubular epithelium)는 rete cell tubules 상태를 거쳐 rete-primary follicle association을 형성한다고 보고되어 있다(McNatty et al., 2000).

현재까지 보고된 원시난포의 형성에는 다양한 성장인자와 호르몬이 관여할 것으로 추측되나 실제 이에 관한 연구는 미진하다.

## 2. 원시난포의 분류 및 성장개시

태아기에 형성된 원시난포는 폐경기까지 성장이 멈추어 있거나 또는 매 시기마다 지속적으로 그 일부가 성장을 시작하여 배란 또는 폐쇄된다. 원시난포와 1차 난포를 비성장난포(non-growing follicle)로 통칭한다.

Lintern-Moore 등(1974)은 난포의 크기가 30~60  $\mu\text{m}$  이며 9~25  $\mu\text{m}$  크기의 1차 난자(primary oocyte, germinal vesicle stage oocyte)와 평평한 단층의 과립세포를 가지는 원시난포, 60  $\mu\text{m}$  이상의 크기로서 한 층의 입방형 과립세포를 가지는

1차 난포, 120  $\mu\text{m}$  이하 크기로서 600개 이내의 수 층의 입방형 과립세포들이 난자를 둘러싸고 있는 2차 난포로 분류하였고, Gougeon(1986; 1993)은 성장시작전 난포를 다시 한 층의 평평한 과립세포로 싸여진 원시난포(primordial follicle), 평평한 과립세포와 입방형 과립세포가 공존하는 중간난포(intermediary follicle), 한 층의 입방형 과립세포로 이루어진 1차 난포(primary follicle)로 분류하였다.

사람의 원시난포는 매우 오랜 시간이 걸리는 원시난포의 성숙단계(maturation stage)를 거쳐 germinal vesicle(GV)의 크기가 19  $\mu\text{m}$ 에 이르고, 가장 큰 절단면에서 약 15개 정도의 과립세포들이 존재하는 시기인 1차난포의 말기에 이르면 급속하게 성장을 시작하는 것으로 알려져 있다(Gougeon and Chainy, 1987; 1997).

무늬아의 경우, 원시난포만이 존재하거나 또는 난포의 성장이 있어도 소수의 강소형성전난포만을 가지는 것이 관찰되었고, FSH의 농도도 정상인의 약 2% 정도에 불과한 것으로 알려져 있다(Grumbach and Kaplan, 1973; Baker and Scrimgeour, 1980). 이 결과는 난포의 형성 및 성장개시에 일정한 농도 이상의 FSH가 필요하다는 것을 시사하며, 태아기 및 1차 난포의 성장 시에 뇌하수체-난소간 되먹임 작용이 중요한 역할을 한다는 증거가 되고 있다.

1차 난포의 성장개시에 대해 과립세포의 형태변화와 관련된 보고들이 있다. 생쥐 및 흰쥐의 경우, 과립세포의 형태가 평평한 상태에서 입방형으로 변화하는데 FSH가 관련을 갖고 있으며 또한 원숭이에서 gonadotropin-releasing hormone agonist(GnRHa)는 중간원시난포(intermediary primordial follicle)가 1차 난포로 발달하는 것을 억제한다고 보고되었다(Gougeon et al., 1993). 그러나 미성숙 생쥐의 경우 난포성장개시의 유도에 FSH가 꼭 필요한 요인이 아니라는 보고(Halpin et al., 1986)와 함께 출생 직전 또는 직후의 FSH 투여는 원시난포의 성장개시를 유도하나, 그 이후 시기에는 원시난포의 성장 자극효과가 없어진다는 보고가 있다(Lintern-Moore, 1977, mouse; Baker and Scrimgeour, 1980, human). 이러한 다양한 결과들은 이 시기 난포가 처한 복잡한 환경 및 조절물질들의 복잡한 상승효과 등에서 기인하는 것으로 추측된다(Howe et al., 1978). 반면, 성장을 시작한 원시난포는 계속적으로 성장하여 배란되거나 또는 성장 도중 폐쇄(atresia)과정을 거쳐 난소 내에서 제거된다.

