

## Morphological Changes of Radiation-Induced Atretic Follicles in Mouse Ovary

Sung-In Kim<sup>1</sup>, O-Yu Kwon<sup>2</sup> and Kwan-Hee You<sup>3†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Science, Gimcheon College, Gimcheon 740-704, Korea.

<sup>2</sup>Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-747, Korea.

<sup>3</sup>School of Biosciences and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

This study was undertaken to investigate the morphological changes between normal and atretic follicle after gamma irradiation and treatment of follicle stimulating hormone (FSH). The ovaries of each group of treated immature mice were prepared the paraffin sections after 0, 6, 12, and 24 hours (hrs) of those treatment. Hematoxylin-eosin (HE) stain, reticulin stain, and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) immunohistochemical stain were performed on the each paraffin sections. As the results of HE staining, the condensed nuclei of oocytes were observed in the atretic primordial follicles, on the other hand the condensations of granulosa cell nuclei were prominent in the atretic primary, preantral, and antral follicles. Only the granulosa cells of atretic follicle were stained specifically with TUNEL staining but not stained in the theca cells, which suggested granulosa cells degenerated through apoptosis. In the reticulin staining, the basement membranes of atretic follicle which was stained weakly showed irregular structure and detachment from the follicles. The ratio of normal to atretic follicle in control and FSH treated group was about 33% but this ratio increased rapidly over 90% in the 6, 12, and 24 hrs group after the irradiation. It could be suggested that the gamma irradiation is the useful tool for the induction of follicle atresia and immunohistochemical staining methods are essential in the study of follicle atresia.

**Key Words:** Atretic follicles, FSH, Gamma irradiation, Morphological changes, Apoptosis

### 서 론

생쥐 및 흰쥐의 경우 1차 난포의 성장개시에는 gonadotropin이 과립세포를 평평한 형태에서 입방형으로 변화시키며, zona pellucida의 현저한 성장이 확인되는 2차 난포시기에는 FSH (follicle stimulating hormone)가 중요하게 작용한다. 성장을 시작한 난포는 극히 소수만이 배란에 이르고 나머지는 퇴화 또는 폐쇄 (atresia)라는 과정을 통해 소멸된다. 난포의 폐쇄가 생식생물학에 있어 중요한 현상이라는 사실은 인식되고 있으나 아직까지 난포의 폐쇄에 관한 정확한 기전은 완전히 밝혀져 있지 않은 상태이며 단지 난포퇴화는 난포성장과정 중 난포내 내분비 환경의 변화 등 다양한 원인에 의해 퇴화하여 소멸되는 과정으로 정의되고 있다.

지금까지 보고에서 폐쇄난포의 형태학적 특징은 과립세포층과 기저막의 분리 (Junquerita et al., 1989), 과립세포 핵의 응축 (Hay et al., 1976; Byskov, 1978; Hirshfield and Midgley, 1978), 과립세포에 3-hydroxysteroid dehydrogenase와 지질방울 (lipid droplet)의 증가 (Breitemecker et al., 1978), 과립세포의 감소 (McNatty et al., 1979a; McNatty et al., 1979b), 그리고 난모세포의 배포붕괴 등이다.

1990년대 초부터 생식세포의 소멸과정이 apoptosis 과정에서 나타나는 형태학적 특징과 일치한다 (Cohen, 1993; Schwartz and Osborne, 1993)는 보고가 많이 발표되고 있다. Apoptotic DNA 분절화를 통한 난포폐쇄 연구에서 닭의 폐쇄난포에서는 같은 크기 (4~6 mm)의 건강한 난포와 비교하여 DNA 분절화 양상이 증가하는 반면 건강한 난포의 과립세포와 험막세포에서는 발견되지 않는다 (Tilly et al., 1991). 형태학적으로 돼지난포에서 apoptotic DNA 분절화 현상은 폐쇄난포에서는 발견되나 정상난포에서는 발견되지 않으며 흰쥐에서도 유사한 현상이 보고되었다 (Palumbo and Yeh, 1994).

난포성장과 폐쇄기전에 관한 최근의 연구는 주로 관련물질을 생화학적으로 추출하고 그 물질의 작용기전을 연구하

\* 논문 접수: 2006년 3월 9일  
수정재접수: 2006년 4월 7일

† 교신저자: 유관희, (우) 305-764 대전광역시 유성구 궁동 220, 충남대학교 생명과학부 생물학과  
Tel: 042-821-5498, Fax: 042-822-9690  
e-mail: khyou@cnu.ac.kr

는 방법에 집중되어 폐쇄를 일으킨 난포의 형태학적 변화나 난포의 어떤 위치의 어떤 세포들에서부터 apoptosis가 일어나는지, 그리고 난소의 전반적인 형태학적 변화나 조직학적 특성에 대한 연구는 미진한 상태다. 따라서 본 연구는 미성숙 생쥐를 인위적으로 난포의 성장을 유도한 군과 난포폐쇄를 유도한 군으로 나누어 난포성장 및 폐쇄기전을 형태학적으로 규명하고자 조직학적으로 난포의 형태학적 변화를 관찰하고, TUNEL 방법을 이용하여 DNA 분절화 분석을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험군

