

## 체외배양 중인 생쥐 난소에서 초기난포 조절인자의 발현

차병원 여성의학연구소<sup>1</sup>, 포천중문 의과대학교 생명과학대학원<sup>2</sup>  
윤세진<sup>1</sup> · 김기령<sup>2</sup> · 정형민<sup>1,2</sup> · 윤태기<sup>1</sup> · 차광렬<sup>1,2</sup> · 이경아<sup>1,2</sup>

### mRNA Expression of the Regulatory Factors for the Early Folliculogenesis in vitro

Se-Jin Yoon<sup>1</sup>, Ki-Ryeong Kim<sup>2</sup>, Hyung-Min Chung<sup>1,2</sup>, Tae-Ki Yoon<sup>1</sup>,  
Kwang-Yul Cha<sup>1,2</sup>, Kyung-Ah Lee<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Infertility Medical Center, CHA General Hospital, <sup>2</sup>Graduate School of Life Science and  
Biotechnology, Pochon CHA University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Objective:** To understand the crucial requirement for the normal early folliculogenesis, we evaluated molecular as well as physiological differences during in vitro ovarian culture. Among the important regulators for follicle development, anti-Müllerian hormone (AMH) and FSH Receptor (FSHR) have been known to be expressed in the cuboidal granulosa cells. Meanwhile, it is known that c-kit is germ cell-specific and GDF-9 is also oocyte-specific regulator. To evaluate the functional requirement for the competence of normal follicular development, we investigated the differential mRNA expression of several factors secreted from granulosa cells and oocytes between in vivo and in vitro developed ovaries.

**Materials and Methods:** Ovaries from ICR neonates (the day of birth) were cultured for 4 days (for primordial to primary transition) or 8 days (for secondary follicle formation) in  $\alpha$ -MEM glutamax supplemented with 3 mg/ml BSA without serum or growth factors. The mRNA levels of the several factors were investigated by quantitative real-time PCR analysis. Freshly isolated 0-, 4-, and 8-day-old ovaries were used as control.

**Results:** The mRNA of AMH and FSHR as granulosa cell factors was highly increased according to the ovarian development in both of 4- and 8-day-old control. However, the mRNA expression was not induced in both of 4- and 8-day in vitro cultured ovaries. The mRNA expression of GDF-9 known to regulate follicle growth as an oocyte factor was different between in vivo and in vitro developed ovaries. In addition, the transcript of GDF-9 was expressed in the primordial follicles of mouse ovaries. The mRNA expression of c-kit was not significantly different during the early folliculogenesis in vitro.

**Conclusion:** This is the first report regarding endogenous AMH and FSHR expression during the early folliculogenesis in vitro. In conclusion, it will be very valuable to evaluate cuboidal granulosa cell factors as functional marker(s) for normal early folliculogenesis in vitro.

**Key Words:** Early folliculogenesis, Ovarian culture, AMH, FSH Receptor, GDF-9, c-kit

포유류의 난포발달과정 (folliculogenesis)은 여러 가지 호르몬과 성장인자들이 작용하여 난자와 과립세포 (granulosa cells), 그리고 협막세포 (theca cells) 등의 성장과 분화를 조절하는 과정을 말한다.<sup>1</sup> 난포의 성장개시는 휴지상태에 머물러 있던 원시난포가 성장단계로 들어가는 것을 의미하며 이때에 편평한 (flattened) 과립세포는 입방형 (cuboidal)으로 형태가 바뀌고 유사분열을 통해 계속 증식하고 난자의 성장도 시작된다. 원시난포가 발달하여 일차난포가 되고 과립세포가 증식하여 두 층의 입방형 과립세포를 가지는 이차난포로 발달하는 초기난포 발달과정에는 성선자극 호르몬 보다는 난소내의 성장인자와 같은 국소 조절인자 (paracrine factor)의 작용이 중요하다고 알려져 있다. 따라서 초기난포의 체외배양시에는 적절한 조절인자를 첨가한 배양 조건이 중요하며 난자와 과립세포가 상호작용을 활발히 하여 난자의 성장과 더불어 과립세포가 발달하고 증식하게 될 때 정상적인 난포발달이 일어나게 된다.

초기의 난포발달, 특히 성장이 억제된 원시난포의 성장에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 인자로는 kit ligand (KL),<sup>2</sup> growth and differentiation factor-9 (GDF-9),<sup>3</sup> basic fibroblast growth factor (bFGF),<sup>4</sup> nerve growth factor (NGF),<sup>5</sup> leukemia inhibitory factor (LIF),<sup>6</sup> insulin,<sup>7</sup> bone morphogenic protein-7 (BMP-7)<sup>8</sup> 등이 있고 반면에 anti-Müllerian hormone (AMH)<sup>9</sup>는 원시난포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 AMH의 생쥐 난소에서 원시난포의 성장을 억제한다는 기능에 반하여 최근에 인간 난소조직을 배양한 연구에 있어서는 AMH를 처리함으로써 원시난포의 성장을 촉진했다는 상반된 연구 결과가 보고되었다.<sup>10</sup> 이 외에도 KL의 수용체인 c-kit은 난자에서 발현하여 난자 성숙과 협막세포의 분화를 조절하며 난포발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>11</sup> Follicle stimulating hormone (FSH)의 수용체인 FSH receptor (FSHR)가 결여되었을 때 c-kit 단백질 발현이 억제되며 난포의 환경이 바뀌게 되고 따라서, 난자와 과립세포 간의 상호작용 (oocyte-granulosa interaction)에 문제가 생긴다고 알려져 있다.<sup>12</sup>

