

Gonadotropin Releasing Hormone-Agonist가 임신된 흰쥐 황체세포의 세포자연사에 미치는 영향

양현원 · 김종석¹ · 박철홍² · 윤용달^{2†}

을지의과대학교 생명과학연구소, ¹안동병원 산부인과, ²한양대학교 생명과학과

Effect of Gonadotropin Releasing Hormone-Agonist on Apoptosis of Luteal Cells in Pregnant Rat

Hyunwon Yang, Jong Seok Kim¹, Cheol Hong Park² and Yong-Dal Yoon^{2†}

Life Science Institute, Eulji University School of Medicine, Seoul 139-711, Korea

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Andong Women's Hospital, Andong 760-010, Korea

²Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT : Since GnRH and its receptor genes are expressed in the ovary, it has been suggested that ovarian GnRH might be involved in the regulation of ovarian function and the apoptosis of ovarian cells. However, it was not known well on the expression and function of GnRH and its receptor in the corpus luteum. The present study was undertaken to investigate whether GnRH and its receptor are expressed in luteal cells and GnRH has any effect on the apoptosis of luteal cells. Luteal cells obtained from the pregnant rats were cultured and stained for GnRH and its receptor proteins. Cultured luteal cells showed distinct immunoreactivity against both anti-GnRH and anti-GnRH receptor antibodies. In addition, the presence of GnRH receptor protein in cultured cells was confirmed by Western blot analysis. To investigate the effect of GnRH on the apoptosis of luteal cells, luteal cells were cultured in the presence of 10^{-6} M GnRH-agonist(GnRH-Ag) for 3, 8, and 12h. TUNEL assay showed that the number of cells undergoing apoptosis increased 12h after culture($p<0.05$). DNA fragmentation analysis confirmed the results such that the cells treated for 12h showed the greatest increase of fragmentation($p<0.05$). Further, Western blot analysis of cytochrome c in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of the luteal cells showed that GnRH-Ag treatment increased the content of cytochrome c in cytoplasm. These results demonstrate that the luteal cells express GnRH and its receptor and GnRH-Ag treatment induces apoptosis of the luteal cells via mitochondrial release of cytochrome c. The present study suggest that the releasing of cytochrome c from mitochondria might be involved in the luteal cell apoptosis induced by GnRH-Ag.

Key words : Apoptosis, Cytochrome c, GnRH, Luteal cells, Rat.

요 약 : 최근 난포에서 GnRH와 그 수용체의 발현이 확인되면서 GnRH가 국소적으로 난소의 기능을 조절하고, 특히 과립 세포의 세포자연사(apoptosis)를 유도하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 황체에서 GnRH와 그 수용체의 발현과 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 임신한 흰쥐의 황체세포에서 GnRH와 그 수용체가 발현되는지를 확인하고, 또한 GnRH가 황체세포의 세포자연사를 직접적으로 유발시킬 수 있는지를 알아보고자 시행하였다. 임신된 흰쥐로부터 황체세포를 획득하여 배양한 후 면역조직화학적 염색과 Western blot 방법으로 GnRH와 그 수용체의 발현을 확인한 결과 배양된 황체세포에서 GnRH와 그 수용체가 강하게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. GnRH가 배양된 황체세포의 세포자연사에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 10^{-6} M GnRH-agonist(GnRH-Ag)를 처리한 후 3, 8, 12시간에 TUNEL 방법과 DNA 분절화 검증 방법으로 세포자연사를 조사하였다. TUNEL 결과 세포자연사를 보이는 황체세포는 처리 후 12 시간에 GnRH-Ag 처리 군에서 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 또한 DNA 분절화를 조사한 결과에서도 TUNEL 결과와 유사하게 GnRH-Ag 처리 후 12 시간에 DNA 분절화가 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 이러한 세포자연사의 증가가 cytochrome c 방출과 연관이 있는지를 알아보고자 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c를 Western blot 방법으로 정량한 결과, GnRH-Ag 처리 후 12 시간에 cytochrome c가 미토콘드리아로부터 세포질쪽으로 방출된 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 임신된 흰쥐의 황체세포에서 GnRH와 그 수용체 단백질이 발현되며 GnRH-Ag가 GnRH 수용체에 결합함으로써 cytochrome c가 미토콘드리아로부터 방출되고, 이로 인해 황체세포가 세포자연사하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 국소적으로 분비되는 GnRH가 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출을 유발시켜 황체세포의 세포자연사를 유도할 수 있다는 것을 제시하고 있다.

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-1-20700-002-3) 지원으로 수행되었음.

†교신저자: 서울시 성동구 행당동 산 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2290-0955, (팩) 02-2294-0955. E-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr.

