

Cortisol이 사람 과립-황체화 세포의 스테로이드 생성과 세포자연사에 미치는 영향

김진희 · 양현원[†]

서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과

Effects of Cortisol on the Steroidogenesis and the Apoptosis of Human Granulosa-Lutein Cells

Jinhee Kim and Hyunwon Yang[†]

Dept. of Biotechnology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

ABSTRACT : Cortisol is present in high concentration in the ovary and its receptor is expressed in the ovarian cells. Moreover, cortisol is known to have a role in steroid synthesis and cell metabolism in human granulosa and lutein cells. However, little is known of the role of cortisol presenting in high concentration in the follicles after LH surge on the granulosa-lutein cells. Therefore, the this study we evaluated the apoptosis and the production of progesterone (P₄) and estradiol (E₂) in the granulosa-lutein cells that are obtained during oocyte-retrieval after treatment with 5, 50, and 500 $\mu\text{g/ml}$ cortisol and 1 IU/ml FSH. Results of DNA fragment analysis and TUNEL assay demonstrated that DNA fragmentation and the rate of apoptotic cells were increased in a dose-dependent manner showing a significant increase in 50 and 500 $\mu\text{g/ml}$ cortisol treated cells. We found, however, that FSH did not suppress the apoptosis of the cells induced by cortisol. In the results of chemiluminescence assay for P₄ and E₂, P₄ production was decreased by cortisol treatment, whereas E₂ was not changed. We also demonstrated that FSH did not inhibit the suppressive effect of GnRH on P₄ production as the result of apoptosis. The present study suggests that cortisol of high concentration could cause the apoptosis of human granulosa-lutein cells by suppressing the production of P₄. However, we need more studies to elucidate the mechanism by which cortisol induces apoptosis in human granulosa-lutein cells in view of the fact that our results are inconsistent with previous reported data.

Key words : Apoptosis, Cortisol, Granulosa-lutein cell, Follicular development, FSH.

요 약 : Cortisol은 난소내 다량으로 존재하며, 난소 세포에 그 수용체가 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 사람의 과립 및 황체화 세포에서 cortisol은 스테로이드 생성과 세포 대사에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있으나, 배란 후 난포액에 높은 농도로 존재하는 cortisol이 과립-황체화 세포에 어떤 영향을 미치는 지는 정확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 실험에서 과배란 유도후 획득한 사람 과립-황체화 세포를 배양하면서 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ cortisol과 1 IU/ml FSH를 처리하고 세포의 세포자연사와 분비된 progesterone(P₄)과 estradiol(E₂)량의 변화를 조사하였다. DNA 분절화 분석과 TUNEL 방법으로 세포자연사를 평가한 결과, cortisol은 농도 의존적으로 과립-황체화 세포의 세포자연사를 증가시켰고, 특히 50과 500 $\mu\text{g/ml}$ cortisol을 처리한 군에서 유의한 차이를 보이며 세포자연사 비율을 증가시켰다. 또한 cortisol에 의한 세포자연사의 증가는 FSH에 의해 억제되지 못함을 알 수 있었다. 화학발광면역 측정법을 이용하여 배양내 P₄와 E₂의 양을 측정한 결과, cortisol을 처리한 후 E₂의 양은 변화가 없었던 반면 P₄의 양은 감소하였다. 이러한 cortisol의 P₄ 합성 억제 효과는 세포자연사 결과와 마찬가지로 FSH에 의해 회복되지 못함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 일정 농도 이상의 cortisol은 과립-황체화 세포의 세포자연사를 유발시킬 수 있으며, 또한 P₄의 합성을 억제시킴으로써 난포 폐쇄를 직접적으로 유발시킬 수 있음 보여준다. 그러나 본 연구 결과들은 기존의 연구 결과와 상반된 결과를 보이고 있으며, 앞으로 과립-황체화 세포에 대한 cortisol의 생리적인 관련성을 밝혀 그 기전을 명확히 할 필요성이 있다.