## 원시난포의 분화와 발달

난포의 분화 발달과정에는 다양한 조절물질과 성장조절인

자들이 관여하며, 각각의 난포 분화 및 성장 시에는 특정한 물질들이 분비되는 것으로 알려져 있다. 생쥐의 경우 배양시 성장하는 난자에서 glucose phosphate isomerase가 분비되어 난자의 생존에 관여하고(McLaren and Buehr, 1990), 흰쥐에서는 heat shock protein 90이 원시생식세포의 세포질에서 발현된다는 보고가 있다(Ohsako et al., 1995). 또한 germ cell nuclear antigen-1이 원시난포로 발달 중인 생쥐의 난원세포에서 발현되며(Enders and May, 1994), 사람 태아의 난원세포에서는 c-kit 유전자가 발현된다(Horie et al., 1993). 성장인자의 경우 transforming growth factor(TGF)가 난소의 형태 형성 시 미분화 체세포들이 과립세포로 분화하는데 관여하고(Roy and Harris, 1994), TGF, epidermal growth factor(EGF), EGF 수용체 및 basic fibroblast growth factor(FGF), FGF 수용체의 mRNA (Yeh et al., 1993) 및 insulin-like growth factor I과 II, insulin의 수용체 유전자(Shifren et al., 1993)가 태아기 10~22 주 사이의 난소에서 발현되는 것으로 미루어, 이들은 생식수 관계의 분화에 관여할 것으로 여겨진다. 또한 inhibin과 activin의 경우  $\beta$ -단량체가 임신중기 태아의 난소에서 발현되며, leukemia inhibitory factor(LIF)의 경우 생쥐에서 난모세포의 이동 직후 생존과 세포자연사(apoptosis)를 억제하는 요인으로 알려지고 있다(Pesce et al., 1993). 양의 원시난포의 형성에는 steroidogenic factor-1, steroid acute regulatory protein, 3  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450<sub>scc</sub>, aromatase 등이 세포 및 시기에 따라 특이적으로 발현되는 것으로 보고되어 있다.

태아기 난소의 조직배양에 대한 보고들은 많지 않으나, Rose chamber를 사용하거나 (Blandau, 1965), 태아 난소 조직을 배양하여 강소와 유사한 구조의 형성이 관찰된 바 있으며, 이들 조직에서 estradiol(E)이 분비되었다는 보고(Hartshorne et al., 1994) 및 동결보존하여 해동한 후 체외 배양하여 성숙된 난자를 얻었다는 보고(Zhang et al., 1995), 그리고 출생 직후의 생쥐의 난소 조직을 체외 배양하여 성체를 얻었다는 보고가 있다(Eppig et al., 1996).

난소의 조직이식 실험에서는 태아 난소조직 또는 원시난포를 분리하여 동종 또는 면역억제 생쥐 등에 이식해서 산자를 출산한 보고들이 있다(Gosden, 1990, mouse; Carroll and Gosden, 1993, frozen-thawed mouse; Gosden et al., 1993, sheep). 그러나 조직이식에서 나타나는 결과와는 달리 현재까지 출생 전의 난소조직의 배양에 미치는 영향은 배양조건보다 배양을 시작할 시기의 태령이 더 큰 것으로 알려져 있다(Hartshorne, 1997).

많은 사람들이 초기 태아기에 스테로이드호르몬을 합성할

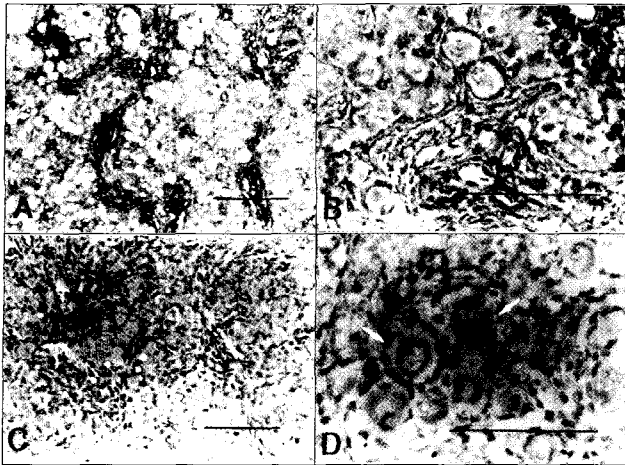
수 있는 협막세포 또는 협막세포의 기능을 가진 세포의 존재 여부에 의문을 제기하였지만(Rabinovici and Jaffe, 1990; Gosden, 1995, Satoh, 1991), 임신 12주 이내의 태아 간질세포(interstitial cell)에서 스테로이드호르몬의 합성이 관찰되었고(Gondos and Hobel, 1973), 임신중기에 발현되는 estrogen은 햄스터와 소에 있어서 세포분열을 증진시킨다(Angelova, 1987, hamster; Dominguez et al., 1988, bovine)는 보고로 미루어 이 시기에도 스테로이드호르몬이 합성되는 것으로 여겨진다. 그러나 사람의 경우 8주령의 태아에서 aromatase activity가 나타나지만 aromatase 유전자의 발현은 매우 낮은 것으로 확인되어(Tapanainen et al., 1989), 스테로이드호르몬을 합성하는 세포들에 대한 의문과 발생 및 분화단계에서 스테로이드호르몬의 중요성에 대해서는 의문의 여지가 있다(Hartshorne, 1997). 또한, 태아기 FSH의 역할은 난포의 성장과 정상적인 발달에 필수적이라는 보고가 있지만(Peters et al., 1978), 6~16주의 태아 난소에는 FSH의 세포막 결합부위가 존재하지 않으며, FSH에 의한 cAMP의 증가가 관찰되지 않는 것으로 보아(Huhtaniemi et al., 1987) 의문의 여지가 남아 있다.

따라서 본 연구는 일생동안 가장 많은 생식세포가 존재하며, 전 태아기 중에서 FSH의 농도가 가장 높고, 많은 난원세포가 원시난포로 변화는 시기인 18~21주 태아 그리고, 난소내 대부분의 난원세포가 원시난포로 발달한 시기로서, 일부 원시난포가 성장을 시작하며 많은 원시난포에서 폐쇄가 시작되는 시기인 31주의 태아 난소, 그리고 대부분의 생식세포가 원시난포로 변한 시기인 출생 직후의 신생아 난소를 사용하여 사람의 원시난포의 형성, 난포의 성장과 분화 그리고 발달에 미치는 조절요인들의 역할과 배양 조건을 알아보고자 하였다.