서 론

성선자극호르몬 방출호르몬(GnRH)은 뇌하수체에 의한 성선자극호르몬의 분비를 조절하고, 이러한 성선자극호르몬이 생식소의 스테로이드 호르몬 분비를 조절함으로써 정상적인 생식기능을 유지하는데 중요한 역할을 한다(Andrews et al., 1988; Wierman et al., 1989). 그러나 다량의 GnRH 또는 GnRH-agonist (GnRH-Ag)를 지속적으로 투여할 경우 반대로 난소의 기능을 억제하는 것으로 알려져 왔다(Hsueh & Jones, 1981). 즉, 투여된 GnRH-Ag는 난소 내 스테로이드 호르몬 합성을 억제시키고(Magoffin et al., 1981), 시간과 투여량에 비례하여 과립세포의 세포자연사(apoptosis)를 증가시키는 것으로 보고하였다(Billig et al., 1994). 또한 GnRH-Ag는 황체세포에서 세포자연사와 관련된 Bax 유전자의 발현을 증가시키는 반면 생존과 관련된 Bcl-xL 유전자는 감소시키는 것으로 보고하고 있다(Sridaran et al., 1998; Papadopoulos et al., 1999). 이러한 결과들은 과립세포(Jones & Hsueh, 1980) 또는 황체세포(Harwood et al., 1980; Piper et al., 1981)에 존재하는 특정한 GnRH 수용체에 GnRH-Ag가 결합하여 직접적으로 유도된 것으로 생각하고 있다(Clayton & Catt, 1981; Leung et al., 1989; Peng et al., 1994; Choi et al., 1994).

세포자연사는 caspase라 불리는 단백질 분해효소에 의해 세포내 단백질이 분해되면서 일어나는 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포자연사에 관여하는 것으로 알려지고 있다(Alnemri, 1997; Porter et al., 1997). Caspase는 TNF- α 또는 Fas ligand와 같은 세포자연사 유도 물질에 의해 활성화되며, 활성화된 caspase는 일련의 다른 caspase를 활성화시키면서 미토콘드리아로부터 방출되는 cytochrome c와 함께 세포자연사를 유발시킨다(Boldin et al., 1996; Lim et al., 2002). Cytochrome c는 미토콘드리아 막에 존재하는 통로(channel)를 통해 방출되며 통로를 구성하고 있는 Bcl-x와 Bcl-2 단백질에 의해 조절된다(Muchmore et al., 1996; Minn et al., 1997). 즉, Bcl-2 단백질 활성이 억제될 경우 미토콘드리아 막 투과성을 변화시켜 세포질 쪽으로 cytochrome c를 방출시키는 것으로 알려지고 있다(Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9를 활성화시키고, 이렇게 활성화된 caspase-9은 caspase-3를 활성화시켜 세포자연사를 유도하는 것으로 보고되고 있다(Li et al., 1997).

따라서 본 연구의 목적은 임신된 흰쥐에서 획득한 황체를 이용하여 먼저 GnRH와 그 수용체가 발현하는지를 조사한

다음 배양된 황체세포에 GnRH-Ag를 처리한 후 세포자연사가 일어나는지를 확인하고, 세포자연사가 일어난 황체세포에서 cytochrome c 방출 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 황체 획득 및 세포 배양

본 실험에 사용된 임신 8일령의 Sprague-Dawley 흰쥐들은 14시간 명주기와 10시간 암주기가 조절되고 충분한 사료와 물이 공급되는 동물실험실에서 사육하였다. 임신된 흰쥐로부터 황체를 획득하기 위하여 먼저 흰쥐를 마취시킨 후 복부를 절개하여 양쪽 난소를 적출하였다. 획득된 난소로부터 분리된 황체들은 sodium bicarbonate가 포함된 Medium 199 (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Rockville, MD, U.S.A.)를 이용하여 세척하였다. 황체들은 가위를 이용하여 작은 조각으로 자른 다음 세포 분리용 배양액이 들어있는 작은 삼각플라스크에 옮겼다. 세포 분리용 배양액으로는 calcium과 magnesium이 포함되어 있지 않고, 0.1% BSA, collagenase(50 U/ml), dispase(2.4 U/ml), DNase(200 U/ml) 등이 포함된 HBSS를 사용하였다. 작은 조각으로 잘린 황체들이 들어있는 삼각플라스크는 37°C가 유지되는 항온 수조에 옮기고 30분씩 4번 흔들어서 주었다. 황체들은 다시 0.2% EDTA 용액으로 옮기고 magnetic stir를 이용하여 천천히 15분간 회전시켰다. EDTA로 처리된 황체들은 200×g에서 15분간 원심분리한 후 EDTA 용액을 HBSS로 교환하였다. 마지막으로 pasteur pipet을 이용하여 아직 단일 세포로 분리되지 않은 황체 조직을 위 아래로 pipeting하면서 단일 세포로 만들었다. 이렇게 만들어진 단일 황체세포는 200×g에서 15분간 원심분리한 후 25mM HEPES buffer, penicillin 100IU, streptomycin 100 μ g/ml, gentamicin 50 μ g/ml, 10% fetal bovine serum이 포함된 Medium 199로 옮겼다. 준비된 황체세포는 24-well culture plate(Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, U.S.A.)를 이용하여 배양하였으며, well 당 세포 수는 5×10^5 개로 하였다. 배양은 37°C에서 95% 공기와 5% CO₂가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기 내에서 수행하였으며 배양된 황체세포는 GnRH-Ag 처리 후 4, 8, 12시간에 획득하였다. 황체세포의 Western blot 분석을 위해 급속 냉동 후 -70°C에 보관하였고 일부는 면역조직화학적 염색을 위해 4% paraformaldehyde 용액에 고정하였다.