본 실험에 사용할 실험동물은 3주령 ICR 계통 미성숙 생쥐를 사용하였으며 실험동물을 대조군, FSH 처리군, 방사선조사군으로 구분하였다. FSH 처리군은 10 i.u./생리식염수 (100 ml)에 녹인 재조합 FSH (Puregon, N. V. Organon)를 복강에 주사하였으며 대조군은 동일량의 생리식염수를 주사하였다. 방사선조사군은 한국 원자력연구소 (KAERI)에서 감마선 ( $^{60}\text{Co}$ , source strength: approximately 150 TBg, Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)을 LD<sub>25</sub> (6.42 Gy)의 조사량으로 1시간 동안 전신조사 하였다. 방사선조사와 FSH 주사 후 0시간 (주사 후 수초 후), 6시간, 12시간, 24시간 별로 구분하였으며 각군 당 5마리씩 사용하였다.

### 2. HE 염색

핵과 세포질을 조직학적으로 관찰하기 위해 파라핀포매 절편을 제작하여 xylene으로 파라핀을 제거하고, alcohol 탈수과정을 거쳐 xylene 성분을 제거한 다음 수돗물에서 10분 동안 수세하였다. Hematoxylin에서 5분 동안 핵을 염색한 후 흐르는 물에서 10분 동안 방치한 다음 eosin 염색액에서 2분 동안 세포질을 염색하였다. Alcohol 농도 상승순으로 탈수과정을 거친 뒤에 xylene으로 투명시킨 다음 canada balsam으로 봉입하였다.

### 3. Reticulin 염색

난소조직의 기저막을 구성하는 reticulin fiber를 관찰하기 위해 Gomori's ammoniacal silver stain을 시행하였다. 파라핀포매 과정을 거친 조직절편을 xylene으로 파라핀을 제거한 후 alcohol 과정을 거쳐 흐르는 물에 수세하였다. Ferric ammonium sulfate (2%) 용액으로 2분 동안 감작과정을 거쳐 증류수로 수세하였다. Ammoniacal silver 용액 (10% silver nitrate 용액 40 ml, 10% potassium hydroxide 용액 10 ml, ammonia water)으로 조직절편을 3분 동안 반응시킨 후 증류수로 헹구고 20% formalin 용액으로 3분 동안 환원시켰다. 환

원과정이 끝난 조직은 수돗물에 충분히 수세한 후 0.2% gold chloride에 10분 동안 조색시켜 수돗물에 수세 후 sodium thiosulfate (2%) 용액으로 1분 동안 반응하지 않은 금속이온을 제거시킨 다음 수돗물에서 10분 동안 수세하였다. Alcohol로 탈수하고 xylene으로 투명시킨 다음 canada balsam으로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

### 4. TUNEL 염색

난포에서 apoptosis를 확인하기 위해 TUNEL 방법을 이용하는 Apoptag *in situ* apoptosis detection kit (Oncor, Gaithersburg, Md., USA)를 사용하였다. 난소조직을 4% paraformaldehyde에 고정하여 paraffin을 침투시켜 6  $\mu\text{m}$  두께로 박절했다. 이를 xylene으로 paraffin을 제거하고 alcohol 과정을 거친 다음 수돗물에 수세하였다. 수세가 끝난 조직절편을 tris 완충액 (pH 7.6)으로 세척한 후 조직 내의 endogenous peroxidase를 불활성화시키기 위해 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 실온에서 30분 동안 처리하였다. 증류수에 수세한 후 tris 완충액이 담긴 3개의 용기에 각각 5 분씩 거쳤다. Apoptag kit에 포함되어 있는 equilibration 완충액으로 15분 동안 처리한 다음 TdT를 첨가하여 37°C에서 90분 동안 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위해 반응정지 완충액에 조직절편을 넣고 상온에서 30분 동안 처리한 후 tris 완충액으로 3회 세척하였다. Tris 완충액에서 꺼낸 조직절편을 anti-digoxigenin-peroxidase로 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, tris 완충액으로 세척하고 diaminobenzidine (0.1% in tris)과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.002%)가 혼합된 용액으로 1분 동안 발색시켜 증류수로 세척하였다. Methyl green (0.5%)으로 30분 동안 배경염색을 시행하고 buthanol, xylene 수세과정을 거쳐 canada balsam으로 봉입하였다.

