

돼지 황체에서 황체용해와 대식세포와의 관계

김원식* · 한승로* · 손성경** · 박창식*** · 양윤석****

충남대학교 의과대학 해부학교실*, 산부인과학교실**

충남대학교 형질전환복제돼지연구센터***, 을지대학교 의과대학 산부인과학교실****

A Morphological Study on the Macrophages During Luteolysis in the Pig

W. S. Kim*, S. R. Han*, S. K. Son**, C. S. Park*** and Y. S. Yang****

Department of Anatomy*, Obstetrics & Gynecology**,

and Division of Animal Science & Resources, Research Center for Transgenic Cloned Pigs***,

Chungnam National University, Department of Obstetrics & Gynecology, Eulji Medical University****

ABSTRACT

In addition to the removal of dying or dead lutein cells by phagocytosis in many species, macrophages exert both luteotropic effect during maturation period and luteolytic effect during degenerative period via mediating autocrine/paracrine actions of self-producing cytokines in the corpus luteum. In this experiment, immunohistochemical and transmission electron microscopic (TEM) studies were performed to observe the morphologic changes of luteal macrophages during luteolysis.

A small number of macrophages and low immunoreactivity were present at the mature stage. The number of macrophages and immunoreactivity gradually increased along the advance of luteolysis. Two subtypes of macrophages could be observed through TEM observation. One type of macrophage located between the large lutein cells contained no lipid droplets in their cytoplasm at mature stage. The other type of macrophage located near the blood vessels contained many lipid droplets in their cytoplasm during luteolysis. Particularly, no phagocytic macrophages were observed, which suggested the macrophages in the porcine corpus luteum did not involve in the phagocytotic elimination of dying lutein cells.

(**Key words** : Corpus luteum, Luteolysis, Macrophage, Immunohistochemistry, TEM)

I. 서 론

일반적으로 황체용해는 최초 프로게스테론 분비 감소인 기능적 황체용해와 샘세포구조의 변화로 점진적인 퇴축을 통해 결합조직으로 이루어진 작은 상흔인 백색체를 형성하는 구조적 또는 형태학적 황체용해로 정의하지만(McCracken 등, 1999), 아직 기능적 황체퇴화와 구조적 황

체퇴화간의 구별이 명확하지 않은 실정이다. 황체용해는 동물의 번식효율을 높이기 위한 기전으로 생각되며, 규칙적인 생식주기를 갖는 대부분의 포유동물에서 배란 후 임신하지 않은 암컷은 난소에서 새로운 난소주기를 개시하기 위해 황체를 제거하여 비교적 짧은 사이기 후에 임신할 수 있는 기회를 얻게 되고, 임신한 암컷은 태반이 그 기능을 대신할 수 있게 되

Corresponding author : W. S. Kim, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-131, Korea.
Tel : 042-580-8202, E-mail : wonsikk@cnu.ac.kr

면 용해의 과정을 거친다(McCracken 등, 1999; Niswender 등, 2000).

대부분의 비영장류 포유동물 중에서 정상적인 황체용해는 자궁으로부터 분비되는 PGF₂α에 의해 개시된다(Hansel 등, 1973; McCracken 등, 1970). PGF₂α는 황체 내피세포의 변성을 일으켜(O'Shea 등, 1977; Sawyer 등, 1990) 모세혈관 밀도를 크게 감소시키므로써(Azmi and O'Shea, 1984; Braden 등, 1988; Nett 등, 1976) 황체 실질로 가는 혈류가 감소되고 그로 인해 샘의 영양결핍, 스테로이드 생성에 필요한 기질의 결핍 및 황체발달에 필요한 지지의 결핍 등을 초래하여 황체용해를 일으키거나(Phariss 등, 1970), 황체를 형성하고 있는 세포들의 아포토시스를 촉진하여 (Sawyer 등, 1990) 황체용해를 일으키는 것으로 알려져 있다.

이러한 기전에 의해 개시되는 황체용해는 그 과정에서 면역계통이 결정적인 역할을 한다는 증거가 많으며 이에 관한 다수의 연구가 행해져 오고 있다. 그 중 황체용해에 깊은 관련이 있는 것으로 밝혀진 대식세포는 PGF₂α 유도 황체용해중 프로게스테론 분비의 감소 전에 돼지황체의 실질과 혈관에 침투하고(Hehnke 등, 1994), 황체퇴화중에는 일차적으로 변성된 황체세포의 포식(Adams and Hertig, 1969; Bulmer, 1964; Paavola, 1979; Pepperell 등, 1991)과 세포밖기질을 용해하며(Parker, 1991; Tscheshe 등, 1986), 황체세포에서 PGF₂α의 생산을 자극하고(Nothnick and Pate, 1990; Fairchild-Benyo and Pate, 1992), 기초 프로게스테론 분비를 억제하는 작용(Fairchild-Benyo and Pate, 1992)을 갖는데, 이는 대식세포로부터 분비되는 TNF-α과 IL-1 등의 사이토카인(cytokines)들에 의한 것으로(Fairchild-Benyo and Pate, 1992; Nothnick and Pate, 1990; Shakil and Whitehead, 1994) 알려져 있다.

이와같이 대식세포는 자신이 분비하는 사이토카인을 통해, 난포에서는 난포세포의 성장과 증식에 관여하기도 하고 (Fukumatsu 등, 1992; Bukovsky 등, 1995) 동시에 난포세포의 아포토시스를 통한 난포폐쇄에 관여하기도 하며(Kaipia and Hsueh, 1997; Asselin 등, 2000; 박창식 등, 2004), 황체에서는 황체형성기에는 황체형성세

포들의 증식과 성장에 관여하고(Brannstrom and Norman, 1993) 황체용해시기에는 황체세포들의 아포토시스와 그들의 제거에 직간접적으로 관여하는 등(Bagavandoss 등, 1988; Bagavandoss 등, 1990; Roby 등, 1993; Paavola, 1977) 그 기능적 역동성이 매우 크고 또한 형태적 다양성도 큰 세포(Dijkstra 등, 1985; Kraal 등, 1988)로 알려져 있다.