#### 1. 원시난포의 형성과 유지에 영향을 주는 난소내 호르몬 수용체, 성장인자 및 성자인자 수용체의 발현양상

19주령과 22주령, 출생 직후의 난소에서 성장인자, 성장인자수용체 및 FSH 수용체 유전자의 발현양상을 RT-PCR, *in situ* hybridization, *in situ* RT-PCR, immunohistochemistry, Western blotting 방법 등으로 확인한 결과 각각의 난소조직에서 FSH 수용체, 성장인자들 및 그 수용체, 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 및 분포 정도가 각각 다르게 나타났다(Fig. 1, 2 and 3; Table 1).

FSH, LH, E의 수용체가 발현되었으며, TGF  $\beta$ 1과  $\beta$ 3 그리고 TGF  $\beta$  receptor I, II 및 estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta$ 가 각각 발현되었고, P53, P27, P21, Rb 등 세포주기 조절과 세포자연사에 관여하는 단백질 및 세포부착에 관여하는 fibronectin,



**Fig. 1. *In situ* RT-PCR and immunohistochemical localization for FSH receptor in human ovaries.** FSH receptor gene expression was recognized on 20 weeks old fetal (A) and 3 days old neonatal ovaries (B) using *In situ* RT-PCR method. Localization of FSH receptor was identified on 20 week-old fetal (C) and 3 day-old neonatal ovaries (D) using immunohistochemical method. Thin arrows, germ cell cord; thick arrows, primordial follicle; arrow heads, streamed cell. Bars present 100  $\mu$ m.

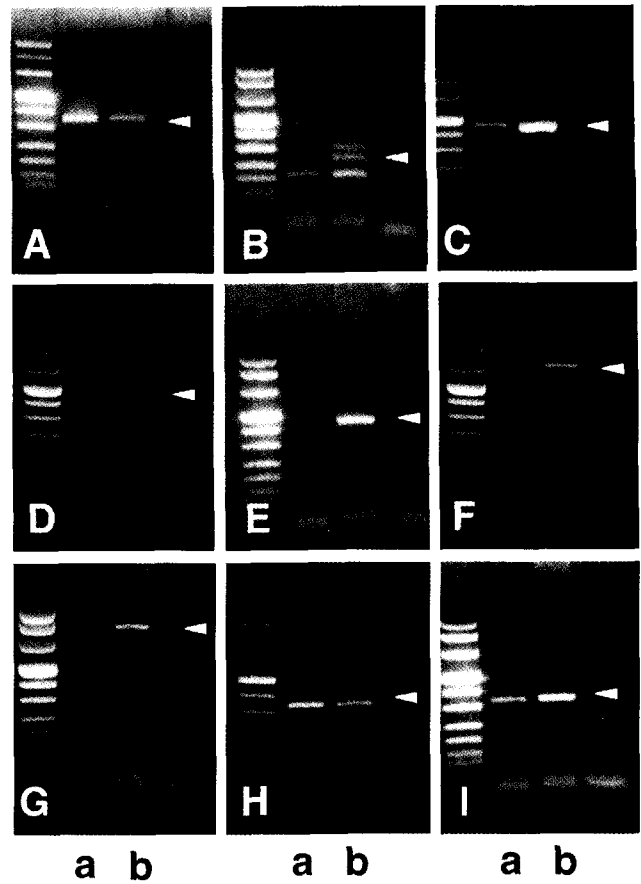
laminin 등의 발현이 생식세포와 간질세포간에 서로 다른 양상을 나타내는 것이 관찰되었다 (Fig. 2 and 3; Table 1). 3주 동안 배양한 19주령 태아의 난소조직에서 FSH 수용체 그리고 LH 수용체 유전자 mRNA의 발현을 확인한 결과, 이들 두 호르몬의 수용체가 모두 발현됨을 확인하였다.

**2. 배양액 조성 and 생식소 자극호르몬이 태아의 주령에 따른 원시난포의 형성 및 발달에 미치는 영향**

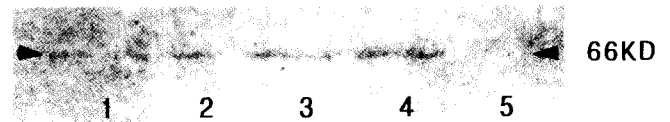
단백질 공급원이 다른 배양액의 조성에 따라 원시난포가 형성되는 양상을 조사한 결과, 난포액(human follicular fluid, FF)에 뇌하수체에서 분리한 FSH(FSH-P)를 처리한 경우가 0.6% BSA 또는 10% fetal calf serum(FCS)을 처리한 실험군에 비하여 유의하게 높은 비율로 형성되었다. 20주 태아의 일부 난소조직에 FF를 처리한 실험군 중 57.1%의 조직들이 성장하여 강소유사구조를 형성하였다.