2. GnRH 및 GnRH 수용체의 면역조직화학적 염색

배양된 황체세포에서 GnRH와 GnRH 수용체에 대한 면역

조직화학적 염색을 위하여 먼저, 배양된 황체세포를 1% paraformaldehyde 용액에서 고정한 후 비특이적 염색을 방지하기 위하여 goat normal serum을 가지고 30분간 상온에서 반응시켰다. 1:200으로 희석시킨 rabbit polyclonal anti-rat GnRH와 GnRH 수용체 일차항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 이용하여 1시간동안 상온에서 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. FITC가 결합되어 있는 anti-rabbit IgG 이차항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 가지고 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 증류수로 세척하고 봉입하였다. GnRH와 GnRH 수용체의 발현은 confocal scanning image analysis system(Fluro View, FV300; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

3. GnRH 수용체 단백질의 Western blot

배양된 황체세포들은 50mM Tris-base(pH 7.4), 150mM NaCl, 10mM EDTA, 0.1% Tween-20, protease inhibitors(0.1mM phenylmethyl-sulfonylfluoride, 5 μ g/ml aprotinin, and 5 μ g/ml leupeptin)이 포함된 균질화 용액에서 분쇄한 후 12,000 \times g에서 30분간 원심분리하였다. 단백질의 농도는 DC protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, U.S.A.)를 이용하여 측정된 후 동일한 양을 10% SDS-PAGE에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동에 의해 분리된 단백질들은 blotting 방법으로 nitrocellulose membrane으로 옮기고, 5% non-fat dry milk가 포함된 Tris-buffered saline(TTBS; 10 mM Tris(pH 7.6), 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) 용액에 1시간 동안 담가 비특이적 결합을 방지하기 위한 blocking을 수행하였다. Membrane은 rabbit polyclonal anti-rat GnRH receptor(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) 일차항체가 1:1,000으로 희석된 TTBS에서 1시간 동안 반응시켰다. TTBS로 1분씩 3회 세척 후 이차항체인 anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 TTBS에 1:1,000으로 희석시킨 후 40분동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 chemiluminescence 용액(ECL kit; Amersham life science, Buckinghamshire, U.K.)으로 발색시킨 다음 X-ray film(Hyperfilm, Amersham Life Science, Buckinghamshire, U.K.)으로 감광하였다.

4. Cytochrome c의 Western blot

배양된 황체세포는 20mM HEPES, pH 7.5, 10mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM PMSF, 50 μ g aprotinin, 50 μ g leupeptin, 50 μ g pepstatin, 0.25M sucrose이 포함된 균질

화 용액에서 분쇄한 후 10분간 얼음에 방치하였다. 분쇄액은 4°C, 500 \times g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 다시 4°C, 10,000 \times g에서 15분간 원심분리하였다. Pellet을 미토콘드리아가 포함된 분획으로 사용하였고 상층액은 다시 4°C, 100,000 \times g에서 60분간 원심분리한 후, 여기서 나온 상층액을 세포질 분획으로 사용하였다. 단백질 정량과 Western blot 방법은 위와 동일하게 수행하였으며, 사용한 일차항체와 이차항체는 각각 monoclonal anti-cytochrome c(Pharmingen, San Diego, CA, USA)와 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 anti-mouse IgG(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.)이었다.

5. 세포자연사 확인을 위한 TUNEL 방법

배양된 황체세포에서 TUNEL 방법으로 세포자연사를 확인하기 위하여 in situ apoptosis detection kit(ApopTag; Intergen, Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 사용하였다. 황체세포가 배양된 각각의 well에 4% neutral buffered formalin을 500 μ l 씩 넣어 10분간 고정 후 Tris buffer로 세척하였다. ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 5분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) 효소를 첨가한 후 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 stop buffer를 상온에서 10분간 처리한 후 Tris buffer로 3번 세척한 다음 anti-digoxigenin-FITC로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 세척한 후 propidium iodide(PI)로 핵을 2차 염색하고 형광현미경하에서 검경하여 황체세포의 세포자연사를 조사하였다. 세포자연사 정도를 정량하기 위하여 임의적으로 선택된 200 배울 시야에서 각각 다른 시야로 5번을 옮기면서 700~1,000 개의 세포를 세었다. 그 중 TUNEL에 의해 녹색 형광으로 염색된 세포 수와 PI로 염색된 전체 세포 수를 비율로 계산하여 세포자연사 정도를 분석하였다.