그로인해 지금까지 많은 연구가 행해져 왔음에도 불구하고, 아직까지 각종 동물에서 황체의 발달시기에 따른 대식세포의 역할 및 작용기전 등이 확실하게 밝혀지지 않아, 저자들은 돼지황체에서 성숙황체시기와 황체용해시기에 일어나는 형태학적 변화를 면역조직화학적 및 투과전자현미경적 방법으로 관찰하여 의미있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 생후 8~10개월의 가임기 암컷 돼지(Yorkshire-breed swine)로서, 충남대학교 형질전환복제돼지연구센터에서 실험에 사용하는 정상적인 비임신 돼지 20마리와 임신돼지 10마리의 난소를 직접 공급받아 사용하였다. 적출한 난소는 황체를 포함하는 적당한 크기로 절단하여 H & E(hematoxylin and eosin) 염색과 면역조직화학적 연구를 위하여 10% 중성포르말린용액(buffered neutral formalin sol.)에 24시간 고정하였고, 일부는 투과전자현미경 표본제작을 위해 5 mm × 5 mm 크기로 절단한 후 2.5% glutaraldehyde 용액에 전고정하였다.

2. Hematoxylin-Eosin 염색

돼지 난소의 일반적인 조직학적 구조를 알아보기 위해 이미 고정되어 있는 조직을 파라핀(paraffin) 포매하고 5 μm 두께로 박절한 후 일반적으로 행하는 H & E 염색 방법에 따라 조직 표본을 제작하였으며, 광학현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

3. 면역조직화학적 방법

10% 중성포르말린용액에 24시간 고정된 조직을 통상적인 방법으로 파라핀 포매하고 5 μm 두께로 박절한 조직절편을 만들었다. 이를 silanized coating slide (DAKO Corporation, USA) 위에 부착시키고, 이후 xylene으로 탈파라핀 처리, 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올의 순서로 함수단계를 거친 후, PBS (phosphate buffered saline solution, pH 7.6)로 두 차례 세척하고, 3% 과산화수소 (DAKO Corporation, USA)를 20분 동안 endogenous peroxidase block 처리한 후 다시 PBS로 세 차례 세척하였다. 다시 이 절편을 0.01M sodium citrate buffer (pH 6.0)에 10분간 전자렌지에 끓이고 30분간 식혔다.

절편을 1차 항체 MAC 387 (NeoMakers corporation, USA)로 1시간 동안 처리하였다. PBS로 3분 3회 세척후 biotinylated Link (DAKO Corporation, USA)에 10분간 처리하고, PBS로 3분 3회 세척 후 다시 Streptavidin-HRP (DAKO Corporation, USA)로 10분간 처리하였다. 그리고 PBS로 3분 3회 세척후 DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO Corporation, USA)를 이용하여 발색시킨 후, 절편을 세척하고 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경(Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

4. 투과전자현미경적 방법

투과전자현미경적 관찰을 위하여 이미 전고정한 조직을 1 mm^2 의 크기로 세절하고, 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)에 세척한 후 0.1M phosphate buffer saline으로 2% osmium tetroxide 용액(pH 7.4)을 만들어 4°C에서 1시간 동안 진탕하면서 후고정하였다. 고정된 조직은 4°C의 50%, 70%, 80%, 90%, 95% ethanol, 실온의 100% ethanol을 이용하여 점진적으로 탈수하고 propylene oxide로 치환시켰다. 포매는 epon 812혼합액을 사용하였고 경화제로는 dodecynyl succinic anhydride (DDSA)와 methyl nadic anhydride(MNA)를 사용하였는데 이때 가속제로서는 2,4,6-dimethylamino-methyl phenol(DMP-30)을 사용하였다. 포매조작

은 탈수와 치환이 끝난 후 propylene oxide와 epon 혼합액의 비가 1:1, 1:2, 그리고 순수 epon 혼합액에 각각 단계적으로 침투시켰다. 이와 같은 조작이 끝난 후 시료를 epon 혼합액에 포매하고 항온기에 넣어 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간 그리고 60°C에서 48시간 동안 중합시켰다.

초박절편기(Sorvall ultramicrotome)를 사용하여 1 μm 의 준초박절편(semithin section)을 제작한 후 toluidine blue 염색을 하여 광학현미경으로 확인한 다음, 적당한 부위를 택하여 60~80 nm 두께의 초박절편(ultrathin section)을 만들고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경(Hitachi H600, Japan)으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

황체용해는 일부 동물 종에서 번식효율을 높이기 위한 기전이다. 규칙적인 생식주기를 갖는 대부분의 포유동물에서 배란 후 임신하지 않은 암컷은 난소에서 새로운 난소주기를 개시하기 위해 황체를 제거하므로써 비교적 짧은 사이기 후에 임신할 수 있는 기회를 얻게 되고 (McCracken 등, 1999; Niswender 등, 2000), 임신한 동물들은 태반이 그 기능을 대신할 때까지 기능상태를 유지하다가 그 이후에 황체를 제거한다. 황체는 배란후 난포로부터 유래한 세포들로 형성된 일시적 내분비성 난소기관으로, 프로게스테론(progesterone) 생산을 통해 임신의 수립과 유지에 기여하다가 (Niswender and Nett, 1994) 기능을 다한 후에는 신속한 용해/퇴화를 일으켜 발정주기를 회복시키고 새로운 배란난포의 발육을 허용하고 반복되는 수정의 기회를 제공하는 기관이다 (Pate, 1994).