FCS에 사람의 유전자 재조합 FSH(rh-FSH)를 투여한 실험군에서는 강소유사구조로 부터 난자-난구세포 유사구조가 방출됨을 관찰할 수 있었으며, 강소유사구조를 형성한 모든 난소조직에서 면역조직화학적 방법으로 조사한 결과 TGF  $\beta$  receptor I 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다.

해동시킨 태아 난소조직에서 FSH와 LH의 상승효과를 확인한 결과 rh-FSH와 hCG가 첨가된 실험군에서 건강한 난모



**Fig. 2. Expression of estrogen and TGF  $\beta$  genes and receptor genes FSH, LH, TGF  $\beta$ s in 19 and 22 weeks old human fetal ovarian tissues.** A, FSH receptor; B, LH receptor; C, TGF  $\beta$  1; D, TGF  $\beta$  2; E, TGF  $\beta$  3; F, TGF  $\beta$  receptor I; G, TGF  $\beta$  receptor II; and H, estrogen receptor  $\alpha$ ; I, estrogen receptor  $\beta$ . Lane a, 19 weeks human fetal ovarian tissue; and b, 22 weeks human fetal ovarian tissue. Arrow heads in A, 359 base pair (bp); B, 274 bp; C, 448 bp; D, 439 bp; E, 435 bp; F, 658 bp; G, 862 bp; H, 357 bp; and I, 343 bp.



**Fig. 3. Western blot analysis of FSH receptor expression in the frozen-thawed human fetal ovaria tissues.** Lane 1, human luteinized granulosa cells; lanes 2, 3 and 4, 18, 20 and 22 weeks old human fetal ovarian tissue extracts, respectively; and lane 5, human lymphocyte.

세포를 관찰할 수 있었다. 또한 FCS가 첨가된 TCM-199 기본 배양액에 TGF  $\beta$  2를 처리한 실험군에서는 조직의 괴사현상이 나타났고, 특히 TGF  $\beta$  1과 TGF  $\beta$  2를 동시에 처리한 실험

**Table 1. Localization of FSH-R, LH-R, estrogen receptors, and aromatase in human fetal and neonatal ovarian tissues**

	Fetal ovary				Detection Method	Neonatal ovary		
	Germ cell Cord	Streamed Cells	Oocyte	GC		Oocyte	GC	Detection Method
FSH-R	+	-/+	+/?	+	I,P,IM	+/?	+	I,P,IM
LH-R	+++	nc	-	nc		nc	nc	
Aromatase	-	+	-	+	I,P			I,P
ER $\alpha$	+	-	+	+	P	+	++	
ER $\beta$	nc	+	nc	+	P,IM			IM
ER	+	-	+	+	P	+	+	
PCNA	+++	-/+	+	-/+	IM	++	+	IM
Ki 67	-/+	-	-	-	IM	-	-	IM
Rb	+	-/+	+	+	IM	+	+	IM
p53	+	-/+	-	+	IM	+	+	IM
p27	+	-	+	+	IM	++	-/+	IM
p21	-	-	-	-	IM	+	-/+	IM
Cyclin B1	+	-	+	+	IM	+	+	IM
Cyclin E	+	-	+	+	IM	+	+	IM
Fibronectin	+	+++	+	++	IM	+	+	IM
Laminin	+	-	+	+	IM	+	+	IM
Vimentin	-	+	-	+	IM	-	+	IM
Connexin 43	nc	-/+	nc	-/+	IM	nc	-/+	IM

-, not detected; -/+, some portion of cells were positive; +, positive; nc, not clear; I, *in situ* hybridization method; P, RT-PCR *in situ* hybridization method; IM, immunohistochemical method

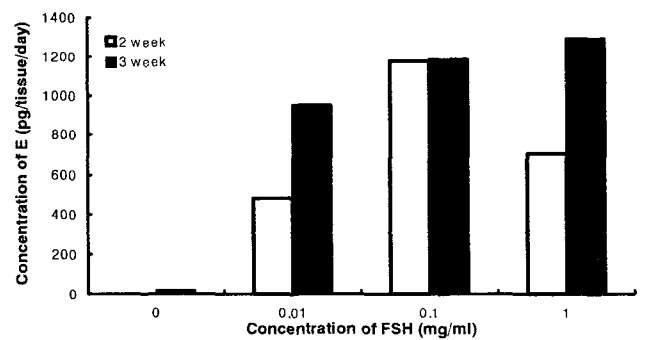
군에서는 대부분의 세포들이 퇴화하였으며, 표면으로부터 세포들이 유리되는 현상이 관찰되었다.

31주령 태아 난소조직에 FCS를 처리한 결과 건강한 원시 난포와 과립세포가 성장을 시작한 난포가 다른 처리군 및 배양전 대조군에 비해 높은 빈도로 나타났다. rh-FSH가 배양기간 동안 난소 내 원시난포의 성장에 미치는 영향을 확인한 결과 rh-FSH의 농도가 증가함에 따라 난포의 폐쇄율이 높아지는 경향을 보였으며, FF와 rh-FSH를 같이 처리한 경우에서 가장 높은 입방형 과립세포의 증가비율이 나타났다.