6. DNA 분절화 조사

배양된 황체세포에서 DNA를 추출하기 위하여 먼저 세포들은 0.3M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.01M EDTA, 0.2M sucrose가 포함된 균질화 용액에서 분쇄하였다. 시료는 0.6% SDS를 넣고 65°C에서 30분간 방치한 다음 0.035M potassium acetate를 넣고 시료를 잘 섞은 후 60분간 단백질이 가라앉도록 얼음에 방치하였다. 시료는 4°C, 5000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 상층액은 미량원심분리 시험관으로 옮기고 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25:24:1, V:V:V)을 첨가하여 DNA를 추출하였으며, 다시 동량의 chloroform : isoamyl alcohol(24:1, V:V)로 재추출하였다. 상층액을 미량원심분리

시험관에 옮기고 0°C에서 보관한 2.5배 부피의 100% ethanol을 첨가한 후 -70°C 초저온 냉동고에서 1시간 이상 침전시켰다. 이들 시료를 4°C에서 14,000×g로 30분간 원심분리하여 DNA를 추출하고 침전물은 50 μl의 1X TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 용해시킨 후 1 μl의 DNase-free RNase(500 μg/ml; Boehringer-Mannheim, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 첨가하고 60분 동안 37°C에서 방치하였다. 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 재 추출하였다. 상층액을 모아서 0.1배 부피의 3M sodium acetate와 0°C에 보관한 2.5배의 100% ethanol로 DNA를 침전시키고 -70°C 초저온 냉동고에서 60분 이상 방치시켰다. 이것을 4°C에서 14,000×g로 30분간 원심분리한 후 0°C에 보관된 0.2ml의 80% ethanol로 세척하고 Speed-Vac Concentrator(Savant Instruments, Holbrook, NY, U.S.A.)로 15분간 진공하에서 건조시켰다. 추출된 DNA는 다시 50 μl의 증류수로 녹이고 spectrophotometer를 이용하여 260nm의 흡광도에서 DNA 양을 정량하였다. DNA 1 μg은 TdT(25U/L in 50% glycerol)와 [³²P]-dideoxy-ATP(5Ci, 3000Ci/mmol)가 포함된 labeling buffer (25mM Tris-HCl, 200mM sodium cacodylate, 5mM cobalt chloride, 250 g/ml BSA, pH 6.6)에서 60분간 반응시켰다. 반응을 끝내기 위해 250mM EDTA (pH 8.0)를 첨가한 후 0.2배의 10M ammonium acetate과 3배의 ethanol을 더 첨가하고 -70°C에서 60분간 방치하였다. DNA는 다시 14,000×g에서 20분간 원심분리한 후 ethanol로 침전시켰다. Labeled DNA는 40mM Tris-acetate와 1mM EDTA buffer에 담겨있는 2% agarose 젤에서 3시간 30분 동안 전기영동(60 volts)을 시행하였다. 젤에서 완전히 물을 제거한 후 Kodak X-Omat films에 노출시켜 DNA 분절화 양상을 확인하였다. 또한 15kb 이하의 DNA fraction들을 젤에서 자른 후 10ml scintillation fluid를 넣어 β-counter로 방사선 방출량을 측정하였다.

7. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 student's t-test 방법을 사용하였으며 p 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 배양된 황체세포에서 GnRH 및 GnRH 수용체 발현 확인

배양된 황체세포에서 GnRH가 강하게 염색된 반면(Fig.

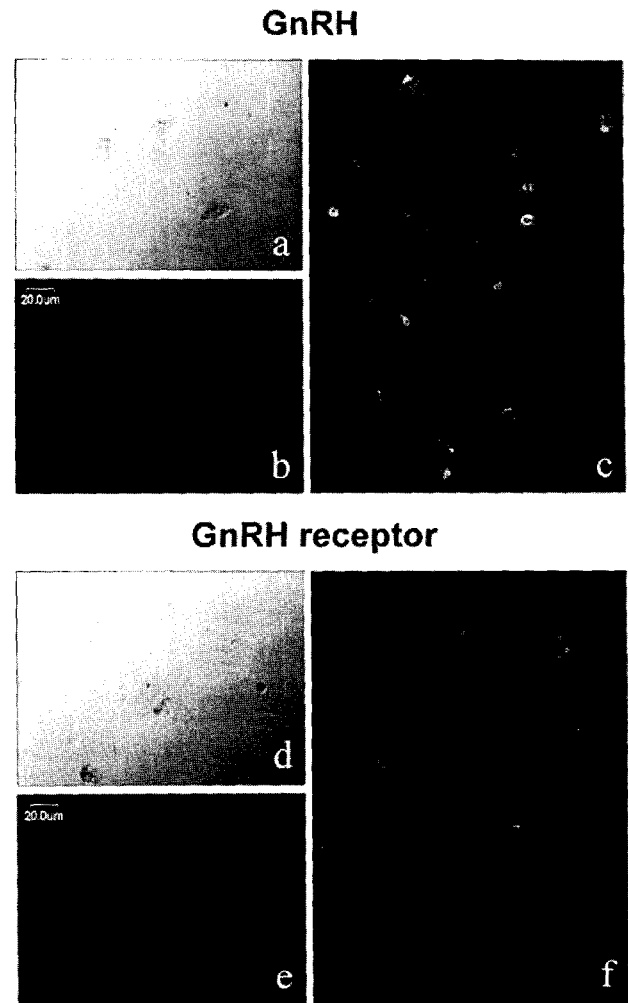


Fig. 1. Confocal immunofluorescence photomicrograph of GnRH and its receptor in the cultured luteal cells. The luteal cells are stained for GnRH(c) and weakly stained for GnRH receptor(f). Negative control(a,d light microscopy; b,e fluorescence microscopy). Magnification ×400.