황체용해는 두 단계의 과정을 거치는데 첫째는 기능적 황체용해로 프로게스테론의 감소가 특징적이고 둘째는 구조적 황체용해로 난포내에서 황체구성 조직이 제거되는 과정인데, 이 두과정은 동시에 일어나지 않고 전자가 선행된다는 보고(McCracken 등, 1999; McGuire 등, 1994; Pate, 1994)와 후자가 선행된다는 보고 등

(Stouffer and Brannian, 1993) 아직 의견이 일치되지 않은 실정이다. 대부분의 영장류 이하의 포유동물에서 황체용해는 자궁으로부터 분비되는 PGF₂α에 의해 개시되지만(Hansel 등, 1973; McCracken 등, 1970), 황체용해의 완성에는 부가적인 기전이 필요하며(Pate, 1994), 여기에 면역계가 속한다(Pate, 1994; Duncan 등, 1998; Siiteri and Stites, 1982; Grossman, 1984; Kelly, 1994; Brannstrom and Norman, 1993)는 것이 최근까지의 지견이다. 이에 따라 황체내 대표적인 면역세포인 대식세포와 황체용해와의 관계를 규명하기 위한 연구들이 다수 행해져 오고 있으나, 아직까지 구조적 황체용해의 전 과정이 확실하게 밝혀져 있지 않고(Morales 등, 2000) 또한 황체용해의 과정이 생식주기를 달리하는 각종 동물간에 차이가 있어 논란의 여지가 남아있는 상태이다.

일반적으로 황체는 최대황체 시기가 지나면 용해의 과정을 거치면서 사라진다. 돼지에서 황체용해는 배란후 13일에 개시되기 시작하여 15일서 18일 사이에 약한 자색에서 황색을 거쳐 백색 크림모양으로 바뀌며 이후 크기가 신속하게 감소하기 시작하여 약 3주에 걸친 제거과정을 통해 완전히 퇴화되는 것으로 알려져 있다(Bacci 등, 1996). 대부분의 비영장류에서 황체용해를 개시하는 것으로 알려진 PGF₂α는 자궁으로부터 분비되고 (Hansel 등, 1973; McCracken 등, 1970), 이는 우선적으로 황체 모세혈관을 구성하고 있는 내피세포들에 아포토시스를 일으켜 (Bacci 등, 1996) 황체로 가는 혈류를 감소시킴으로써 샘의 영양결핍, 스테로이드 생성에 필요한 기질의 결핍 및 황체발달에 필요한 지지를 결핍시켜 황체용해를 일으키는 것 (Phariss 등, 1970)으로 알려져 있다. 본 실험에서도 각 시기의 황체를 H & E로 염색하여 일반적인 특징을 살펴본 바, 비임신기와 임신기 모두에서 성숙황체는 난원형의 큰황체세포들이 최대로 성숙하여 규칙적인 배열을 보이고 있었으나(Fig. 1a) 황체용해가 개시되면 큰황체세포들의 규칙적인 배열이 깨지고 형태도 일그러지고 다수의 농축핵들이 관찰되었고(Fig. 1b) 투과전자현미경 관찰에서도 큰황체세포들의 일부가 막성 구조물의 소

체를 형성하면서 세포체로부터 떨어져 나가는 것이 관찰되어(Fig. 8) 아포토시스가 황체구성세포들의 사멸기전으로 작용함을 알 수 있었다. 이후 용해황체는 용해단계에 따라 현저한 형태학적 차이를 보이면서, 기본적으로는 큰황체세포들의 소멸과 함께 아교섬유다발이 풍부한 균질의 기질로 채워진 구조로 바뀌면서(Fig. 1c)

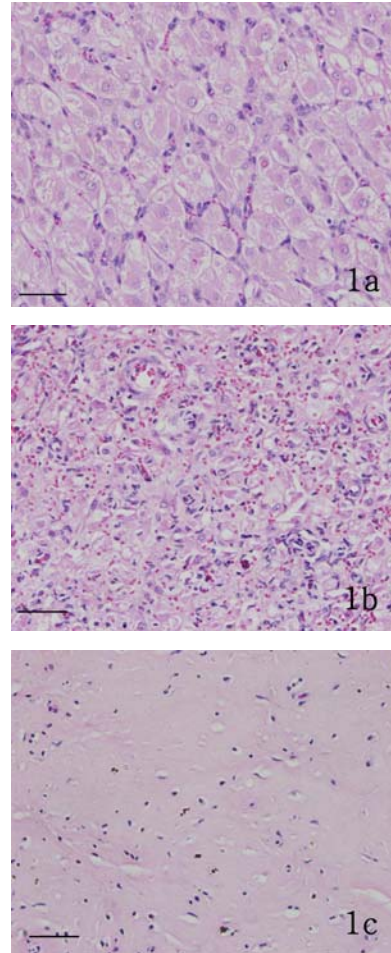


Fig. 1. Porcine corpus luteum. H & E, scale bar = 50 μ m. 1a. Mature stage; large, regularly arranged great luteins cells were observed. 1b. Lytic stage; irregularly arranged lutein cells and many pyknotic bodies were observed. 1c. Advanced lytic stage; homogenous matrix substance containing collagenous fiber bundles were observed.

백색체에서 기질로 이행되는 것이 관찰되었다. 이러한 황체의 소멸과 관련하여 아포토시스가 가능한 기전으로 주목을 받게 된 것은 이 유형의 세포사망이 비기능성 황체조직들의 주기적 제거에서 시간-계획적 기전으로 받아들여졌기 때문이라고도 하지만(Rodger 등, 1995; Funayama 등, 1996; Shikone 등, 1996; Yuan and Giudice, 1997), 아포토시스가 황체구성세포들의 사망기전은 될 수 있으나 그것들의 제거기전으로는 설명하기 어렵다. 특히 황체용해가 일어나는 것은 새로운 생식주기를 시작하고 임신을 가능케 하기 위함이기 때문에 황체용해는 가급적 빨리 일어나야 할 것이기 때문에, 아포토시스 소체들의 제거방법은 달리 설명되어야 할 것이다. 그러나 아직까지 구조적 황체용해 중 황체조직이 사라지는 기전들은 확실하게 알려져 있지 않다.