현재까지 원시난포가 왜 성장이 억제되는지 또 어떻게 성장이 활성화되는 지에 대한 자세한 기전

은 아직까지 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 난포의 초기발달과정을 이해하기 위하여 생식세포의 대부분이 원시난포로 구성된 출생 직후의 생쥐의 난소를 적정 호르몬이나 성장인자가 첨가되지 않은 기본 배양액에서 체외배양하면서 체내에서 발달한 난소에 비해 난포발달에 중요한 몇몇 인자의 유전자 발현이 어떠한 양상을 보이는지 알아봄으로써 정상적인 초기난포발달을 추측할 수 있는 기능성 마커를 알아보고자 수행하였다. 성장하는 일차난포와 이차난포의 과립세포에서 특이적으로 발현하는 AMH와 FSHR를 과립세포인자 (granulosa cell factor)로서, 그리고 난자에서 분비되어 초기난포발달을 조절한다고 알려져 있는 GDF-9와 c-kit을 난자 조절인자 (oocyte factor)로, 각 인자의 유전자 발현을 체내발달 및 체외배양된 난소에서 비교 분석하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

본 실험에서는 출생 직후의 ICR 암컷 생쥐에서 얻은 원시난포로만 이루어진 난소를 체외배양에 사용하였다. 일차난포로의 발달이 가장 많이 일어나고 아직 이차난포로 발달하지 않는 단계로서 태어난 날로부터 4일자 난소를 사용하였고 이차난포로의 발달이 가장 활발한 단계로서 태어난 날로부터 8일자 난소를 사용하여 초기난포발달의 대조군으로 사용하였다.

### 2. 난소의 체외배양

태어난 날의 ICR 암컷 생쥐에서 난소를 적출하여 Leibovitz L-15 (Gibco) 배양액으로 세척한 후 해부 현미경 하에서 29 gauge 주사기 (B-D)를 이용하여 bursa를 제거하고 순수한 난소만을 얻었다. 배양액은  $\alpha$ -MEM glutamax (Gibco)에 ITS (insulin, 6.25  $\mu$ g/ml; transferrin, 6.25  $\mu$ g/ml; selenium, 6.25 ng/ml; Sigma), 3 mg/ml BSA (Sigma), 50 IU/ml penicillin G, 50 ng/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 기본 배양액으로 사용하였다. Millicell-CM insert (Millipore)를 24-well culture plate (Costar)에 넣고 insert 바깥 부분에 배양액을 400  $\mu$ l를 넣고 각각의 membrane 위쪽에 준비된 난소를 5개씩 올려서 난소 윗부분으로 배양액이

얇은 막을 형성하도록 하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2일에 한번 200 µl씩 교체하였다. 배양 4일째와 8일째에 난소를 PBS로 세척하여 유전자 발현 분석을 위해서는 액체질소에 급속 냉동시켜 사용 전까지 -70°C의 저온냉동기에 보관하였고, 조직학적 관찰을 위해서는 10% neutral-buffered formalin solution (NBF)에 고정하였다.

### 3. 조직학적 관찰

각 시기별 난소의 발달과정을 형태학적으로 관찰하기 위해서 paraffin block을 제작하여 5 µm 두께로 절편하였다. Xylene 처리과정을 통해 절편으로부터 paraffin을 제거하고, 알코올 처리과정을 거쳐 물로 세척한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하였다. 각 다섯 절편마다 한 개 절편씩 선택하여 절편에 있는 핵이 보이는 난포만 선택하여 난자와 난포의 지름을 재어서 각각의 평균 값을 구하였다. 이를 통해 체내에서 발달한 생후 4일과 8일자 난소와 체외에서 발달한 배양 4일과 8일자 난소에서 난포발달에 차이가 있는지 분석하였다.

### 4. Total RNA 분리 및 정량적 역전사 증합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time RT-PCR)

각 시기별 난소조직을 TRIzol (Invitrogen)을 사용하여 균질화 시킨 후 RNA를 분리하였다. 동량의 RNA를 사용하여 MMLV reverse transcriptase (Pro-

mega)와 oligo(dT) primer를 사용하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성한 후 이들을 대상으로 난포발달에 관여하는 유전자들의 발현 양상을 MyiQ system (Bio-Rad)을 사용한 real-time PCR로 정량적 분석을 하였다. 이용한 primer들의 염기서열은 Table 1에 정리하였다. 각각의 primer에 대한 real-time PCR 조건을 최적화하였고 internal control 유전자로서 GAPDH를 사용하였다.