**3. 배양기간 중 난소조직의 스테로이드호르몬 분비**

19주령 및 31주령 태아난소 조직의 체외배양시 방사면역 측정법으로 E의 농도를 정량한 결과, 두 조직 모두에서 E가 합성, 분비되는 것이 확인되었으며, 특히 19주령의 조직에서는 배양 후 2주부터 E가 합성되었고, 배양 3주째에는 rh-FSH의 농도가 증가할수록 E의 합성량이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4).

또한 rh-FSH와 TGF  $\beta$ 1을 처리한 경우가 rh-FSH와 TGF  $\beta$ 2를 처리한 경우보다 높은 E의 합성율을 보였고, rh-FSH, TGF  $\beta$ 1,  $\beta$ 2를 동시에 투여하여 3주 동안 배양한 경우, E의

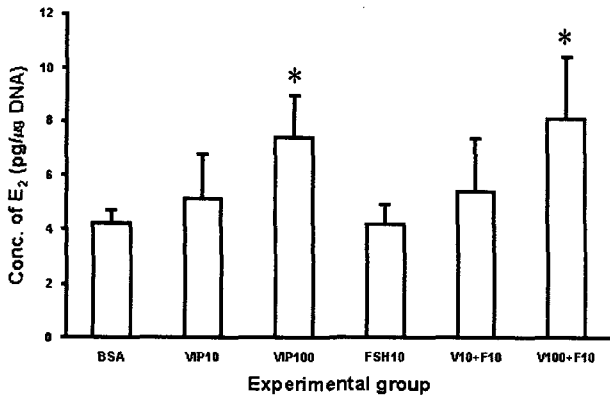


**Fig. 4. Changes of estradiol-17 $\beta$  concentration in 19 weeks old human fetal ovarian tissues cultured for 14 and 21 days supplemented with 0.6% BSA and human recombinant FSH.**

합성이 가장 높았다. 그러나 rh-FSH와 EGF를 동시에 처리한 경우에는 E의 합성이 매우 낮았다.

동결보존 후 해동한 19주령 난소조직의 스테로이드 합성은 배양기간이 증가할수록 스테로이드호르몬의 합성이 증가하는 것으로 나타났다.

31주령 태아 난소조직의 경우 rh-FSH를 투여한 실험군에서 rh-FSH의 농도 증가는 E의 합성을 감소시켰으나 난포의 성장은 증가시키는 것으로 나타났다.



**Fig. 5.** Cumulative concentrations of estradiol-17β during the cultivation of fetal ovarian tissues in human. Twenty-two weeks old human fetal ovarian tissues were cultured for 48 hours supplemented with 0.6% BSA (BSA), 10 μg/ml VIP (VIP10), 100 μg/ml VIP (VIP 100), 10 IU/ml FSH(FSH10), 10 IU/ml FSH+10 μg/ml VIP (V10+F10), and 10 IU/ml FSH+100 μg/ml VIP (V100+F10). Data were presented as mean±S.D. \*, p<0.05 compared to group BSA.

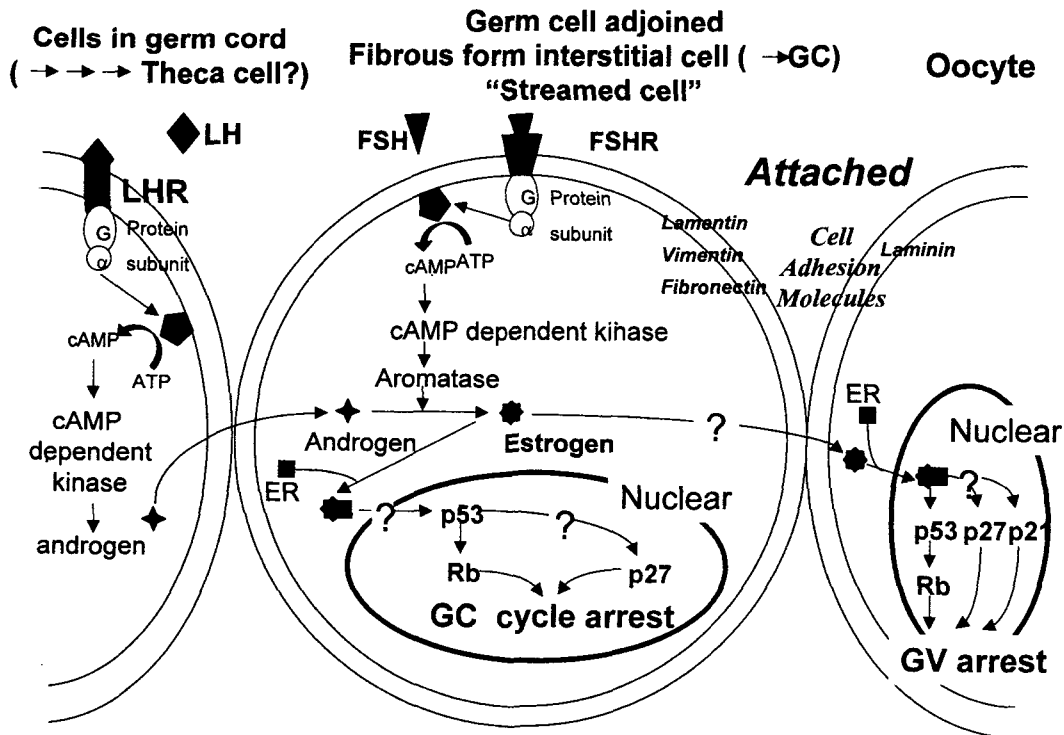
**4. Vasoactive intestinal peptide(VIP)와 원시난포 성장개시와의 연관관계**