한편, 황체내에서 황체용해를 매개, 조절하는 cytokines을 분비하는 세포로 알려진 대식세포를 확인하기 위하여 MAC 387 항체로 면역염색을 실시한 바, 비임신기와 임신기 성숙황체에서는 면역반응성이 약한 대식세포가 매우 적은 수로 관찰되었으며(Fig. 2a), 용해황체에서는 그 수가 증가하고 면역반응성도 중등도로 증가되고(Fig. 2b), 황체용해의 최종단계에 이르면 대식세포들이 무리를 지어 나타나고 면역반응성은 더욱 증가됨이 관찰되었다(Fig. 2c). 이같은 변화는, 대식세포는 황체용해시 나타나는 일차적 면역세포(Standaert 등, 1991)라는 보고, 토끼, 흰쥐, 돼지 및 사람 등 대부분의 동물 중에서 황체용해시 그 수가 증가하지만(Brannstrom and Norman, 1993; Brannstrom 등, 1994), 토끼에서는 대식세포가 황체용해 개시 전에 증가하고(Bagavandoss 등, 1988; Bagavandoss 등, 1990), 마우스(Hume 등, 1984)와 기니픽(Paavola, 1977)에서는 퇴화중일 때 대식세포가 침투해 들어간다는 보고들, 모든 시기의 퇴화황체에서 대량의 아포토시스 소체들과 그것을 포식하는 대식세포들이 대량 관찰된다는 보고들 (Brannstrom and Norman, 1993; Duncan 등, 1998; 김원식 등, 2005)과 일부는 일치하고 일부는 약간의 차이를 보였다. 특히 본 실험에서 용해황체에서 면

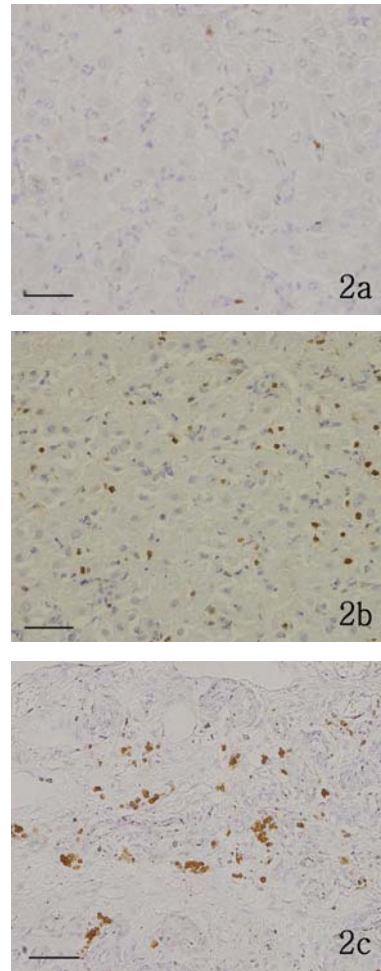


Fig. 2. MAC 387 immunohistochemistry of porcine corpus luteum. scale bar = 50 μ m. 2a. Mature stage; immunopositive macrophages showing low degree of immunoreactivity were rarely observed. 2b. Lytic stage; many immunopositive macrophages showing intermediate degree of immunoreactivity were observed. 2c. Advanced lytic stage; aggregated immunopositive macrophages showing high degree of immunoreactivity were observed.

역반응성이 증가된 대식세포를 투과전자현미경으로 관찰한 바, 세포질내에 다수의 지방방울을 가진 비포식성 대식세포들로(Fig. 5-7) 관찰되어, 돼지에서는 황체용해시 대식세포의 역할

이 다른 동물과는 차이가 있음을 의미한다고 생각된다. 즉, 흰쥐에서는 대식세포가 죽은 황체세포들의 제거에 참여하지만(Paavola, 1977; 김원식 등, 2005) 돼지의 용해황체에서는 포식 중인 대식세포가 관찰되지 않아, 죽은 황체세포들의 제거에는 직접 참여하지는 않고 황체용해중 구조적 황체용해작용인 황체세포들의 아포토시스를 촉진시키고(Paavola, 1977), 황체퇴화시 죽거나 또는 죽어가고 있는 세포들이 만드는 잠재적 염증상황의 조절, 죽지않은 세포들에 양육환경을 제공하여 황체덩이 감소에 따른 지속적인 조직재건 참여(Pate and Keyes, 2001), MMP(matrix metalloproteinase)효소 활성화 (Hurwitz 등, 1993; Hulboy 등, 1997)로 황체용해에 따른 형태재구축(Endo 등, 1993; Luck and Zhao, 1995) 등의 면역매개 이벤트들에만 관여하는 것으로 생각된다.

한편, 임신중이나 비임신기에 최대황체시기에서 대식세포의 수가 감소되고 면역반응성이 낮은 것은 성숙황체로부터 생산되는 프로게스테론의 백혈구억제작용(Siiteri and Stites, 1982; Grossman, 1984; Kelly, 1994)과 관련이 있는 것으로 보이고, 이 시기의 대식세포의 기능이 포식작용이 아니고 cytokines 분비를 통한 황체기능의 유지를 위한 것이기 때문으로 추정된다. 황체 대식세포들은 그 아형들로 부터 고농도의 생물활성 TNF- α 가 분비(Zhao 등, 1998) 되고, 이 물질이 황체의 형성에도 참여(Zolti 등, 1990; Roby and Terranova, 1989; Wang 등, 1992; Roby 등, 1993; Maylor 등, 1993; Chen 등, 1993; Miyamoto 등, 1993; Okuda 등, 1998; Yan 등, 1993)하여 황체를 최대기능황체로 성숙시키는 데에도 기여하고, 황체 퇴화시에는 황체용해물질로도 작용(Sakumoto and Okuda, 2004)하는 등 TNF- α 는 다른 인자들과 결합하여 황체발달 시기에 따라 두 가지 뚜렷하게 구별되는 역할을 수행한다. 따라서 돼지에서는 대식세포가 최대기능황체 시기에는 전자의 기능을, 황체용해시기에는 후자의 기능을 수행하는 것으로 추정된다.