1c), GnRH 수용체는 상대적으로 약하게 염색된 것을 알 수 있었다(Fig. 1f). 일차 항체를 제거한 후 동일하게 염색을 시행한 음성대조군에서는 GnRH 및 GnRH 수용체 모두 염색이 되지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1b, e).

배양된 황체세포에서 GnRH 수용체의 발현을 정확히 확인하기 위하여 Western blot 방법을 시행한 결과, 황체세포에서 다량 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 뇌하수체에서 다량의 GnRH 수용체 단백질이 검출된 반면, 음성대조군으로 사용한 시상하부에서는 검출되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. TUNEL 방법에 의한 세포자연사 확인

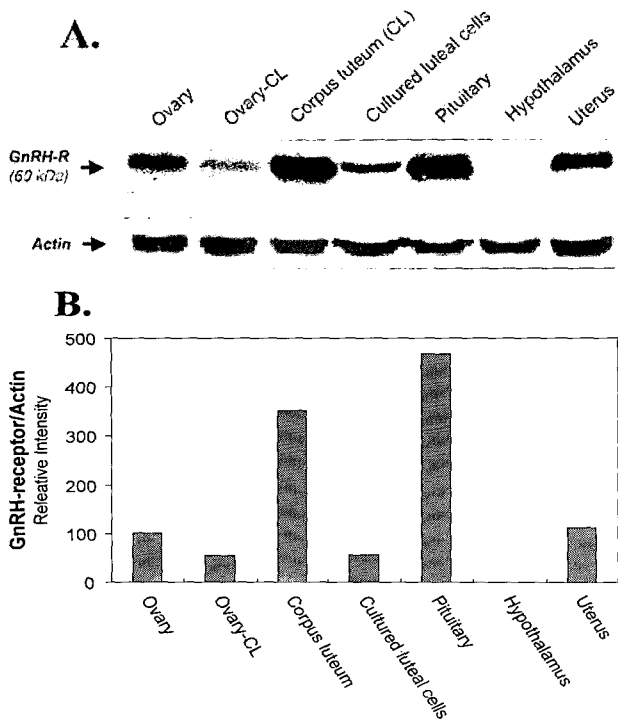


Fig. 2. Western blot analysis for GnRH receptor in various tissues of pregnant rat(A). The corpus luteum shows high amount of GnRH receptor. Also note that all the tissues except hypothalamus show the presence of GnRH receptor(B). Pituitary served as the positive control for the detection of GnRH receptor.

GnRH가 직접적으로 황체세포의 세포자연사를 유발시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 배양된 황체세포에 GnRH-Ag를 처리한 후 TUNEL 방법을 이용하여 조사하였다. 세포자연사가 일어난 세포들에서 녹색 형광으로 염색됨을 관찰할 수 있었고, PI로 핵을 이중 염색을 했을 경우 두 색이 합쳐져 노란색을 보임을 알 수 있었다. 또한 TUNEL에 의해 염색된 세포들은 대부분 세포자연사의 형태적인 특징인 응축된 모양을 보여주었다(Fig. 3A). 황체세포에서 세포자연자가 일어난 정도를 정량화하기 위하여 염색된 세포를 계수하여 비율을 계산하였다. GnRH-Ag처리 후 12시간에 대조군(22.32±1.23%)에 비하여 GnRH-Ag 처리군(34.76±5.37%)에서 유의하게 세포자연사가 증가하는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 3B).

3. DNA 분절화 확인

GnRH-Ag에 의해 유발된 황체세포의 세포자연사를 확인하는 다른 방법으로 DNA 분절화 양상을 조사하였다(Fig. 4A). TUNEL 결과와 동일하게 GnRH-Ag 처리 후 12시간에 처리군(3.2±0.53)에서 대조군(1.12±0.21)에 비해 DNA 분절

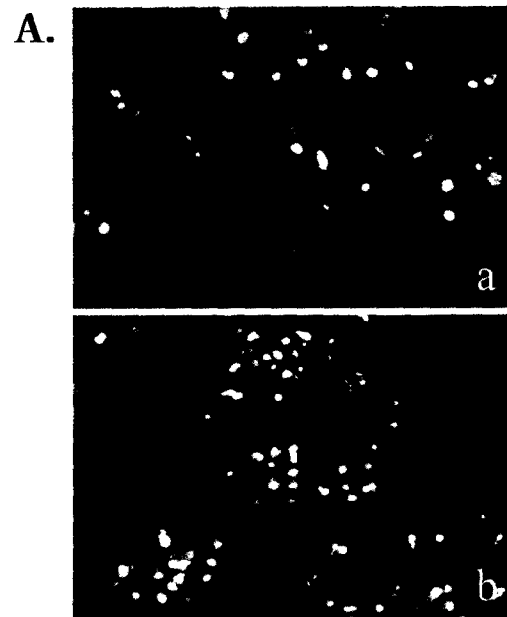


Fig. 3. Detection of apoptotic cells in the luteal cells cultured with saline or GnRH-Ag using TUNEL assay(A). At 12h after saline(a) or GnRH-Ag(b) treatment, apoptotic cells were detected using in situ apoptosis detection kit after fixation. Nuclei were counterstained with propidium iodide and observed under fluorescence microscope(Magnification×400). Cells with green or yellow nuclei were considered apoptotic cells. Quantitative analysis of apoptotic cells in the luteal cells cultured with saline or GnRH-Ag(B). For the quantitative analysis of apoptosis, total cells were counted 700 to 1000 cells for each slide. Data points represent the mean±SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ compared to corresponding saline group.