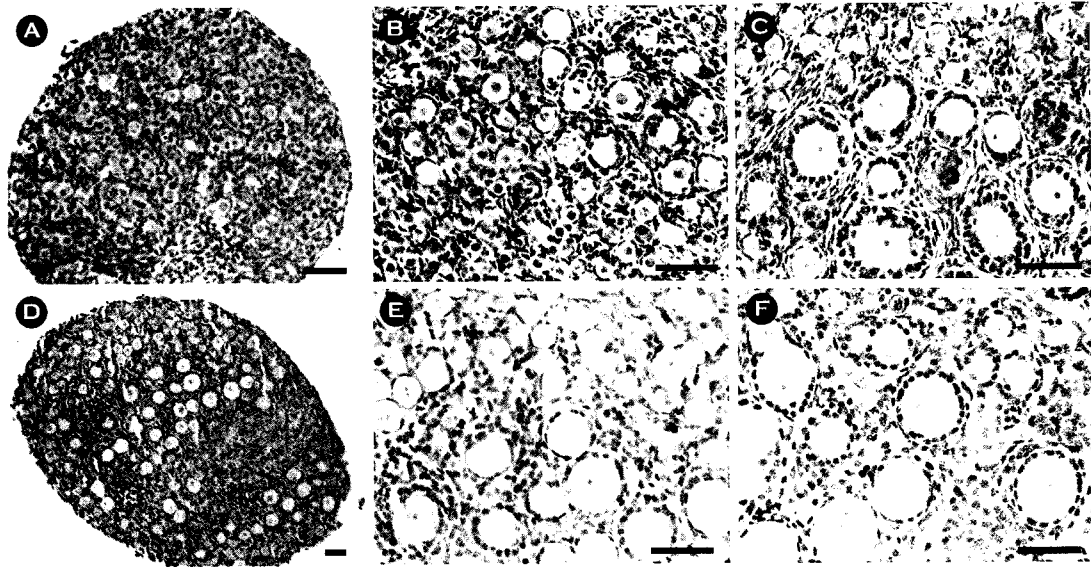
### 5. In situ hybridization

각 단계별 생쥐의 난소 (출생 직후, 생후 10일, 생후 4주령) 조직을 4% paraformaldehyde에서 하루 동안 고정시킨 후 paraffin block을 제작하였으며, 5 µm 두께의 연속절편을 코팅 처리된 ProbeOn 슬라이드 (Fisher)에 부착하였다. 실험에 사용할 GDF-9 cDNA probe는 Table 1에 명시된 GDF-9 특이적인 primer로 PCR하여 446 bp의 염기서열을 얻은 후 pGEM-T vector (Promega)에 subclone한 후 염기서열 분석 (sequencing)으로 확인하였다. Subclone된 GDF-9 cDNA는 Sac II 제한효소로 절단하여 [<sup>35</sup>S]-UTP (Amersham)을 이용하여 SP6 RNA polymerase (Promega)로 전사 (in vitro transcription)시켜 antisense probe를 얻었고 control로 사용한 sense probe는 Not I 제한효소로 절단하여 T7으로 전사시켜서 얻었다. 준비된 조직 슬라이드를 paraformaldehyde에 고정시키고 antisense와 sense riboprobe로 60°C에서 over-

**Table 1.** Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions

Genes	Oligonucleotide Sequences	AT (°C)	Size (bp)
AMH	F 5'-GAGCTCTTGCTGAAGTTCCAAG-3'	60	244
	R 5'-CTGCTTGGTTGAAGGGTTAAGA-3'		
FSHR	F 5'- TCTTCACGGACTTTCTCTGC-3'	58	234
	R 5'- TCTTGTAATCTGGGCTTGC -3'		
GDF-9	F 5'-GGTTCTATCTGATAGGCGAGG-3'	60	446
	R 5'-GGGGCTGAAGGAGGGAGG-3'		
c-kit	F 5'- CTGCTTGGCGCATGCACGG-3'	60	655
	R 5'- CCGGCATCCCTGGGTAGGG-3'		
GAPDH	F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	60	452
	R 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

AT, annealing temperature; F, forward; R, reverse primer



**Figure 1.** Histological sections of in vivo developed and in vitro cultured neonatal mouse ovaries. **A**, Section of the control ovary of a newborn ICR mouse on the day of birth (Day 0). Note that the only follicles present are primordial follicles. **B** and **C**, Sections of the in vivo developed ovaries from 4-day-old (**B**) and 8-day-old (**C**) mice; **D**, **E** and **F**, Sections of the in vitro cultured ovaries for 4-day (**D** and **E**) and 8-day (**F**). Note the presence of many growing oocytes in the medullary region of the ovary. The growing oocytes are enclosed within 1~2 layers of granulosa cells. The remaining primordial follicles are mostly located in the ovarian cortex. Scale bars indicate 50  $\mu$ m.

night hybridize 시켰다. 이후 post-hybridization 시키고 세척한 후 autoradiography X-ray film (Amersham)으로 3일간 감광시킨 후 NTB-2 Emulsion (Kodak)에 담근 후 4°C에서 2주간 감광시켰다. D-19 (Kodak)로 develop한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하고 암시야 (dark field)와 명시야 (bright field)에서 관찰하였다.