저자들은 이와 관련하여 한 유형의 대식세포가 황체시기에 따라 서로 다른 작용을 하는 것

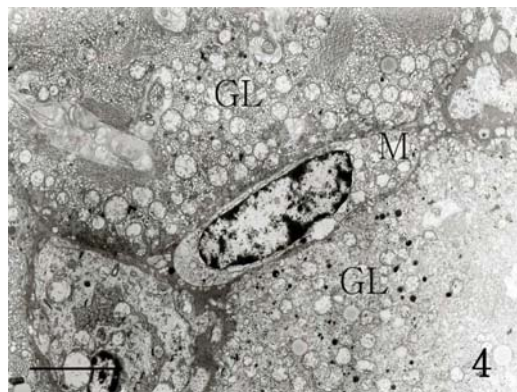
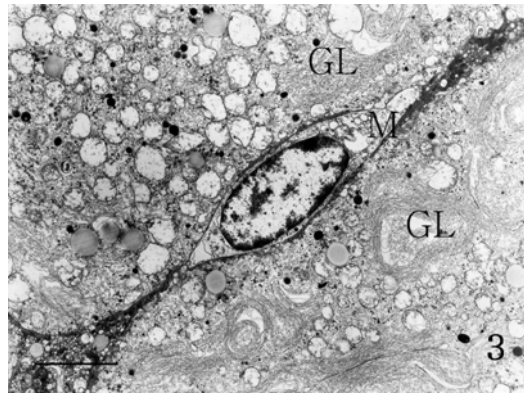


Fig. 3, 4. TEM micrographs of a macrophage of the porcine corpus luteum in the mature stage. scale bar = 5 μ m. In each micrograph, a non-phagocytic macrophage(M) located between the 2 adjacent great lutein cells(GL) was observed.

이 아니고 각기 다른 유형의 대식세포가 있을 것으로 추정하고 투과전자현미경 관찰을 실시하여 2가지 유형의 대식세포를 관찰할 수 있었는데, 하나는 최대황체시기에 큰황체세포들 사이에 나타나는 세포질내에 지방방울을 함유하고 있지 않은 비교적 작은 대식세포이고(Fig. 3, 4) 다른 하나는 황체용해시기에 혈관주위에 나타나는 세포질내에 지방방울을 다수 함유한 비교적 큰 대식세포였다(Fig. 5-7). 이는 최대황체시기에 프로게스테론에 의해 위축되었던 대식세포가 용해황체시기가 되면 활성화되는 것으로 추정할 수도 있으나, 그 보다는 황체용해가

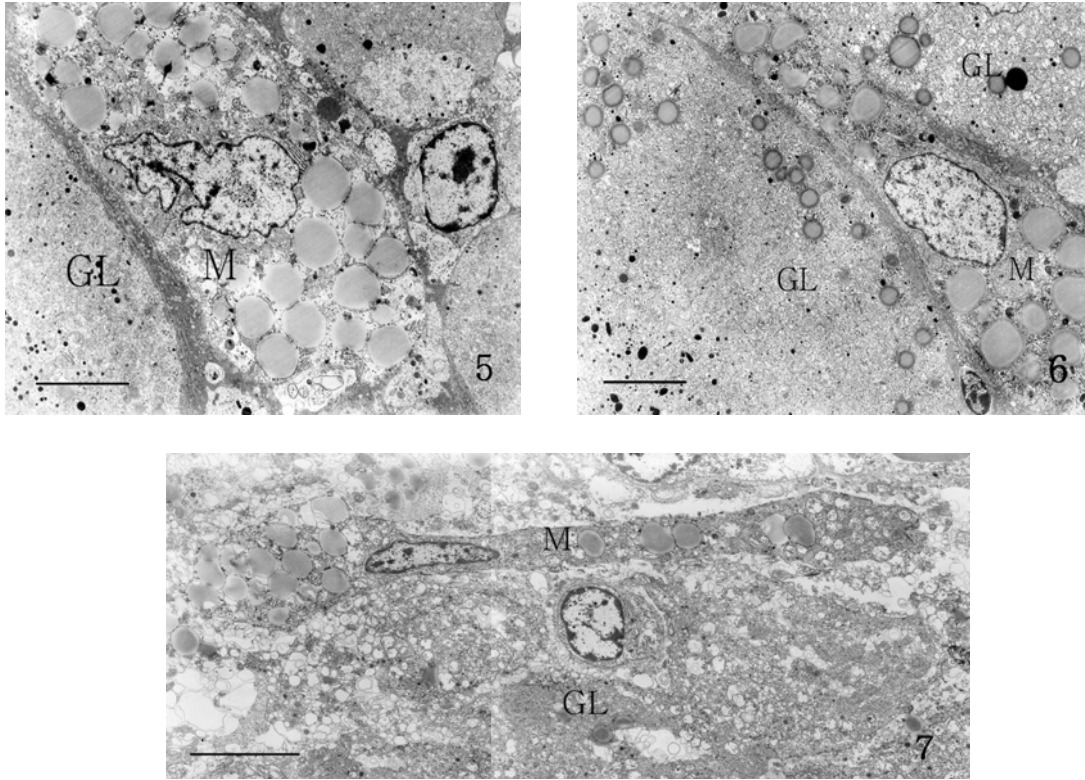


Fig. 5-7. TEM micrographs of a macrophage of the porcine corpus luteum in the lytic stage. scale bar = 5 μ m. Various shaped non-phagocytic macrophages(M) containing many lipid droplets in the cytoplasm located nearby capillary wall were observed.