화 정도가 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 4B).

4. 미토콘드리아에서 Cytochrome c 방출 확인

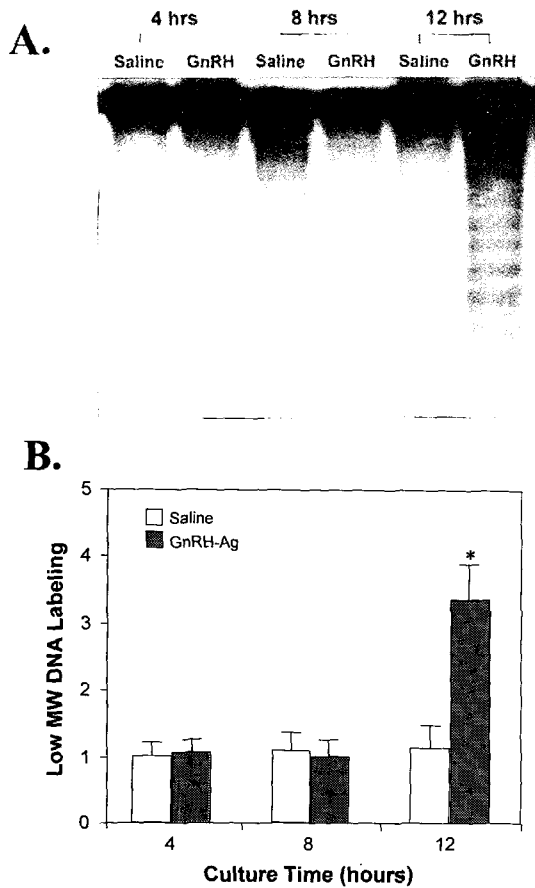


Fig. 4. Effects of GnRH-Ag treatment *in vitro* on DNA fragmentation in the cultured luteal cells. The autoradiographic analysis of DNA fragmentation in the cultured luteal cells(A). The quantitative analysis of low molecular weight DNA fractions under 15kb(B). Data points represent the mean \pm SEM of three independent gel runs. * $p < 0.05$ compared to corresponding saline group.

배양된 황체세포에 GnRH-Ag를 처리한 후 미토콘드리아로부터 방출되는 cytochrome c의 양을 조사하기 위하여 세포질 분획과 미토콘드리아 분획을 분리하여 Western blot을 수행한 결과, 처리 후 4시간과 8시간에서 두 분획 간에 cytochrome c의 양은 대조군 또는 GnRH-Ag 처리군 모두에서 차이를 보이지 않았다. 그러나 GnRH-Ag 처리 후 12시간에 cytochrome c 양은 미토콘드리아 분획에서는 감소한 반면, 세포질 분획에서 3배 이상 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

고찰

GnRH가 난소 내 난포의 성장 또는 스테로이드 합성 등 난소의 기능을 직접적으로 억제시키는 효과를 가지고 있다는

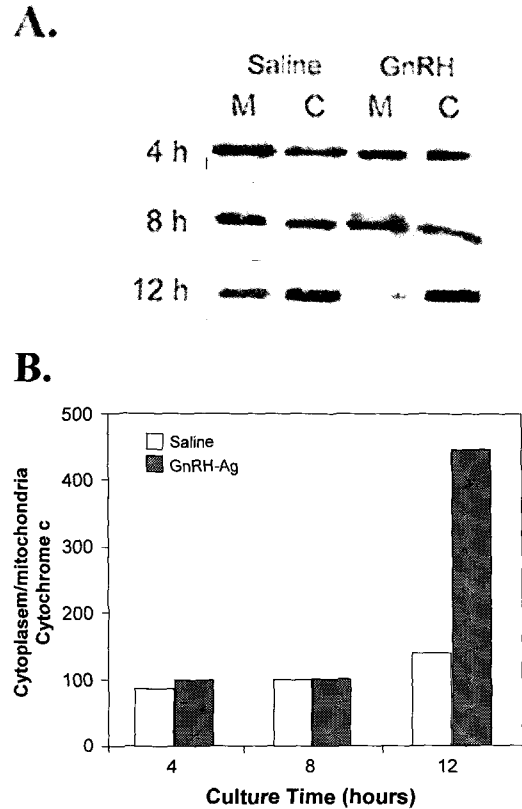


Fig. 5. Western blot analysis of cytochrome c in the cultured luteal cells after saline and GnRH-Ag treatment *in vitro*. 4, 8, and 12 h represent the culture time after GnRH-Ag treatment. Lysates from luteal cells of saline treated(Saline) or GnRH-Ag-treated(GnRH) were probed for cytochrome c using an anti-cytochrome c antibody in cytosolic and mitochondrial fractions (A). Contents of cytochrome c protein decreased in mitochondrial fractions, whereas increased in cytosolic fractions at 12 h after GnRH-Ag treatment, indicating that cytochrome c has been released from mitochondria to cytosol(B).