## 6. 통계분석

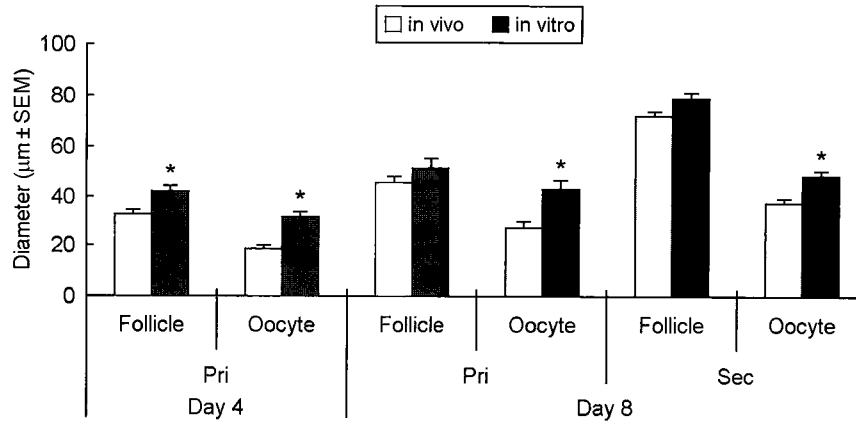
통계학적 유의성 검증은 one-way ANOVA 및 log linear model을 이용하여 수행하였으며 p 값이 0.05보다 작은 경우를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 생쥐의 발달단계와 체외배양에 따른 난소의 조직학적 관찰

출생 직후의 생쥐 난소에서는 대부분의 생식세포들이 원시난포의 전형적인 형태인 한 층의 편평한

과립세포에 의해 난자가 둘러 싸여 있으며 일부 원시난포는 이미 성장을 시작하여 다른 원시난포에서 보다 난자의 크기가 커져 있음을 관찰할 수 있었으나 대부분의 원시난포들이 성장을 시작하지 않은 상태에 머물러 있음이 관찰되었다 (Figure 1A). 생후 4일째의 경우 난소의 피질 (cortex)에 수많은 전형적인 원시난포들이 분포하며 입방형의 과립세포를 가진 일차난포들이 난소의 중앙부에 위치하는 것을 볼 수 있으며 아직 이차난포는 관찰되지 않았다 (Figure 1B). 생후 8일째의 난소에서는 난소의 중앙부에 성장이 활발한 이차난포들이 다수 관찰되었으나 아직까지 antrum을 형성한 난포는 관찰되지 않았다 (Figure 1C). 태어난 날의 생쥐 난소를 체외배양하였을 때 배양 4일째 (Figure 1D and E)에서 많은 일차난포들이 체내발달과 마찬가지로 난소 중심에 있는 것이 관찰되었고 배양 8일째 (Figure 1F)에도 많은 일차난포와 이차난포들이 발달하였음을 관찰할 수 있었다. 그러나 체내발달과 체외발달의 경우 형태적으로 다른점을 관찰할 수 있었는데, 체외배양한 경우에 난포의 크기가 상당히 커 있음을 알

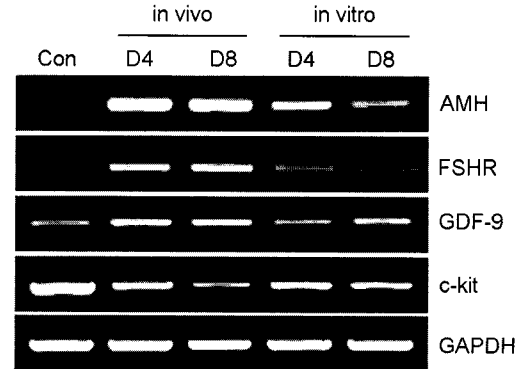


**Figure 2.** Mean diameters ( $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ ) of healthy follicles and oocytes in the sections of in vivo developed and in vitro cultured ovaries. The diameter of primary (Pri) and secondary (Sec) follicles was determined in every fifth section of the follicles only those in which the nucleus of the oocyte was clearly visible. Separate culture was repeated three times and data were expressed as mean  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$ .

게 되었고 특히 난포 안의 난자의 크기가 체내에서 발달한 난소보다 커져있고, 반면에 그 난자를 둘러싸는 과립세포는 입방형으로 잘 발달하지 못한 두 층이 매우 얇아진 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 관찰된 난포 및 난자의 크기를 측정 한 결과 배양 4일째에 관찰된 일차난포의 경우, 체내에서 성숙된 생후 4일째에서의 일차난포에 비해 난자와 난포의 지름이 모두 유의적으로 컸다. 배양 8일째에서는 일차난포와 이차난포 모두, 난포 자체의 지름에는 차이가 없었지만 과립세포의 층이 매우 얇은데 비해 이들이 둘러싸는 난자의 크기가 비대하게 커져있음이 관찰되었다 (Figure 2).