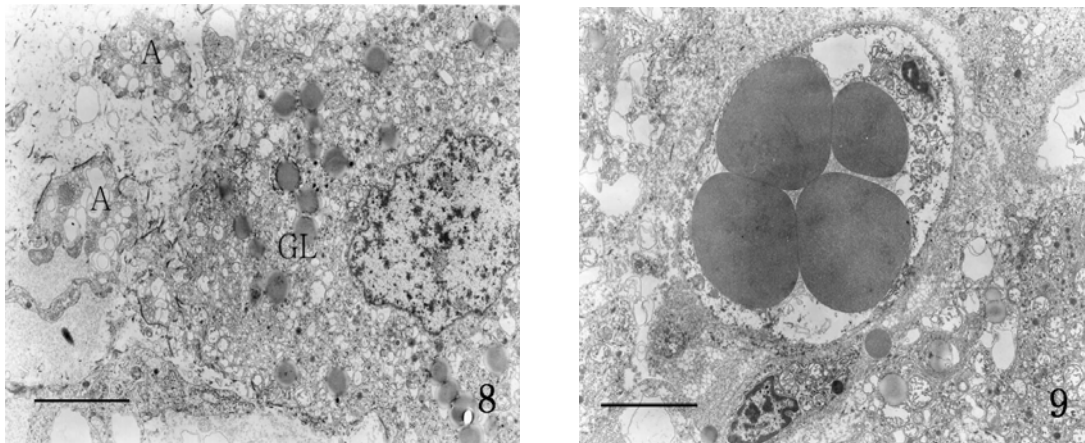


Fig. 8. TEM micrograph of an apoptotic great lutein cell(GL) in the lytic corpus luteum. scale bar = 5 μ m. Many apoptotic bodies (A) falled off from cell body and shrinkage of nuclear membrane were observed.

Fig. 9. TEM micrograph of a capillary in the lytic corpus luteum. scale bar = 5 μ m. Several RBCs and apoptotic bodies (A) were observed within the vascular lumen.

개시되면 혈류로부터 황체용해를 촉진하는데 참여하도록 교육된 대식세포들이 다수 조직내로 들어오는 것으로 생각된다. 이는, 대식세포는 그것들이 나타나는 시기, 위치나 형태에 따라 아형들이 다르고 그에 따른 기능도 다른 점(Dijkstra 등, 1985; Kraal 등, 1988)과 흰쥐 황체에서는 포식성 대식세포와 비포식성 대식세포가 출현한다는 보고(김원식 등, 2005)들을 고려할 때 상당한 의미가 있는 것으로 생각되나, 이에 관해서는 향후 좀 더 연구할 과제로 생각된다.

한편 본 실험에서는, 이제까지 황체용해가 진행되면서 큰 용적을 가진 아포토시스 소체들로 구성된 용해황체 내용물들의 제거방법에, 이제까지 보고된 아포토시스 소체들의 제거에 대식세포가 직접 관여한다는 보고들(Paavola, 1977; Brannstrom and Norman, 1993; Brannstrom 등, 1994; Hume 등, 1984; Duncan 등, 1998; 김원식 등, 2005)과는 다른 현상을 발견할 수 있었는데, 이는 투과전자현미경 관찰에서 포식성 대식세포가 발견되지 않은 점과 용해황체내 미세혈관내에 다량의 아포토시스 소체들이 관찰된 점이다(Fig. 9). 따라서 용해산물의 제거는 2가지 측면에서 그 기전을 추정할 수 있었다.

첫째는, 일반적으로 퇴화중인 황체세포들에서는 발생중인 조직(Clarke, 1990)에서 나타나는 세포질내 공포형성과 자가포식이 발견되며, 포식성용해소체의 증가도 나왔다는 보고(Sawyer, 1995), 과립세포에 상당하는 퇴화중인 황체내 세포들이 자가포식능력이 있다는 보고(Quatacker, 1971)들을 참고할 때, 황체세포들은 자가포식에 의해 사라지는 것이라고 추정할 수 있다. 둘째는, 아포토시스 소체들의 계속적 분해와 분해산물들의 혈관을 통한 배출을 생각할 수 있겠다. 이는 본 실험에서 황체내 모세혈관속에 다수의 큰황체세포 찌꺼기들을 관찰할 수 있었는데, 이것들이 PGF₂α에 의해 큰황체세포들보다 먼저 아포토시스를 일으킨 내피세포들의 잔해일 것이라는 보고도 있으나(Azmi and O'Shea, 1984) 매우 미세하게 나뉘어진 황체세포들로부터

더 유래한 아포토시스 소체들(Kerr 등, 1972)이 반복하여 쪼개진 산물들로 생각되었다. 이렇게 황체용해과정에서는 짧은 시간내에 죽은 세포들의 잔해를 제거하기 위해 자가소멸하는 혈관을 통해 용해산물들을 배출하는 것으로 생각되었다. 아울러 이 잔해들은 난소를 빠져나가기 전까지는 모두 용해되어 버리거나 아직 알려지지 않은 기능적 장벽에 의해 걸러지는 것으로 추정된다.

IV. 요약

황체내에서 대식세포는 자신이 분비하는 사이토카인을 통해 황체형성기에는 황체형성세포들의 증식과 성장에 관여하고 황체용해시기에는 황체세포들의 아포토시스와 그들의 제거에 직간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 돼지에서 최대성숙황체 시기와 황체의 용해에 따른 대식세포의 역할과 작용기전 등을 알아보기 위해 면역조직화학적 및 투과전자현미경적 방법으로 황체의 형태학적 변화를 관찰하였다. 그 결과 돼지에서는 황체용해시에 아포토시스 소체들을 포식하는 대식세포들이 관찰되지 않았고, 최대 황체시기와 황체용해시기에 대식세포들은 미세구조와 그것들이 위치하는 부위가 각기 다른 2가지 아형들이 관찰되었다. 이같은 결과로 볼 때, 돼지에서는 황체용해시 아포토시스 소체들이 대식세포의 포식작용에 의하지 않고 자체 혈관을 통해 제거되는 것으로 보이며, 황체에는 각 시기별로 각기 다른 임무를 띤 아형의 대식세포들이 혈류로부터 들어와 시기특이적으로 작용하는 것으로 추정된다.