것은 이미 잘 알려진 사실이다(Hsueh & Jones, 1981). 특히 임신된 환경에 GnRH-Ag를 투여할 경우 황체에 의한 progesterone 합성이 억제되고 세포자연사가 증가되는 것으로 보고되고 있다(Sridaran et al., 1998; Papadopoulos et al., 1999). 그러나 이러한 세포자연사가 황체세포에 존재하는 GnRH 수용체에 직접 작용해서 일어나는 것인지 대한 증거는 부족한 상태이다. 따라서 본 실험에서는 GnRH가 황체에 미치는 직접적인 세포자연사 유발 효과를 증명하기 위하여 임신된 환경의 황체세포에 GnRH-Ag를 처리한 후 세포의 변화를 관찰하였다.

이를 위하여 본 연구에서는 먼저 배양된 황체세포에서 GnRH와 그 수용체의 발현을 확인한 결과, GnRH 수용체의

발현은 배양 후에도 그대로 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었고, 또한 다른 조직과 비교해 볼 때 황체에서 다량 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 황체세포가 난소 내 다른 세포들보다 더 효과적으로 GnRH에 의해 직접적인 조절을 받을 수 있다는 것을 시사한다. 한편 배양된 황체세포에서 GnRH 수용체의 발현 정도는 체내 황체조직에 비해 발현되는 양이 감소해 있는 것을 알 수 있었고, 이는 체외에서 황체세포를 배양하는 조건이 체내 환경과 비교해서 GnRH 수용체 발현을 유지시키기 위한 중요한 요소들이 결핍되어 일어난 것으로 사료된다. 이러한 임신된 흰쥐의 황체세포에서 GnRH와 그 수용체의 발현은 이미 오래 전부터 GnRH-like mRNA가 난소의 협막세포, 과립세포, 그리고 황체 등에서 발현된다는 결과를 뒷받침하는 증거라고 할 수 있다.

난소 내 GnRH 유전자가 난포 내 androgen 양이 많은 androgenic 난포 또는 폐쇄 난포에서 증가된다는 것이 보고되면서(Choi et al., 1994), 난포의 폐쇄와 GnRH 유전자의 발현이 상호 관련이 있을 것으로 가정해 왔다. 또한 GnRH는 뇌하수체에 의한 성선자극호르몬의 분비를 억제하여 난포의 성장을 억제함으로써 난포의 폐쇄를 유발시키는 인자로 알려져 왔다(Birnbaumer et al., 1985). 형태적 판단 기준에 의한 난포의 폐쇄는 성선자극호르몬에 의존적으로 일어나며(Braw & Tsafirri, 1980a; Tsafirri & Braw, 1984), 성선자극호르몬의 처리는 전체 난포들 중 강소 형성 난포와 배란전 난포의 폐쇄를 주로 억제시키는 것으로 보고되고 있다(Braw & Tsafirri, 1980b).

GnRH에 의한 난소내 세포자연사를 유발시키는 기전으로 GnRH가 세포내 Ca^{2+} 양을 증가시키고 phosphatidylinositol을 변환시키는 것으로 보아 protein kinase C 경로를 통해 일어나는 것으로 가정하고 있다(Wang et al., 1992). 그러나 현재까지 GnRH-Ag가 황체세포의 세포자연사를 유발시키는 신호 전달 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 최근 GnRH-Ag의 일종인 Buserelin이 흰쥐 난소내 inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA 발현을 감소시키고 세포자연사를 유도하는 것으로 보고하였다(Matsumi et al., 2000). 또한 배양된 과립세포에 NO 생성 유도물질인 S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine을 처리한 경우 직접적으로 세포자연사가 억제된다는 보고가 있었고(Matsumi et al., 1998), 흰쥐의 난포에 또 다른 NO 생성 유도물질인 sodium nitroprusside을 처리했을 때 세포자연사가 억제되는 것을 확인하였다(Chun et al., 1996). 이러한 결과들은 GnRH-Ag에 의한 황체세포의 세포자연사 증가가 세포 내 NO 농도의 감소로 인해 유발될 수 있다는 것을 시사한다.