동결보존 후 해동한 22주령 태아 난소 4쌍을 사용하여 난모세포 혹은 원시난포의 성장이나 분화에 미치는 FSH와 VIP

의 영향을 알아보았다. 동결보존 후 해동한 태아난소의 조직세포의 생존율을 확인한 결과 45.4~84.3%의 생존율을 보였으며, 본 실험에서 사용한 항동결제인 DMSO와 propyl alcohol의 종류에 따른 생존율의 차이는 없는 것으로 나타났다. 해동 후 3주간 배양한 19주 태아 난소조직에서 0.6% BSA, 10% FCS를 처리한 실험 대조군에서는 원시난포의 성장의 증거를 찾을 수 없었으나, rh-FSH와 hCG가 같이 첨가된 처리군에서는 건강한 생식세포들이 관찰되었고 이들 생식세포들이 동결보존 후에도 생리적 활성을 가지고 있음을 확인하였다. rh-FSH 처리군과 VIP 처리군의 생식세포에서 Ki67 항원의 면역활성이 검출되었고, 배양액 내 E의 농도도 VIP 처리군과 rh-FSH와 VIP 동시처리군에서 비교군 및 다른 실험군에 비해 유의하게 증가되었다(Fig. 5).

**결론**

태아 난소조직의 배양을 통한 원시난포의 형성과 발달에 대한 결과를 종합하면 다음과 같다. 원시난포가 형성 중인 임신중기 태아 난소와 원시난포의 형성이 완료된 신생아 난소에서 나타난 생식소자극호르몬과 스테로이드호르몬 및 그 수용체들, 성장인자 및 그 수용체들 그리고 세포주기 조절단



**Fig. 6.** Hypothetical diagram representing primordial follicle formation and its arrest mechanisms.

백질들의 분포를 참고로 하여 원시난포의 성장억제기전을 유추하였다. 원시난포의 합성과 성장증지는 이 시기의 높은 FSH와 LH에 의한 고농도의 스테로이드호르몬들이 수용체의 활성화와 연관되어 이동중인 미분화된 과립세포들이 난원세포와 이들에 부착되면서 상호작용으로 일어나는 것으로 생각된다.

중기 태아 난소의 체외배양 실험의 결과에서 Hartshorne (1997)이 언급하였던 감소 유사구조를 관찰할 수 있었으며, 이러한 현상은 본 실험의 조건에서 FCS 또는 FF의 특정 성분이 19주 정도의 사람 태아 난소조직에 영향을 주어 나타나게 되는 현상으로 사료된다. 또한 Table 1에서 나타낸 바와 같이 19주 태아 난소 조직의 aromatase 활성은 과립세포의 전 단계 세포이며, 중신에서부터 유래된 streamed cell에서 나타남으로서 E의 생합성 세포는 streamed cell이라는 것을 알 수 있다. 본 실험에서 BSA 실험군에서 rh-FSH의 첨가에 의해 E 합성이 현저히 증가하는 현상은 Table 1에서 나타낸 바와 같이 이 시기 생식세포핵(germ cell cord)에서 발현되는 FSH의 수용체와 반응한 FSH가 태아난소 조직에 직접적인 영향을 주는 것을 의미한다. rh-FSH와 TGF  $\beta$  1,  $\beta$  2 또는 rh-FSH 와 EGF를 같이 처리한 경우 E의 합성 양상이 달라지는 것은 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 TGF  $\beta$  1의 수용체가 발현되며, TGF  $\beta$  가계들은 그들의 수용체를 공유하는 것이 알려져 있어, 이들 또한 19주 시기의 태아 난소 조직에 영향을 주는 것을 알 수 있다.

31주의 경우, rh-FSH에 의한 E의 합성 현상이 거의 없는 것은 Table 1에서 나타낸 바와 같이 이 시기는 FSH 수용체를 가지는 생식세포핵 내의 생식세포들이 대부분의 streamed cell 들에 의해 각각의 원시난포로 분리된 이후이며, 원시난포형성 후에는 과립세포들이 FSH 수용체를 가지나 그 효율성이 떨어지는 것으로 생각되며, 태아의 난소형성기간 중 특정 시기의 이러한 능력 획득이 원시난포의 형성에 중요한 요인이 되는 것으로 생각된다. 31주 난소 조직을 3주간 BSA를 영양 물질로 주어 배양한 실험군의 조직학적 관찰 결과, rh-FSH의 농도에 상관없이 배양에 공여하지 않은 초기 대조군에 비해서는 원시난포의 폐쇄 정도가 높게 나타났으며, FF군에서는 rh-FSH의 농도가 높아짐에 따라 폐쇄 정도와 비율이 농도 의존적으로 낮아짐을 관찰할 수 있었다. 그러나 FCS군에서는 rh-FSH의 농도가 증가할수록 폐쇄비율이 낮아졌으나, 고농도에서는 오히려 높아짐으로서, 이들 FF, FCS 실험군에서는 농도 의존적으로 작용하지만 특정 농도 이상인 경우에는 오히려 상반된 역할을 갖는 것으로 생각된다.