V. 사사

“이 논문은 2004년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구”되었으며, 또한 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-00000-0)의 일부 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

VI. 인 용 문 헌

1. Adams, E. C. and Hertig, A. T. 1969. Studies on the corpus luteum. I. Observation on the ultrastructure of development and regression of the luteal cells during the menstrual cycle. *J. Cell Biol.* 41:696-715.
2. Asselin, E., Xiao, C. W., Wang, Y. F. and Tsang, B. K. 2000. Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis. *Biol. Signals Receipt.* 9:87-95.
3. Azmi, T. I. and O'Shea, J. D. 1984. Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum. *Lab. Invest.* 51:206-217.
4. Bacci, M. L., Barazzoni, A. M., Forni, M. and Lalatta Costerbosa, G. 1996. *In Situ* detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: Evidence of an early presence of DNA fragmentation. *Dom. Anim. Endocrinol.* 13(4):361-372.
5. Bagavandoss, P., Kunkel, S. L., Wiggins, R. C. and Keyes, P. L. 1988. Tumor necrosis factor- α production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology.* 122:1185-1187.
6. Bagavandoss, P., Wiggins, R. C., Kunkel, S. L., Remick, D. G. and Keyes, P. L. 1990. Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. *Biol. Reprod.* 42:367-376.
7. Braden, T. D., Gamboni, F. and Niswender, G. D. 1988. Effects of prostaglandin F $_{2\alpha}$ -induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 39:245-253.
8. Brannstrom, M. B. and Norman, R. J. 1993. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum. Reprod.* 8:1762-1775.
9. Brannstrom, M., Giesecke, L., Moore, I. C., Van Den Heuvel, C. J. and Robertson, S. A. 1994. Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 50:1161-1167.
10. Bukovsky, A., Caudle, M. R., Keenan, A., Wimalasena, J., Foster, J. S. and van Meter, S. E. 1995. Quantitative evaluation of the cell cycle-related retinoblastoma protein and localization of Thy-1 differentiation protein and macrophages during follicular development and atresia, and in human corpora lutea. *Biol. Reprod.* 52:776-792.
11. Bulmer, D. 1964. The histochemistry of ovarian macrophages in the rat. *J. Anat.* 98:313-319.
12. Chen, H., Marcinkiewicz, J. L., Sancho-Tello, M., Hunt, J. S. and Terranova, P. F. 1993. Tumor necrosis factor- α gene expression in mouse oocytes and follicular cells. *Biol. Reprod.* 48:707-714.
13. Clarke, P. G. H. 1990. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181:195-213.
14. Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Joling, P. and Kraal, G. 1985. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunol.* 54:589-599.
15. Duncan, W. C., Rodger, F. E. and Illingworth, P. J. 1998. The human corpus luteum : reduction in macrophages during simulated maternal recognition of pregnancy. *Hum. Reprod.* 13(9):2435-2442.
16. Endo, T., Aten, R. F., Wang, F. and Behrman, H. R. 1993. Coordinate induction and activation of metalloproteinase and ascorbate depletion in structural luteolysis. *Endocrinology.* 133:690-698.
17. Fairchild-Benyo, D. L. and Pate, J. L. 1992. Tumor necrosis factor α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology.* 130:854-860.
18. Fukumatsu, Y., Katabuchi, H., Naito, M., Takeya, M., Takahashi, K. and Okamura, H. 1992. Effect of macrophages on proliferation of granulosa cells in the ovary in rats. *J. Reprod. Fertil.* 96: 241-249.
19. Funayama, Y., Sasano, H. and Suzuki, T. 1996.

- Cell turnover in normal cycling human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:828-834.
20. Grossman, C. J. 1984. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Reviews.* 5: 435-455.
 21. Hansel, W., Concannon, P. W. and Lukaszewska, J. H. 1973. Corpora lutea of the large domestic ruminants. *Biol. Reprod.* 8:222-245.
 22. Hehnke, K. E., Christenson, L. K., Ford, S. P. and Taylor, M. 1994. Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F2 α induced luteolysis. *Biol. Reprod.* 50:10-15.
 23. Hulboy, D. L., Rudolph, L. A. and Matrisian, L. M. 1997. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 27-45.
 24. Hume, D. A., Halpin, D., Charlton, H. and Gordon, S. 1984. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:4174.
 25. Hurwitz, A., Dushnik, M. and Solomon, H. 1993. Cytokine-mediated regulation of rat ovarian function: interleukin-1 stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase. *Endocrinology.* 132:2709-2714.
 26. Kaipia, A. and Hsueh, A. J. 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 349-363.
 27. Kelly, R. W. 1994. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocrine Reviews.* 15:684-706.
 28. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. 1972. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 226:239-247.
 29. Kraal, G., Shiamatey-Koolma, R., Hoffer, M., Baker, D. and Scheper, R. 1988. Histochemical identification of guinea-pig macrophages by monoclonal antibody MR-1. *Immunology.* 65:523-528.
 30. Luck, M. R. and Zhao, Y. 1995. Structural remodelling of reproductive tissues. *J. Endocrinol.* 146:191-195.
 31. Maylor, M. S., Stamp, G. W. H., Foulkes, W. D., Eccles, D. and Balkwill, F. R. 1993. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. *J. Clin. Invest.* 91:2194-2206.
 32. McCracken, J. A., Glew, M. E. and Scaramuzzi, R. J. 1970. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F2 α . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30: 544-547.
 33. McCracken, J. A., Custer, E. E. and Lamsa, J. C. 1999. Luteolysis : A neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews.* 79(2):263-324.
 34. McGuire, W. J., Juengel, J. L. and Niswender, G. D. 1994. Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of Prostaglandin F2 α in the ovine corpus luteum *in vivo*. *Biol. Reprod.* 51:800-806.
 35. Miyamoto, A., Luetzow, V. H. and Schams, D. 1993. Acute action of prostaglandin F2 α , E2, and I2 in microdialyzed bovine corpus luteum *in vitro*. *Biol. Reprod.* 49:423-430.
 36. Morales, C., Garcia-Pardo, L., Reymundo, C., Bellido, C., Sanchez-Criado, J. E. and Gaytan, F. 2000. Different patterns of structural luteolysis in the human corpus luteum of menstruation. *Hum. Reprod.* 15(10):2119-2128.
 37. Nett, T. M., McClellan, M. C. and Niswender, G. D. 1976. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum : blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol. Reprod.* 15:66-78.
 38. Niswender, G. D. and Nett, T. M. 1994. Corpus luteum and its control in infraprimate species. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by E. Knobil and JD Neill. New York: Raven, vol. 1, pp., 781-816.
 39. Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K. and McIntosh, E. R. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews.* 80(1):1-29.
 40. Nothnick, W. B. and Pate, J. L. 1990. Interleukin-I