한편 본 실험 결과에서 GnRH-Ag 처리 후 황체세포내 미토콘드리아에서 cytochrome c가 세포질 쪽으로 방출되는 것을 확인할 수 있었다. 미토콘드리아의 cytochrome c 방출은 세포자연사가 진행되는 세포에서 일어나는 일련의 현상으로 미토콘드리아의 막 투과성을 잃어버림으로써 나타난다. 미토콘드리아 막에는 세포자연사에 관련된 여러 종류의 단백질들이 존재하며, 특히 Bax, Bcl-xL과 Bcl-2와 같은 단백질들은 막에 존재하는 통로를 구성하고 있으면서 막의 투과성을 조절하는 것으로 알려져 있다(Muchmore et al., 1996; Minn et al., 1997). 일반적으로 Bax와 Bcl-xL은 세포자연사를 유발시키는 단백질로 세포자연사가 일어난 세포에서 증가하고, 반면 Bcl-2는 세포자연사를 억제시키는 단백질로 세포자연사가 일어난 세포에서 감소하면서 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 방출되고 이로 인하여 세포자연사가 유발되는 것으로 보고되고 있다(Liu X et al., 1996; Reed, 1997). 최근 GnRH-Ag에 의해 세포자연사가 유도된 황체세포에서 Bax 유전자의 발현은 증가하는 반면, Bcl-xL 유전자 발현은 감소하는 것으로 보고되고 있다(Sridaran et al., 1998; Papadopoulos et al., 1999). 이러한 결과들을 종합하여 볼 때, GnRH-Ag에 의한 황체세포의 자극은 세포내 NO의 변화를 유도하면서 Bax, Bcl-xL과 Bcl-2와 같은 단백질의 발현을 조절함으로써 미토콘드리아의 막 투과성을 증가시키고, 이로 인하여 cytochrome c가 세포질 쪽으로 방출되면서 세포자연사가 일어나는 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구 결과 GnRH와 그 수용체 단백질이 임신된 흰쥐의 배양된 황체세포에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 배양된 황체세포에 GnRH-Ag의 처리한 결과 직접적으로 황체세포의 세포자연사를 유도시켰으며, 이는 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출을 매개로 이루어진 것으로 사료된다.

인용문헌

- Andrews WV, Maurer R, Conn PM (1988) Stimulation of rat luteinizing hormone β -messenger RNA levels by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 263:13755-13761.
- Alnemri ES (1997) Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 64:33-42.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW (1994) Gonadotropin-releasing hormone(GnRH) directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyri-

- bonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134:245-252.
- Birbaumer L, Shahabi N, Rivier J, Vale W (1985) Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 116:1367-1370.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815.
- Braw RH, Tsafirri A (1980a) Follicles explanted from pentobarbitone treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fertil* 59:259-266.
- Braw RH, Tsafirri A (1980b) Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J Reprod Fertil* 59:267-272.
- Choi WS, Lee SH, Shim C, Cho BN, Baik SH, Yoon YD (1994) Expression and cellular localization of gonadotropin-releasing hormone in the rat. *Mol Cells* 4:267-272.
- Chun S-Y, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicle: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447-1456.
- Clayton RN, Catt KJ (1981) Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 2:186-209.
- Harwood JP, Clayton RN, Chen TC, Knox G, Catt KJ (1980) Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. II. Regulation and effects on ovarian development. *Endocrinology* 107:414-421.
- Hsueh AJ, Jones PBC (1981) Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 2:437-461.
- Jones PBC, Hsueh AJW (1980) Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon luteal luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 107:1930-1936.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Leung PC, Wang J, Baimbridge KG (1989) Mechanism of action of luteinizing hormone-releasing hormone in rat ovarian cells. *Can J Physiol Pharmacol* 67:962-967.
- Lim ML, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, Nagley P (2002) On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci* 9:488-506.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-157.
- Magoffin DA, Reynolds DS, Erickson GF (1981) Direct inhibitory effect of GnRH on androgen secretion by ovarian interstitial cells. *Endocrinology* 109:661-663.
- Matsumi H, Koji T, Yano T, Yano N, Tsutsumi O, Momoeda M (1998) Evidence for an inverse relationship between apoptosis and inducible nitric oxide synthase expression in rat granulosa cells: a possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia. *Endocr J* 45:745-751.
- Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP (2000) Regulation of nitric oxide synthase to promote cytoysis in ovarian follicular development. *Bio Reprod* 63:141-146.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385:353-357.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381:335-341.
- Papadopoulos V, Dharmarajan AM, Li H, Culty M, Lemay M, Sridaran R (1999) Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expression: Correlation with gonadotropin-releasing hormone(GnRH) agonist-induced apoptosis in the corpus luteum. *Biochem Pharmacol* 58:1389-1393.
- Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PC (1994) Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 135:1740-1746.
- Piper DR, Richards JS, Marshall JC (1981) Ovarian gonadotropin releasing hormone(GnRH) receptors: characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology* 108:1148-1155.

- Porter AG, Ng P, Janicke RU (1997) Death substrates come alive. *Bioessays* 19:501-507.
- Reed JC (1997) Cytochrome c: can't live with it can't live without it. *Cell* 91:559-562.
- Sridaran R, Hisheh S, Dharmarajan AM (1998) Induction of apoptosis by a gonadotropin-releasing hormone agonist during early pregnancy in the rat. *Apoptosis* 3:51-57.
- Tsafiriri A, Braw RH (1984) Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 6:226-265.
- Wang J, Steele GL, Bairnbridge KG, Rodway MR, Leung PC (1992) Intracellular calcium and the signaling mechanism of luteinizing hormone-releasing hormone in rat granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol* 167:541-547.
- Wierman ME, Rivier JE, Wang C (1989) Gonadotropin-releasing hormone-dependent regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the rat. *Endocrinology* 124:272-278.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132.