## 결 과

### 1. HE 염색 현미경 관찰

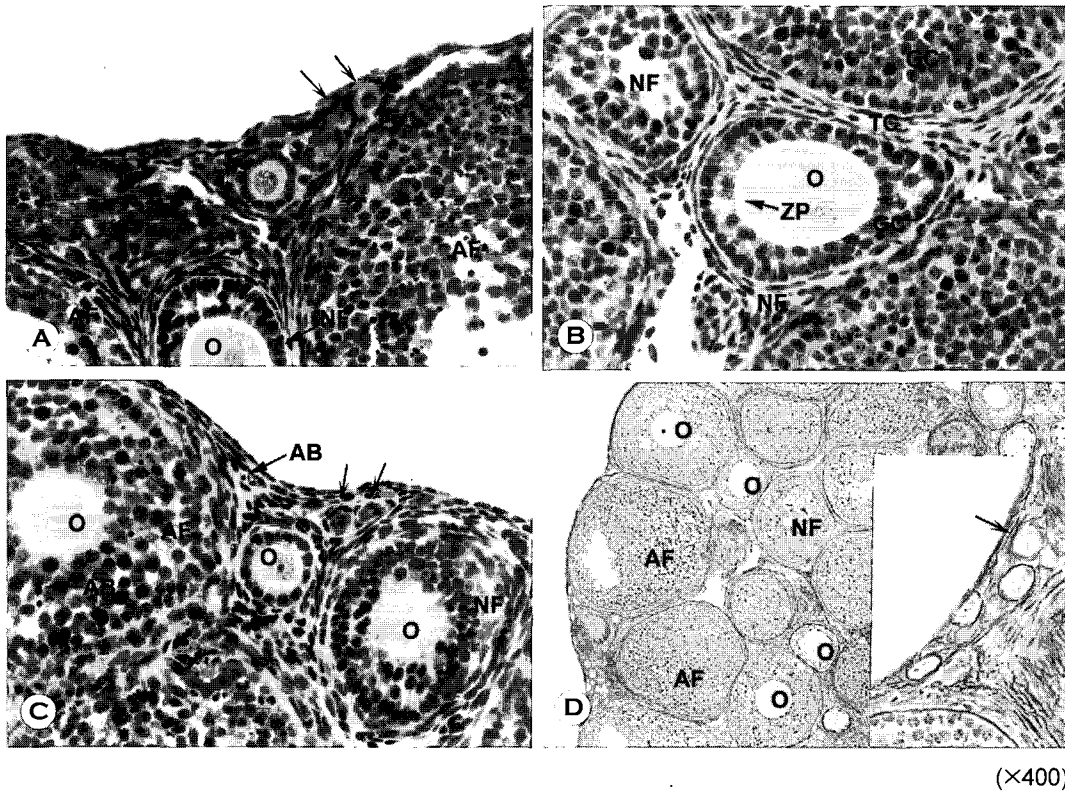
각 실험군의 난소를 HE 염색한 표본에서 난포의 성숙단계별 정상난포와 폐쇄난포의 형태학적 차이를 광학현미경으로 검경한 결과를 Table 1에 종합하여 정리하였다. 대조군 (Fig. 1A)에 비해 FSH 처리군 난소의 난포내 과립세포 (Fig. 1B)는 정상적인 형태를 보였으나, 방사선조사군에서 관찰되는 난포는 난자의 핵이나 과립세포가 농축핵 (pyknotic nuclei)이 되거나 분절되는 공통된 형태학적 특징을 나타냈다 (Fig. 1C) 대조군의 원시난포 난자 (Fig. 2A)는 정상적이고 비교적 염색 정도가 약하였으나, 방사선조사 6시간군에서 관찰되는 원시난포는 난자의 핵이 강하게 염색되는 핵농축현상이 관찰되고 (Fig. 2B), 방사선조사 12시간군에서는 난자의 핵뿐만 아니라 난자를 둘러싼 과립세포도 핵이 농축되거나 분절된 apoptosis 소체로 전환되어 세포배열이 붕괴된 양상이 관찰

**Table 1.** Criteria for the identification of normal and atretic follicles in mouse ovaries observed in this study

	Status of follicle*					
	Primordial		Primary		Preantral & Antral	
	Normal	Atretic	Normal	Atretic	Normal	Atretic
Basement membrane	clear regular	relatively thick, irregular, unclear	regular clear	unclear irregular	regular	irregular
GC**			none	apoptotic	none	apoptotic bodies
Oocyte	round clearly seen	absent or apoptotic	even	shrunk, fragmented, separated zona- GC connection	even	shrunk fragmented separated zona- GC connection
Theca	-	-	thin, even, one or more mitotic	hypertrophed	thin, even, one or more mitotic	hypertrophed

\*Microscopic observations was carried out at a magnification of  $\times 1,000$  in case of primordial and primary follicles, and at  $\times 400$  in case of preantral and antral follicles. By the above criteria, normal and atretic follicles were identified and counted. The numerical ratio of atretic follicles among total follicles was calculated. - mean there are no distinct characteristics in primordial follicles.