태아의 난소조직의 체외 배양시 TGF  $\beta$ 를 첨가한 실험군

들 중에서 특히 TGF  $\beta$  2만을 처리한 군과 TGF  $\beta$  1과 TGF  $\beta$  2를 동시에 처리한 군에서는 대부분의 난포들이 폐쇄되는 현상을 나타내었고, 동결하지 않은 19주령의 태아 난소조직의 E 합성양상의 결과에서도 TGF  $\beta$  2의 처리 시 E의 합성이 현저히 감소했던 점은 이 시기 TGF  $\beta$  2의 역할이 활성화로서의 역할보다는 억제자로서 세포와 조직의 특성을 유지시키는 역할을 할 것으로 사료되며, 추후 실험을 통해 다시 규명할 필요가 있으리라 생각된다.

태아 난소조직의 배양 결과 밝혀진 E의 생합성의 현상을 규명하기 위하여 aromatase, estrogen 수용체와 각각의 유전자 발현을 확인한 결과 배양 전 난소조직에서 E의 수용체가 발현됨이 확인되어, 20주 경의 난소조직의 발달에는 E가 자가 분비조절인자(autocrine regulator)로서 작용할 수 있으리라 사료된다. 따라서 태아시기 난소에는 특정 단백질 공급원 및 FSH, LH, TGF  $\beta$  뿐 아니라 estrogen도 중요한 조절 역할을 하는 것으로 생각된다.

특히 난원세포가 원시난포로 가장 많이 분화하는 시기지만, 성체 난소에서 E를 합성하는 세포로 알려진 과립세포가 미분화 상태로 있는 18~20주의 난소조직에서 E의 합성이 streamed cell에서 매우 활발히 일어나며, 대부분의 원시난포가 분화를 마치고 전형적인 과립세포들이 나타난 31주 난소조직 내 원시난포의 과립세포에서는 상대적으로 매우 낮은 E의 합성양상을 보여, 과립세포의 미분화시기에는 난소조직 내 streamed cell들이 스테로이드 합성능력을 가지는 것을 알 수 있다. 원시난포의 분화 및 성장정지에 관한 상기의 결과를 Table 6에 나타내었다.

## 요 약

원시난포의 형성, 분화 및 발달과정에서 작용하는 조절요인들인 생식소자극호르몬 및 스테로이드호르몬, 그리고 일부 성장인자들 및 영양공급원들의 역할을 알아 보았다. 그러나 현재까지도 본인들이 제시한 원시난포의 형성과 성장억제의 기전의 가설을 포함하여 사람 난포의 분화 및 성장의 조절에 대한 기전은 상세히 밝혀진 바가 없고, 다른 종간의 조직이식방법에 의해서만 난포의 성장 및 감소형성에 성공한 것이 보고되고 있어 향후 다양한 방향의 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 그러나 성숙기에 들어선 5mm 이상의 난포에 대한 연구들은 성장인자, 호르몬 등의 상호작용의 규명에 있어 많은 진전을 보였고, 지속적으로 성장을 하여 배란에 이르거나 또는 폐쇄에 이르는 운명을 가진 난소내 성장중인 난포들에 대해서도 다양한 성장조절물질과 성장인자들의

역할들이 속속 보고되고 있어 원시난포의 형성, 성장억제 및 개시 등의 분야에 있어서도 향후 많은 발전이 기대된다. 이러한 성장기 난포의 성장조절기전의 연구에 이은 원시난포의 성장억제 및 개시의 연구가 진행된다면 생물학 및 축산분야뿐 아니라 임상의학적 측면에서도 원시난포들이 존재하지만 폐경에 이르는 일부 조기폐경환자, 방사선 치료 또는 화학요법을 요하는 환자의 생식세포의 보관 등의 치료목적으로 원시난포의 이용이 가능하리라 생각한다.