## 2. 난포발달에 관여하는 여러 유전자의 발현 양상

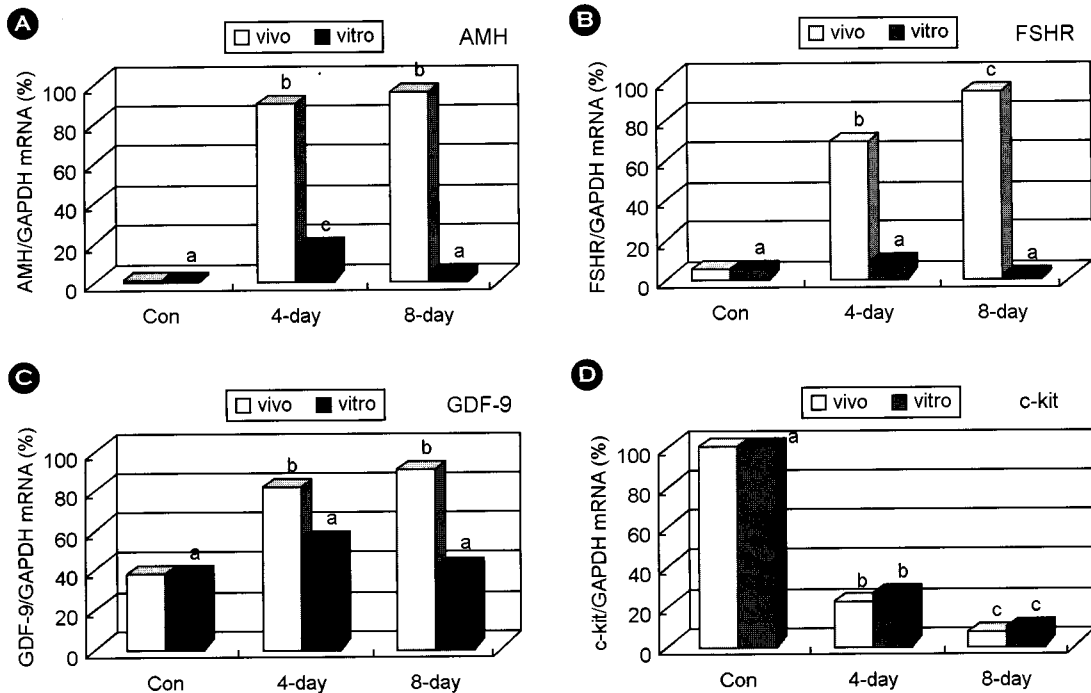
난포발달에 관여한다고 알려진 유전자 중에 특히 입방형의 과립세포에서 높게 발현하는 유전자인 AMH와 FSH 수용체 (FSHR)의 발현 양상을 알아보고, 반면에 난자 특이적으로 발현하여 난포발달에 영향을 준다고 잘 알려져 있는 GDF-9과 생식세포 특이적인 c-kit 유전자의 발현 양상을 체내발달한 난소와 체외배양된 난소에서 차이가 나는지 알아보았다. 이들 유전자에 대한 특이적인 primer (Table 1)를 제작하였고, 각 시기별 난소조직으로부터 RNA를 분리하고 역전사 반응을 통해 얻어진 동일한 cDNA로 각각의 annealing 온도에서 30회씩 증



**Figure 3.** Expression of mouse AMH, FSHR, GDF-9, and c-kit mRNA. RT-PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels. GAPDH was used as an internal control. Con, a newborn mouse ovary on the day of birth (Day 0); D4 and D8, in vivo or in vitro developed ovaries for 4 days (D4) or 8 days (D8).

폭시킨 후 이들을 1.5% agarose gel 상에서 확인하였다 (Figure 3).

정량적인 분석을 위하여 real-time PCR을 시행하여 GAPDH 유전자 발현에 대한 상대적인 발현 양을 보았는데, 세 번의 독립된 배양실험과 각 배양 실험당 두 번의 정량 분석을 통해 가장 높게 발현하는 유전자의 수치를 100%로 보았을 때의 평균 수치를 그래프로 나타내었다 (Figure 4). 성장하는 난포의 입방형의 과립세포에 특이적으로 발현하는



**Figure 4.** Relative expression levels of mouse AMH (A), FSHR (B), GDF-9 (C), and c-kit (D) mRNA from in vivo developed (in vivo) and in vitro cultured (in vitro) ovaries by quantitative real-time PCR analysis. Newborn mouse ovary on the day of birth (Con) was cultured for 4 or 8 days. Experiment was repeated three times and the relative amount of each mRNA was normalized to GAPDH mRNA levels. Bars with different letters indicate that group means are significantly different at  $p < 0.05$ .