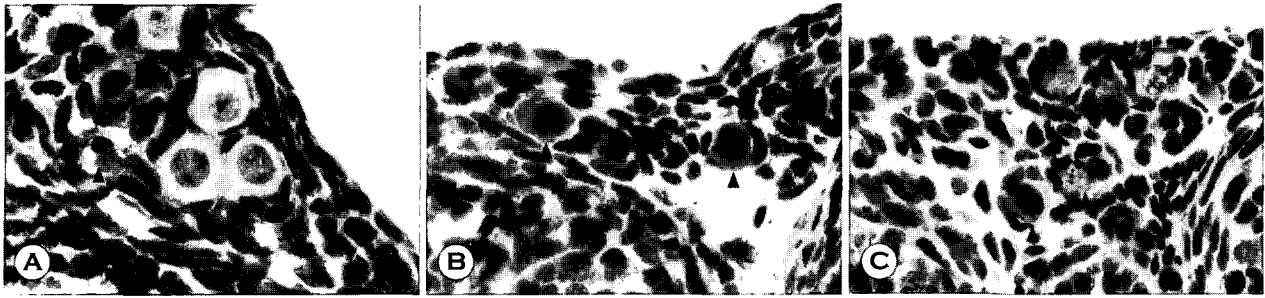
\*\*GC, granulosa cell



**Fig. 1.** Microphotographs of the mouse ovaries stained with hematoxylin and eosin (A, B, and C). The follicles were easily identified by the staining of reticulin (D). Original magnification of panel A, B, C, and D are  $\times 400$ . NF, normal follicles; AF, atretic follicles; GC, granulosa cells; O, oocytes; TC, theca cells; AB, apoptotic bodies; ZP, zona pellucida; arrows, atretic follicles.

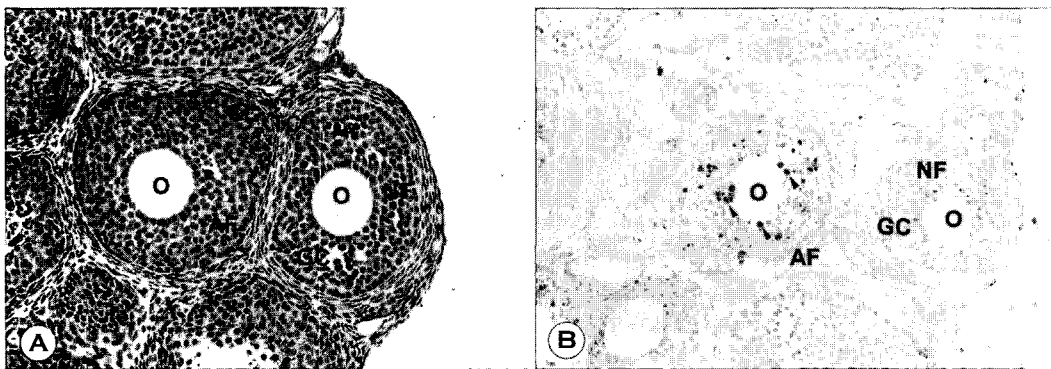
되었다 (Fig. 2C). 방사선조사를 받은 일차난포도 난자의 핵이 소실되고, 과립세포의 형태가 일정하지 않으며 비정상적인 형태를 나타냈다.

강소형성전 난포의 경우, 정상난포에서는 과립세포의 유사분열상이 다수 관찰되었으나, 폐쇄난포에서는 거의 관찰되지 않고 apoptosis 소체뿐만 아니라 세포부유물도 관찰되었다



(×1000)

**Fig. 2.** Microphotographs representing the ovarian follicles in mouse. Normal primordial follicles were observed in panel A. The atretic primordial follicles were identified by the heavy staining of nuclei in panel B. After the irradiation, atretic or apoptotic primordial follicular granulosa cells and oocytes were identified in panel C. Original magnifications of panel A, B, and C were ×1,000. Arrow heads, apoptotic bodies.



(×200)

**Fig. 3.** Microphotographs of the immature mouse ovarian preantral follicles. The normal and atretic follicles were identified by the staining with hematoxylin and eosin (A), and further identified by TUNEL immunohistochemistry (B). In normal follicles, mitotic cells were shown, and no apoptotic cells were observed in panel A. Apoptotic cells were stained as brown color in panel B. Original magnification: ×200. O, oocytes; AF, atretic follicles; NF, normal follicles; GC, granulosa cells; arrows, mitotic cells; arrow heads, apoptotic cells.

강소형성난포는 FSH 처리 12시간군의 경우 과립세포의 모양이 일정하고 난포내에 apoptosis를 진행하는 과립세포들이 관찰되지 않았고, 24시간군에서는 유사분열하는 과립세포들이 많이 증가되었다. 그러나 방사선조사를 받은 경우에는 세포부유물뿐만 아니라 apoptosis를 진행하는 과립세포들이 다수 관찰되었으며 이러한 apoptosis 소체들은 방사선조사 24시간군에서 더욱 증가되었다. 고배율로 관찰하면 세포부유물 및 apoptosis 진행세포를 탐식하는 대식세포 (macrophage)도 관찰할 수 있었다.