- is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 43:169-173.
41. Okuda, K., Uenoyama, Y., Lee, K. W., Sakumoto, R. and Skarzynski, D. J. 1998. Progesterone stimulation by prostaglandin F₂ α involves protein kinase C pathway in cultured bovine luteal cells. *J. Reprod. Dev.* 44:79-84.
 42. O'Shea, J. D., Nightingale, M. G. and Chamley, W. A. 1977. Changes in small blood vessels during cyclical regression in sheep. *Biol. Reprod.* 17:162-177.
 43. Paavola, L. G. 1977. The corpus luteum of the guinea pig. Fine structure at the time of maximum progesterone secretion and during regression. *Am. J. Anat.* 150:565-604.
 44. Paavola, L. G. 1979. The corpus luteum of the guinea pig. IV. Fine structure of macrophages during pregnancy and postpartum luteolysis and the phagocytosis of luteal cells. *Am. J. Anat.* 154:337-364.
 45. Parker, C. W. 1991. Neutrophil mechanisms. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:559-560.
 46. Pate, J. L. 1994. Cellular components involved in luteolysis. *J. Anim. Sci.* 72:1884-1890.
 47. Pate, J. L. and Keyes, P. L. 2001. Immune cells in the corpus luteum : friends or foes? *Reproduction.* 122:665-676.
 48. Pepperell, J. R., Wolcott, C. and Behrman, H. R. 1991. Effects of neutrophils in rat luteal cells. *Endocrinology.* 130:1001-1008.
 49. Phariss, B. B., Cornette, J. C. and Gutnecht, G. D. 1970. Vascular control of luteal steroidogenesis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 10:97-103.
 50. Quatacker, J. R. 1971. Formation of autophagic vacuoles during human corpus luteum involution. *Z. Zellforsch.* 122:479-487.
 51. Roby, K. F. and Terranova, P. F. 1989. Localization of tumor necrosis factor (TNF) in the rat and bovine ovary using immunohistochemistry and cell blot: evidence for granulosa production. In: Hirshfield AN (ed.), *Growth Factors and the Ovary.* New York, Plenum Publishing Corporation, pp. 273-278.
 52. Roby, K. F., Weed, J., Lyles, R. and Terranova, P. F. 1993. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor- α . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:1096-1102.
 53. Rodger, F. E., Fraser, H. M. and Duncan, W. C. 1995. Immunolocalization of bcl-2 in the human corpus luteum. *Mol. Hum. Reprod.* 1:1566-1570.
 54. Sakumoto, R. and Okuda, K. 2004. Possible actions of TNF- α in ovarian function. *J. Reprod. Dev.* 50:39-46.
 55. Sawyer, H. R., Niswender, K. D., Braden, T. D. and Niswender, G. D. 1990. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF₂ α . *Domest. Anim. Endocrinol.* 7:229-238.
 56. Sawyer, H. R. 1995. Structural and functional properties of the corpus luteum of pregnancy. In Scaranuzzi, R. J., Nancarrow, C. D. and Doberska, C.(eds), *Reproduction in Domestic Ruminants III.* *J. Reprod. Fertil. Dorset.* 97:110.
 57. Shakil, T. and Whitehead, S. A. 1994. Inhibitory action of peritoneal macrophages on progesterone secretion from co-cultured rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 50:1183-1189.
 58. Shikone, T., Yamoto, M. and Kokawa, K. 1996. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:2376-2380.
 59. Siiteri, P. K. and Stites, D. P. 1982. Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol. Reprod.* 26:1-14.
 60. Standaert, F. E., Zamora, C. S. and Chew, B. P. 1991. Quantitative and qualitative changes in blood leukocytes in the porcine ovary. *Am. J. Reprod. Immunol.* 25:163-168.
 61. Stouffer, R. L. and Brannian, J. D. 1993. The function and regulation of cell populations composing the corpus luteum of the ovarian cycle. In Adashi, E. Y. and Leung, P. C. K.(eds.), *The Ovary.* Raven Press, New York, pp. 245-249.
 62. Tscheshe, H., Fedrowitz, J., Michaelis, J. and

- Macartney, H. W. 1986. Matrix degrading proteinases from human granulocytes ; Type I, II, III collagenase, gelatinase and type IV collagenase. *Folia Histochem. Cytobiol.* 61:269-273.
63. Wang, L. J., Brannstrom, M., Robertson, S. A. and Norman, R. J. 1992. Tumor necrosis factor alpha in the human ovary: presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandin production. *Fertil. Steril.* 58:934-940.
64. Yan, Z., Hunter, V., Weed, J., Hutchison, S., Lyles, R. T. and Terranova, P. F. 1993. Tumor necrosis factor- α alters steroidogenesis and stimulates proliferation of human ovarian granulosa cells *in vitro*. *Fertil. Steril.* 53:332-338.
65. Yuan, W. and Giudice, L. C. 1997. Programmed cell death in human ovary is a function of a follicle and corpus luteum status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:3148-3155.
66. Zhao, Y., Burbach, J. A., Roby, K. F., Terranova, P. F. and Brannian, J. D. 1998. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor α in the porcine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 59:1385-1391.
67. Zolti, M., Meiom, R., Shemesh, M., Wollach, D., Mashiach, S., Shore, L. and Ben Rafael, Z. 1990. Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor- α . *FEBS Lett.* 261:253-255.
68. 김원식, 한승로, 조근자, 김수일, 박창식. 2005. 흰쥐난소에서 황체내 대식세포에 관한 형태학적 연구 : 면역조직화학적 및 투과전자현미경적 연구. *대한해부학회지.* 38(3):251-258.
69. 박창식, 한승로, 김수일, 조근자, 김원식. 2004. 돼지난소에서 난포폐쇄시 과립층세포의 아포토시스와 대식세포에 관한 형태학적 연구. *동물자원과학지.* 46(4):1-14.
- (접수일자 : 2006. 1. 3. / 채택일자 : 2006. 4. 12.)