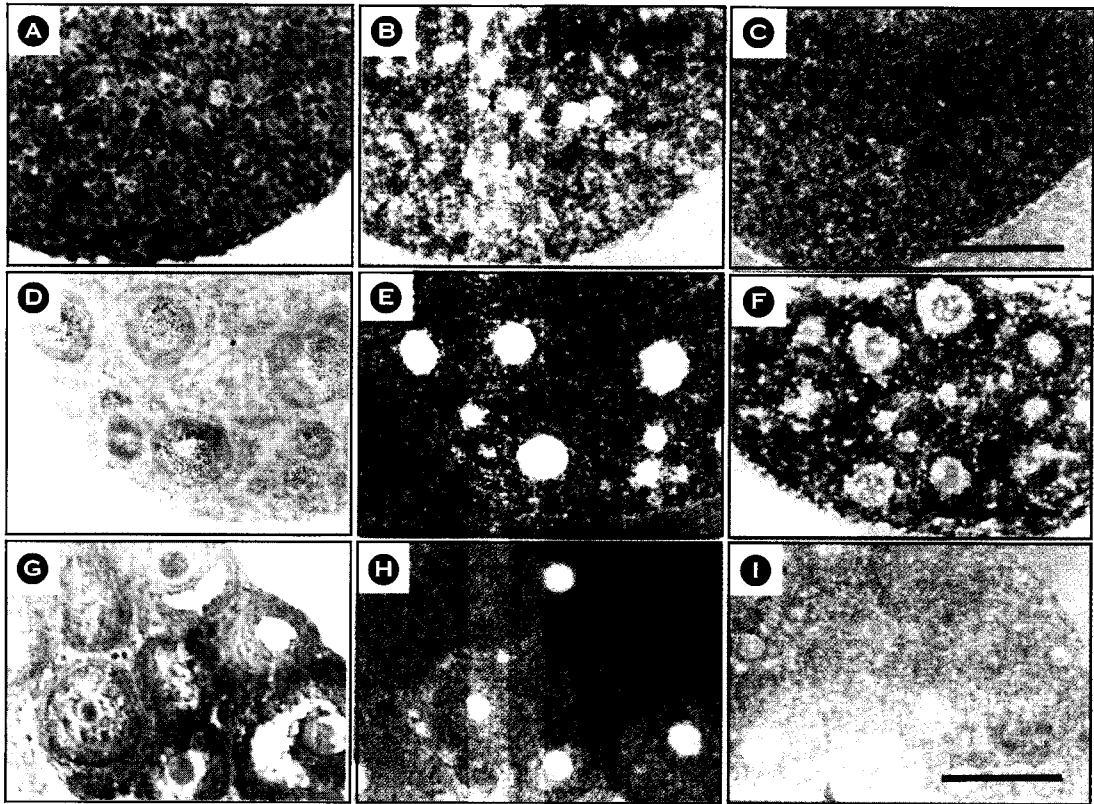
AMH와 FSHR는 원시난포로만 구성된 태어난 날의 난소에서는 거의 발현하지 않지만 난소의 발달 4일과 8일에 그 발현 양이 현저히 높아짐을 알 수 있고 반면에 체외에서 배양한 경우에 유전자 발현이 체내발달처럼 증가되지 못하고 현저히 낮은 수치에 머물러 있음을 관찰하였다. 난자 특이적인 GDF-9 유전자 발현은 원시난포로만 이루어진 출생 직후의 난소에서도 발현하였고 체내의 난소발달에 따라 높게 증가하였으나, 체외배양의 경우에는 체내에서 발달한 것보다 낮은 수치로 발현하였다. 유전자 c-kit은 원시난포에서 가장 높게 존재하다가 체내의 난소 발달 단계가 진행되면서 그 발현 양이 점차 감소하였고 체외배양에서도 비슷하게 발현하여 유의적인 차이는 없었다.

### 3. 생쥐 난소에서 GDF-9의 발현 양상

현재까지도 GDF-9 유전자의 원시난포에서의 발현 여부에 대해서는 상반된 주장이 제시되고 있

며 생쥐의 경우 원시난포에서는 발현하지 않으며 일차난포 이후의 난자에서 특이적으로 발현한다고 알려져 있다.<sup>13</sup> 그러나 우리는 앞의 정량적 분석을 통한 실험에서 원시난포로만 이루어진 출생 직후의 난소에서 GDF-9 유전자가 높게 발현함을 확인할 수 있었고 이들이 원시난포에서 발현하는지를 조직 상에서 다시 한번 확인하고자 in situ hybridization을 시행하였다.

원시난포로만 이루어진 출생 직후의 생쥐 난소는 조직 관찰에서와 동일하게 일차난포는 관찰되지 않았고 대부분의 생식세포들이 한 층의 편평한 과립 세포에 의해 난자가 둘러싸여 있는데 이중에서도 이미 성장을 시작하여 다른 원시난포의 난원세포보다 크기가 큰 원시난포에서 GDF-9이 발현하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 5A and B). 생후 10일자의 생쥐 난소에서는 성장하는 일차난포와 이차난포가 많이 존재하며 이들의 난자에서 특이적으로 발현하였고 원시난포에서도 발현하는 것을 확인하



**Figure 5.** Localization of GDF-9 transcript by in situ hybridization. Sections of ovaries isolated from newborn (on the day of birth, A-C), postnatal 10-day (D-F), and postnatal 4-week (G-I) old mice were hybridized with either antisense (A, B, D, E, G, and H) or sense (C, F, and I) GDF-9 riboprobes. As seen in brightfield (A, D, and G) and darkfield (B, E, and H) images, GDF-9 hybridization signal was concentrated over oocyte (arrows, primordial; arrow head, primary follicles). Scale bars represent 100  $\mu$ m (A-F) and 200  $\mu$ m (G-I).