## 2. Reticulin 염색 현미경 관찰

Reticulin 염색으로 난포상태 및 구획을 HE 염색에서보다 더 분명하게 구분할 수 있었다. 특히 원시난포시기에 HE 염색으로는 구분하기 어려운 정상과 폐쇄난포를 난포를 둘러싸고 있는 기저막의 변화로 분명히 구분할 수 있었다 (Fig. 1D). Reticulin 염색에서 정상난포를 둘러싼 기저막은 분명하

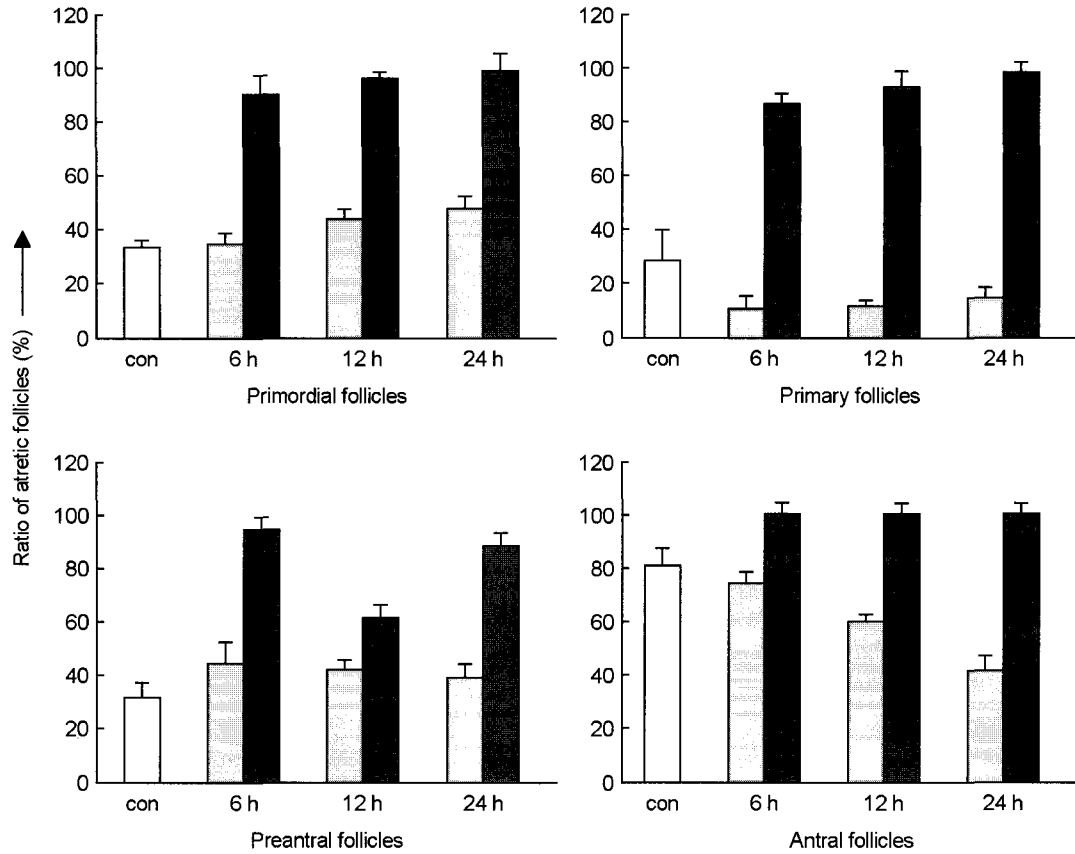
고 규칙적으로 배열되는 반면, 폐쇄 원시난포는 기저막이 난포에서 분리되어 불규칙하게 변형되는 특징을 나타냈다.

## 3. TUNEL 염색

DNA 분절화가 일어난 특정 세포의 위치를 알아보기 위해 시행한 TUNEL 염색은 폐쇄난포의 과립세포에 특이적으로 염색되어, 성장을 시작한 난포는 폐쇄과정이 시작되면 난포를 둘러싼 과립세포들이 apoptosis 과정을 통해 폐쇄되는 것으로 나타났다 (Fig. 3B). FSH 투여군의 TUNEL 염색성은 전반적으로 감소했으며, 방사선조사군의 과립세포에서 TUNEL 염색성은 6시간부터 시간이 경과할수록 점차 증가되었다. 그러나 난포를 둘러싼 헤파세포에서는 TUNEL 염색이 거의 되지 않았다.

## 4. 실험군별 폐쇄난포의 비율

실험군별 폐쇄난포의 비율을 측정하기 위해 가장 큰 절편



**Fig. 4.** The ratio of the atretic follicles to normal ovarian follicles in mouse ovaries. Atretic ratio was obtained by dividing of the number of the atretic follicles to that of normal ones in a largest cross section. The data are presented as mean  $\pm$  SEM. Hatched boxes indicate the FSH-treated groups, while as filled boxes show the gamma-irradiated groups. Control (con) groups represent the open boxes. 6 h, 12 h, and 24 h mean the time (hrs) after the treatment, respectively.