## 인용문헌

- Angelova E, Mitreva B, Toncheva D (1987) Ring chromosome 14 without deletion. *Acta Paediatr Hung* 28: 59-62.
- Baker TG, Scrimgeour JB (1980) Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. *J Reprod Fertil* 60: 193-199.
- Blandau R, Warrick E, Rumery RE (1965) *In vitro* cultivation of fetal mouse ovaries. *Fertil Steril* 16: 705-715.
- Byskov AG (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66: 71-117.
- Carroll J, Gosden RG (1993) Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod* 8: 1163-1167.
- Dominguez MM, Liptrap RM, Basur PK (1988) Steroidogenesis in fetal bovine gonads. *Can J Vet Res* 52: 401-406.
- Enders GC, May JJ 2nd. (1994) Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev Biol* 163: 331-340.
- Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K (1996) Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 44: 260-73.
- Gondos B, Hobel CJ (1973) Interstitial cells in the human fetal ovary. *Endocrinology* 93: 736-739.
- Gondos B, Bhiraless P, Hobel CJ (1971) Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 110: 644-52.
- Gosden RG (1990) Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles. *Hum Reprod* 5: 117-122.
- Gosden RG (1995) Ovulation I: Oocyte development throughout life. In: Gurdzinkas JG (ed), *Gametes-The oocyte*, Cambridge University Press, London, pp 119-149.
- Gosden RG, Huntley JF, Douglas A, Inglis L, Miller HR (1993) Quantitative and cytochemical studies of mast cell proteases in rat ovaries and uteri in various reproductive states. *J Reprod Fertil*. 98: 577-582.
- Gougeon A (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1: 81-87.
- Gougeon A (1993) Dynamics of human follicular growth a morphologic perspective. In: Adashi EY (ed), *The Ovary*, Raven Press, New York, pp 21-39.
- Gougeon A (1997) Steroid 3 $\beta$ -ol-dehydrogenase activity in the largest healthy and atretic follicles in the human ovary during the menstrual cycle. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 17: 1087-1094.
- Gougeon A, Chainy GBN (1987) Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil* 81: 433-42.
- Grumbach MM, Kaplan SL (1973) Ontogenesis of growth hormone, insulin, prolactin and gonadotrophin secretion in the human fetus. In: Cross KW and Nathanielz P (eds), *Fetal and Neonatal Physiology*, Cambridge University Press, New York, pp 362.
- Halpin DM, Jones A, Fink G, Charlton HM (1986) Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. *J Reprod Fertil* 77: 287-96.
- Hartshorne GM, Sargent IL, Barlow DH (1994) Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. *Hum Reprod* 9: 1003-1012.
- Hartshorne GM (1996) Fetal ovarian tissue *in vitro*. *Assist Reprod Rev* 6: 72-82.
- Hartshorne GM (1997) *In vitro* culture of ovarian follicles. *Rev Reprod* 2: 94-104.
- Himmelstein-Braw R, Byskov AG, Peters H, Faber M (1976) Follicular atresia in the infant human ovary. *J Reprod Fertil* 46: 55-59.
- Horie K, Fujita J, Takakura K, Kanzaki H, Suginami H, Iwai M, Nakayama H, Mori T (1993) The expression of c-kit protein in human adult and fetal tissues. *Hum Reprod* 8: 1955-1962.
- Howe E, Lintern-Moore S, Moore GP, Hawkins J (1978) Ovarian development in hypopituitary Snell dwarf mice. *The*



- size and composition of the follicle population. *Biol Reprod* 19: 959-64.
- Huthaniemi JL, Yamamoto M, Ranta T, Jalkanen J, Jaffe RB (1987) Follicle stimulating hormone receptors appear earlier in the primate fetal testis than in the ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 1210-1214.
- Lintern Moore S, Peters H, Moore GP, Faber M (1974) Follicular development in the infant human ovary. *J Reprod Fertil* 39: 53-64.
- Lintern-Moore S (1977) Initiation of follicular growth in the infant mouse ovary by exogenous gonadotrophin. *Biol Reprod* 17: 635-639.
- McKay DG, Hertig AT, Adams EC, Danziger S (1953) Histochemical observation on the germ cells of the human embryo. *Anat Rec* 117: 201-220.
- McLaren A, Buehr M (1990) Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 31: 185-195.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ (2000) Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol* 163: 11-20
- Ohsako S, Bunick D, Hayashi Y (1995) Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90)-high expression in primordial and premeiotic germ cells of male and female rat gonads. *J Histochem Cytochem* 43: 67-76.
- Pesce M, Farrace MG, Piacentini M, Dolci S, DeFelici M (1993) Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118: 1089-1094.
- Peters H (1976) Intrauterine gonadal development. *Fertil Steril* 27: 493-500.
- Peters H, Byskov AG, Grinsted J (1978) Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *J Clin Endocrinol Metab* 7: 469-485.
- Rabinovici J, Jaffe RB (1990) Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev* 11: 532-557.
- Roy SK, Harris SG (1994) Antisense epidermal growth factor oligodeoxynucleotides inhibit follicle-stimulating hormone-induced *in vitro* DNA and progesterone synthesis in hamster preantral follicles. *Mol Endocrinol* 8: 1175-1181.
- Satoh M (1991) Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 177: 85-107.
- Shifren JL, Osathanondh R, Yeh J (1993) Human fetal ovaries and uteri: developmental expression of genes encoding the insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II receptors. *Fertil Steril* 59: 1036-1040.
- Tapanainen J, Boutilainen T, Jaffe RB (1989) Low aromatase activity and gene expression in human fetal testes. *J Steroid Biochem* 33: 7-11.
- Yeh J, Osathanondh R, Villa-Komaroff L (1993) Expression of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor receptor and its ligands, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha, in human first- and second-trimester fetal ovary and uterus. *Am J Obstet Gynecol* 168: 1569-1573.
- Zhang J, Liu J, Xu KP, Liu B, DiMattina M (1995) Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J Assist Reprod Genet* 12: 361-368.