였다 (Figure 5D and E). 모든 단계의 난포가 다 존재하며 특히 antrum이 형성된 난포가 많이 관찰되는 생후 4주의 난소에서 GDF-9의 난자 특이적 발현을 관찰하였다 (Figure 5G and H).

## 고 찰

본 연구는 난포의 초기발달과정을 이해하고자 원시난포로만 구성되어 있는 출생 직후의 생쥐 난소를 호르몬이나 성장인자가 첨가되지 않은 상태에서 체외배양하였을 때 난포발달에 영향을 주는 것으로 알려진 조절인자들의 유전자 발현을 체내에서 발달한 난소와 비교하였다. 성장하는 입방형의 과립세포에서 특이적으로 발현하는 AMH와 FSHR의 경우에는 일차난포로의 성장이 왕성한 생후 4일자와 이차

난포가 성장이 활발한 생후 8일자에서 현저히 증가했지만 기본 배양액에서 배양된 생쥐 난소에서는 이들 유전자의 발현이 체내에서와는 달리 발현이 억제되는 것을 알 수 있었다. 성장하는 난자에서 특이적으로 발현하는 GDF-9 역시 이와 같은 양상이었고 반면에, 생식세포 특이적 발현으로 원시난포의 난자에서 발현하고 있던 c-kit 유전자 발현은 유의적 차이가 없었다.

Anti-Müllerian hormone은 Müllerian inhibiting substance (MIS)로도 불리는 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family로서 난포발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>14</sup> AMH가 결여된 생쥐에서 원시난포의 초기성장개시가 억제되었고 이들에 FSH를 투여하였을 때 정상 생쥐보다 FSH에 민감하게 반응하여 많은 수의 난포들이 배란하는 단계에 이르렀

다.<sup>15,16</sup> 이를 통해 AMH는 생쥐의 원시난포가 선택되거나 (primordial follicle selection), 또는 성장하는 난포 (growing follicle)의 cyclic recruitment에 관여함을 알 수 있다. 이들 그룹의 생쥐를 통한 연구에서 AMH는 원시난포의 성장개시를 억제하는 feedback signal로 작용하였는데, 이처럼 원시난포의 recruitment에 있어서 억제인자로 작용하는 것은 아마도 AMH가 원시난포의 pool의 사용을 효과적으로 조절하는 것으로 보여지고, 따라서 폐경기가 일어나는 시기를 결정하는데 관여할 것으로 보여진다.<sup>17,18</sup> 최근, 인간 난소의 체외배양 연구에서는 AMH를 첨가하였을 때 원시난포의 성장개시가 촉진되었고, 성장하는 작은 난포 (small growing follicle)의 survival factor로 작용하는 가능성이 제시되었다.<sup>10</sup>

Follicle stimulating hormone은 정상적인 난포발달에 필수적인 endocrine signal로서 과립세포에 존재하는 수용체 (FSH Receptor; FSHR)에 작용함으로써 역할을 하는데, FSHR가 결여된 암컷 생쥐는 antrum 이 형성되지 않은 초기난포에 머물러 있어서 불임이 된다고 보고되었다.<sup>19</sup> FSHR 유전자가 없음으로써 난자의 구조와 기능에 문제가 생기며, 난포의 intracellular communication이 파괴되는 결과를 보였다.<sup>12</sup> 특히나 이들 난포에서 보여지는 특징은 난자에서 분비되는 성장인자인 GDF-9이 결여된 생쥐 난소에서 관찰된 난자와 같은 양상을 보였다.<sup>20</sup> 이는, 난자와 과립세포간의 상호작용의 불균형이 가져온 결과로써, 이를 통해 FSHR의 결여와 난자 특이적인 유전자의 상관관계를 규명하는 일이 요구된다.

본 연구의 체외배양된 난포의 특징을 보면, 체내에서 발달한 난포에 비해 그 크기가 상당히 커져있는데, 난자의 크기는 현저히 증가하고 이를 둘러싸는 과립세포는 상대적으로 증식과 성장이 많이 저해되어 있음을 관찰하였다 (Figure 1 and 2). 이러한 현상은 GDF-9이 결여된 생쥐의 난포에서 보여지는 난자의 과대성장 (overgrowth)과 동일한 결과이다.<sup>20</sup> 성장인자가 없이 체외에서 배양된 난포는 난포발달에 불균형을 가져왔고, 난자에서 발현하는 초기난포발달에 필수적인 GDF-9 유전자를 체외발달 개시 시점인 출생 직후 난소에서의 발현양 이상으로 발현하지 못하였다 (Figure 4C). 특이적인 것은 본 연