을 선택하여 광학현미경하에서 정상과 폐쇄난포의 수를 측정 후 그 비율을 구하였다 (Fig. 4). 정상적인 과립세포가 건강한 난자를 둘러싸고 있는 난포를 정상난포로, 난자의 모양이 주름이 잡혀있거나 농축핵을 한 개 이상을 가진 과립세포가 존재하거나 혹은 난자가 apoptosis를 진행하는 경우 이를 폐쇄난포로 판정하였다. 정상과 폐쇄난포의 비율은 대조군과 FSH 처리군에서는 약 33% 정도인데 비해 방사선조사군은 90% 이상으로 폐쇄난포의 비율이 급격히 증가하였다. 방사선조사에 대한 난포의 손상은 방사선조사 후 6시간에 충분한 손상의 결과가 나타나 시간이 더 경과해도 폐쇄난포의 특별한 형태학적 변화는 나타나지 않았다. 특히 감소형성난포는 FSH 처리군에서는 시간이 경과할수록 폐쇄난포의 비율이 유의하게 감소하였으나 방사선조사군에서는 6시간 이후에는 모든 감소형성난포들이 폐쇄되어 있었다.

## 고 찰

난포성장은 난자와 체세포 사이의 긴밀한 상호작용에 의

해 이루어지며, 난자와 체세포 중 어느 한쪽이라도 이상이 생기면 그 난포는 더 이상 성장하지 못하고 퇴화하게 된다. 포유류의 경우 생식시기 동안 난포의 99% 이상이 폐쇄라고 불리는 퇴화과정을 통해 죽어간다 (Byskov, 1974; Byskov, 1978; Byskov, 1979; Tsafiri and Braw, 1984). 난포폐쇄에 대한 연구는 과거에는 단순한 형태학적 분석과 호르몬 측정에 의해 이루어 졌으나 최근에는 apoptosis라는 개념을 난포폐쇄에 도입함으로써 그 원인을 밝히려는 연구가 많이 이루어지고 있다 (Tilly et al., 1991; Hughes and Gorospe, 1991; Palumbo and Yeh, 1994; Jolly et al., 1994).

FSH를 주사하여 난포의 성숙을 유발시킨 군과 이온화방사선을 전신에 조사하여 난포폐쇄를 유발시킨 군을 대조군과 함께 시간대 별로 HE 염색을 시행하여 광학현미경으로 검정한 결과 세포질이 거의 없고 핵만 작은 원형으로 농축되어 있어서 일반적으로 핵농축 세포라고 부르는 세포들이 많이 포함된 난포와 핵농축 세포가 단지 몇 개만 포함되어 있는 난포로 구분할 수 있었다. 핵농축 세포는 방사선조사군의 난포에서 다량으로 관찰되었으며, FSH 처리군에서는 난포가

성장 (일차난포, 강소형성진난포, 강소형성난포) 할수록 감소하는 결과를 보였다. 이러한 핵농축 세포들은 난포상태가 불안한 군에서 증가하는 양상을 보였고, 핵농축 세포수의 증가가 난포폐쇄와 관련이 있다는 보고 (Palumb and Yeh, 1994)를 뒷받침할 수 있는 자료라 생각된다. FSH 처리군의 강소형성진난포와 강소형성난포에서는 과립세포의 유사분열 현상이 증가되었는데, 이것은 FSH가 유사분열을 증가시키고 난포를 성장시키며 apoptosis를 억제시킨다는 보고와 일치하였다 (Adashi, 1991; Adashi, 1994).

본 실험에서 정상난포와 폐쇄난포의 조직학적인 관찰을 위해 시행한 reticulín 염색은 각 단계의 난포성장을 분명히 구별할 수 있었으며, 특히 원시난포시기에 HE 염색으로는 구분하기 어려운 정상과 폐쇄난포를 난포를 둘러싸고 있는 기저막의 변화 차이로 분명히 구분할 수 있었다. 정상 원시난포와는 달리 폐쇄되는 원시난포의 기저막이 난포에서 분리되어 불규칙하게 변형된 상태를 reticulín 염색으로 분명하게 확인할 수 있으므로 이 방법은 원시난포 단계의 폐쇄기전 연구에 앞으로 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

성숙이 진행된 난포폐쇄에서 난자 자체는 apoptosis 과정이 일어나지 않고, 주로 난자 주위의 과립세포에서 apoptosis가 많이 일어난다 (Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al., 1991; Jolly et al., 1994; Palumbo and Yeh, 1994, 1995). 이는 난포폐쇄에 과립세포가 중요한 역할을 한다는 사실을 암시하는데 과거에는 과립세포의 유사분열상과 형태적 변화를 관찰하기 위하여 <sup>3</sup>H-thymidine을 결합시킨 후 고해상도 자기방사법 (high resolution autoradiography)을 이용하여 cell kinetic study가 수행되었다 (Byskov, 1974). 그러나 이 방법은 먼저 세포가 <sup>3</sup>H-thymidine을 흡수하여 DNA에 결합되어야 하기 때문에 방사성동위원소가 부착된 thymidine을 생체에 투여하는 과정이 필요하고, 방사선에 노출되는 시간이 길며, β-방사선의 낮은 투과율 등이 단점이다 (Hirshfield, 1989). 특히 <sup>3</sup>H-thymidine 투여 후 성장속도가 느린 small follicle에는 민감한 방법이 되지 못하여 (Hirshfield and Midgley, 1978) 사용할 수 없다.

방사선조사가 포유류의 난포에 유해하게 작용한다는 것은 널리 알려진 사실이나 방사선에 의해 영향을 받은 난소 및 난포의 형태학적 특성과 생화학적 변화에 대한 보고서는 거의 없는 실정이다. 방사선조사는 난소에 손상을 일으키는데 (Jarrell et al., 1986) 특히 난포내 과립세포의 apoptosis를 유발시키며 (Hendry and West, 1997), 난자의 염색체에 손상을 일으켜 난소의 기능을 저하시킨다 (Champman, 1982). 난포폐쇄를 인위적으로 유발시키기 위해 시행한 방사선조사 결과, 조사 6시간과 12시간 후에 적출된 폐쇄난포에는 많은 apoptosis 소체들과 세포조각 (cell debris)이 존재하였고, 방사선조사 24시간 후에는 다형핵 백혈구들과 탐식세포들이 기저막

을 통과하여 난포 내로 침윤된 것이 많이 관찰되었다. 다형핵 백혈구 수는 대조군에 비해 방사선조사군에서 증가하였다. 이는 난포폐쇄시 neutrophil의 수가 증가한다는 보고 (Chang et al., 1998)와 일치하며, 난포폐쇄에 다형핵 백혈구뿐만 아니라 탐식세포도 어떤 역할을 수행한다는 것을 시사한다.

Apoptosis를 측정하기 위한 대표적인 방법으로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 DNA band가 사다리 모양을 보이는 DNA 분절화를 확인하는 방법이 있다 (Wyllie, 1980). DNA 분절화 분석방법은 난소 전체를 대상으로 이루어지거나 *in vitro* 상태에서 주로 이용되기 때문에 각각의 난포에 대한 apoptosis 평가는 불가능하다. 그러나 *in situ* 방법에 의한 TUNEL 방법은 조직학적으로 각 난포의 apoptosis 유무를 판별할 수 있어 난포의 apoptosis 연구에 매우 중요한 정보를 제공해 줄 수 있다 (Billig et al., 1993; Billig et al., 1994). DNA 분절화가 일어난 특정 세포의 위치를 알아내는 TUNEL 방법의 유용성은 난소 내에서 일어난 특정 세포의 apoptosis 현상의 연구와 배양된 세포에서 apoptosis 현상을 연구하는데 필수적인 방법이라고 판단된다.

본 실험에서 FSH 투여군의 TUNEL 염색성은 전반적으로 감소하였다. 이것은 FSH가 apoptosis를 억제한다는 보고와 일치하였다. 방사선조사군의 과립세포에서 TUNEL 염색성은 6시간부터 12시간, 24시간으로 시간이 경과할수록 점차 증가되었다. 방사선조사가 직접적으로 DNA에 손상을 주어 apoptosis를 유도하는 경우와 세포막에 손상을 줌으로서 apoptosis를 증가시킬 것이라는 보고 (Haimovitz-Friedman et al., 1994)가 있으나, 본 실험과 같이 이온화방사선에 전선이 노출되는 경우는 뇌하수체 호르몬의 분비감소로 난포의 과립세포가 간접적으로 영향을 받아 난포폐쇄가 유발되는 경우도 생각할 수 있을 것이다. 그러나 본 실험에는 사춘기 이전의 미성숙 생쥐를 사용하였으므로 뇌하수체 기능저하에 의한 난포폐쇄는 배제될 수 있다고 생각된다. 또한 방사선조사군의 폐쇄난포에서 TUNEL 염색성이 과립세포에서 점점 증가되는 결과는, 과립세포가 난포폐쇄의 주요인이며, 과립세포가 apoptosis 과정을 통해 퇴화된다는 연구보고와 일치하며, 이온화방사선조사로 난포 과립세포의 apoptosis가 유도되는 것으로 사료된다.