구를 통해 GDF-9 유전자가 원시난포로만 이루어진 출생 직후의 생쥐 난소에서 높게 발현함을 RT-PCR로 확인하였고, 이들이 원시난포의 난자에서 발현함을 조직학적으로 확인하였다 (Figure 5). 지금까지 난자 특이적인 GDF-9 유전자가 원시난포에서 발현하는지의 여부에 대해 많은 상반된 보고들이 있다. In situ hybridization을 통한 조직학적 연구 결과를 보면, 생쥐에 있어서는 원시난포에서는 발현하지 않고 일차난포 이상의 난자에서 발현되며 소와 양에서는 원시난포에서 발현한다고 보고되었다.<sup>21,22</sup> 인간의 난소에서는 원시난포에서는 발현하지 않고 일차난포 이상에서 발현한다는 연구와 함께 정상인의 난소에 있는 원시난포에서는 발현하나 PCOS (polycystic ovary syndrome) 환자의 원시난포에서는 발현하지 않는다는 상반된 연구가 보고되었다.<sup>23,24</sup> 본 연구 결과로 미루어 보면 생쥐의 경우, 동일한 원시난포의 형태를 가지고 있지만 성장을 시작하지 않은 원시난포에서는 발현하지 않으나 이미 성장을 시작하여 난자의 크기가 커진 원시난포의 경우 GDF-9이 발현하는 것으로 보여진다 (Figure 5). 본 연구에 사용된 출생 직후의 난소에서는 일차난포가 존재하지 않았지만 이러한 가능성을 배제하기 위하여 출생 전의 임신 19일자의 생쥐에서 난소를 얻어 GDF-9 발현을 보았을 때도 출생 직후의 난소와 비슷한 발현양을 보임을 본 연구진이 보고한 바 있다.<sup>25</sup>

GDF-9과는 달리, 생식세포 특이적인 c-kit 유전자 발현은 체내발달된 난소와 체외배양된 난소에서 그 발현양에 차이가 없었다. 난자 성숙과 험막세포 (theca cells)의 분화를 조절하며 난자에서 발현하는 난포발달 인자로 알려져 있는 c-kit은 FSHR가 결여되었을 때 단백질 발현이 억제되었다고 보고되었으나 이들의 mRNA 발현에 대해서는 연구되지 않았다.<sup>11,12</sup> 본 연구의 체외배양된 초기난포발달에서 c-kit 유전자 발현에 차이가 없었던 것은 아마도, 이미 원시난포에서 이들의 유전자가 발현하고 있기 때문에 체외배양 조건에서 더 많은 양을 만들 필요성이 없으며 오히려 이들의 유전자 발현양은 난포가 성숙함에 따라 줄어드는 경향을 보이기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구는 원시난포로만 이루어진 생쥐 난소를



체외배양하면서 일차난포와 이차난포로의 초기발달을 조절하는 여러 유전자의 발현 양상을 체내발달한 난소와 비교한 최초의 보고이다. 이를 통해서, 여러 난포발달 유전자 중에서도 성장하는 난포에서 특이적으로 발현하는 AMH와 FSHR와 같은 과립세포 인자의 발현양이 체외배양시 정상적인 난포발달 여부를 대변해 주는 중요한 지표가 될 수 있음을 보여주었다. FSHR의 경우 흰쥐의 난소를 배양하면서 nerve growth factor (NGF)를 첨가하였을 때 FSHR 유전자 발현을 증가시켰다고 보고된 바 있으나 아직도 초기난포발달의 조절인자에 대해서는 연구가 미흡하다.<sup>26</sup>

결론적으로, 난소의 체외배양 동안 AMH와 FSHR의 발현을 측정함으로써 난소내 난포의 초기발달이 정상적으로 진행되고 있는지의 여부를 간접적으로 보여줄 수 있으며, AMH나 FSHR의 유전자 발현을 정상적으로 유도할 수 있는 최적의 배양 조건을 찾아내는 일이 중요한 다음 연구단계가 될 것이다. 본 연구진은 체외에서 이들 유전자의 발현을 촉진하여 체내에서 발달된 난포와 동일한 수준으로 분비할 수 있는 배양 방법을 발달시킴으로써 초기난포발달의 조절기작을 밝히는데 기여할 것으로 기대한다.

## 참 고 문 헌

- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
- Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 1999; 140: 4262-71.
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000; 141: 3814-20.
- Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175: 123-30.
- Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2078-86.
- Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188: 65-73.
- Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 192: 37-43.
- Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SH, Shimasaki S, Lee S, Lee KA. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 159-63.
- Durlinger AL, Grijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076-84.
- Schmidt KL, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen CY. Anti-Mullerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234: 87-93.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 2000; 5: 143-52.
- Yang Y, Balla A, Danilovich N, Sairam MR. Developmental and molecular aberrations associated with deterioration of oogenesis during complete or partial follicle-stimulating hormone receptor deficiency in mice. *Biol Reprod* 2003; 69: 1294-302.
- McGrath SA, Esqueda AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 131-6.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal

- development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995; 136: 4951-62.
15. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5789-96.
  16. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 4891-9.
  17. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076-84.
  18. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 77-83.
  19. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13612-7.
  20. Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1018-34.
  21. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531-5.
  22. Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 1999; 60: 381-6.
  23. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2744-50.
  24. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1337-44.
  25. Yoon SJ, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. Expression of growth differentiation factor-9 in the mouse ovaries at different developmental stages. *Dev Reprod* 1999; 3: 95-100.
  26. Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1485-94.