그러나 본 실험에서 험막세포의 TUNEL 염색성은 거의 나타나지 않았다. 이런 결과는 험막내층과 험막외층에는 혈관 분포가 많아 macrophage의 출현이 비교적 용이하여 apoptosis 소체가 신속하게 포식되어 염색이 되지 않았거나, 험막세포는 apoptosis가 아닌 다른 기전으로 사멸되는 경우를 추정할 수 있다. O'shea 등 (1978)은 양의 폐쇄난포에서 험막세포는 변성을 나타낸다고 했고, 흰쥐와 토끼의 난포가 폐쇄되는 동안에 험막세포는 많이 위축된다고 보고하였다. 이런 보고에 비추어 볼 때 DNA 분절화가 일어나는 특정세포에

*in situ* 방법의 유용성은 난소에서 일어나는 특정 세포의 apoptosis 현상 연구에 새로운 방법을 제시해 줄 것으로 사료되며 추후 더욱 정밀한 실험과 연구가 요구된다.

결론적으로 TUNEL 방법만으로 정상과 폐쇄난포를 판정할 수 없으므로 기저막의 변화를 분명히 판정할 수 있는 reticulín 염색과 다른 조직화학적, 면역조직화학적 방법을 혼용하여 이를 종합 비교 분석하여 폐쇄난포의 형태학적 기준을 새롭게 마련해야 할 것으로 사료된다.

---

#### 감사의 글

이 논문은 2003학년도 충남대학교 자체연구비 지원에 의하여 진행되었음.

### REFERENCES

- Adashi EY, The ovarian life cycle, In Yen SSC and Jaffe RB (eds), Reproductive endocrinology. 1991. pp. 181-237. Saunders Company. PH, USA.
- Adashi EY. Endocrinology of the ovary. Hum Reprod. 1994. 9: 815-827.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinology 1993. 133: 2204-2212.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Gonadotropin-releasing hormones (GnRH) directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. Endocrinology 1994. 134: 245-252.
- Breitenecker G, Friedrich F, Kemeter P. Further investigations on the maturation and degeneration of human ovarian follicles and their oocytes. Fertil Steril. 1978. 29: 336-341.
- Byskov AG. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. J Reprod Fertil. 1974. 37: 277-275.
- Byskov AG. Follicular atresia, In: Jones RE (ed.), The vertebrate ovary comparative biology and evolution. 1978. pp. 533-562. Plenum Press. NY, USA.
- Byskov AG. Atresia, In: Midgley FAR, Sadler WA (Eds), Ovarian follicular development and function. 1979. pp. 41-58. Plenum Press. NY, USA.
- Chang RJ, Gougeon A, Erickson FF. Evidence for a neutrophil-interleukin-8 system in human folliculogenesis. Am J Obstet Gynecol. 1998. 178: 650-657.
- Chapman RM. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. Semin Oncol. 1982. 9: 84-94.
- Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today 1993. 14: 126-130.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN. Ionizing radiation acts on cellular substances to generate ceramide and initiate apoptosis. J Exp Med. 1994. 180: 525-535.
- Hay MF, Cran DG, Moor RM. Structural changes occurring during atresia in the ovarian follicles. Cell Tissue Res. 1976. 169: 515-529.
- Hendry JH, West CM. Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. Int J Radiat Biol. 1997. 71: 709-719.
- Hirshfield AN, Midgley AR. Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol Reprod. 1978. 19: 597-605.
- Hirshfield AN. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. Biol Reprod. 1989. 41: 309-316.
- Hughes FM, Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. Endocrinol. 1991. 129: 2415-2422.
- Jarrell J, YoungLai EV, Barr R, O'Connell G, Belbeck L, McMahon A. An analysis of the effects of increasing doses of ionizing radiation to the exteriorized rat ovary of follicular development, atresia, and serum gonadotropin levels. Am J Obstet Gynecol. 1986. 154: 306-309.
- Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty. Apoptosis in granulosa cells in regulation steroid synthesis, cyclic adenosine 3' and 5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone and follicular atresia. Biol Reprod. 1994. 51: 934-944.
- Junquerita LC, Carneiro J, Kelly RO. Basic histology appletion and lange. 1989. pp. 443-444. Nerwalk. St, USA.
- McNatty KP, MaKris A, De Grazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. Steroidogenesis in granulosa cell and corpus luteum: the production of progesterone, androgen and estrogens by human granulosa cell *in vitro* and *in vivo*. J Steroid Biochem. 1979a. 11: 775-779.
- McNatty KP, Moore-Smith D, MarKis A, Osathanondh R, Ryan KK. The microenvironment of the human antral follicles: interrelationships among steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte *in vivo* and *in vitro*. J Clin Endocrinol Metab. 1979b. 49: 851-860.
- Palumbo A, Yeh J. *In situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. Biol Reprod. 1994. 51: 888-895.
- Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. J Soc Gynecol

- Investig. 1995. 2: 565-573.
- Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 1994. 15: 725-751.
- Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 1993. 14: 582-590.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and post ovulatory regression. *Endocrinology* 1991. 129: 2799-2801.
- Tsafiriri A, Braw RH. Experimental approaches to atresia in mammals, In: *Oxford review of reproductive biology*. 1984. Vol 6 pp. 226-265. Oxford Univ Press. Oxford, UK.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980 284: 255-256.