[†] 교신저자: 서울시 노원구 공릉2동 126번지, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 02-970-5662, (팩) 02-970-5974, E-mail: hwyang@swu.ac.kr

서 론

Cortisol은 뇌하수체 전엽으로부터 분비되는 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 자극에 의해 부신피질에서 합성되는 glucocorticoid계 스테로이드 호르몬으로 장기적인 스트레스와 몸의 긴장으로 인해 분비가 촉진된다(Streeten et al., 1984). Cortisol은 또한 체내에서 대사작용, 면역반응, 생식기능을 포함하는 다양한 생리적 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다(McKay & Cidlowski 1999; Andersen, 2002; Wang, 2005). 특히, 난소기능에 영향을 준다는 사실이 생쥐(Jarrett, 1965), 흰쥐(Baldwin, 1979), 소(Komiyama et al., 2008) 및 사람(Sasson & Amsterdam, 2003)을 대상으로 한 다양한 연구에서 알려져 왔다. 부신피질에서 분비되는 glucocorticoid 호르몬들이 흰쥐 난소내 과립세포에 직접적으로 작용하여 estradiol(E₂) 합성을 억제시키며(Hsueh & Erickson, 1978), 또한 세포내 cholesterol 이동에 관여하는 steroidogenic acute resulatory(StAR) 단백질을 조절하여 progesterone (P₄) 합성을 억제하는 것으로 보고되고 있다(Huang & Shirley, 2001).

난소내 과립세포에서 glucocorticoid 호르몬 수용체가 발현한다는 것이 알려져 왔으며(Schreiber et al., 1982), 또한 난포액 내에는 다량의 cortisol-binding globulin과 glucocorticoid 호르몬이 존재하는 것이 보고되었다(Fateh et al., 1989). 이렇게 난소에서 국부적으로 합성되는 glucocorticoid 호르몬과 그 수용체는 서로 작용하여 난자의 성숙과 난포의 발달에 영향을 준다는 것이 밝혀졌다(Ben-Rafael et al., 1988). 특히, glucocorticoid 호르몬의 대표적인 물질인 cortisol을 배양 중인 흰쥐 과립세포에 처리한 결과, FSH에 의해 자극되는 aromatase 활성이 억제되고, P₄ 합성은 증진되었다(Hsueh & Erickson, 1978; Schoonmaker & Erickson, 1983). 또한 배양 중인 소의 과립세포에 cortisol을 처리한 결과, 단독으로 P₄ 생성에 영향을 미치지 못하나, insulin과 함께 처리하면 자극 효과를 보이는 것으로 보고하고 있다(Channing et al., 1976).

한편, glucocorticoid 호르몬은 간과 흉선에 작용하는 대표적인 호르몬으로 면역세포에 대한 glucocorticoid 호르몬의 영향에 대한 많은 연구가 있어 왔다. 즉, glucocorticoid 호르몬을 설치류 면역세포에 처리하면 당의 유입이 억제되고(Munck, 1968), 미토콘드리아의 ATP 합성이 감소하며(Nordeen & Young, 1976), 세포내 칼슘의 양이 증가(Kaiser & Edelman, 1977)

하는 등 대사적 변화를 보인다. 또한 glucocorticoid 호르몬을 미성숙된 면역세포에 처리한 결과 세포내 핵의 분절화가 증가하고 염색질 응축 현상이 일어나며, DNA 분절화가 증가하는 등 전형적인 세포자연사 양상을 보이는 것으로 알려져 있다(Giddings & Young, 1974). 이는 glucocorticoid 호르몬이 세포에 내재하는 endonuclease를 활성화시켜 DNA 가닥이 분절되면서 일어나는 현상으로 설명하고 있으나(Hallahan et al., 1973), 이러한 glucocorticoid 호르몬이 면역세포에서와 같은 기전으로 난소내 과립세포에 세포자연사를 유발시킬 수 있는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

따라서 본 실험은 cortisol이 난소내 스테로이드 호르몬 합성과 세포자연사에 직접적으로 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양된 사람의 과립-황체화 세포에 cortisol과 FSH를 처리한 후 생성되는 P₄와 E₂의 양을 측정하고, 배양된 과립-황체화 세포의 세포자연사 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 과립-황체화 세포의 획득

사람 과립-황체화 세포는 체외수정 및 배아이식 시술을 시행하는 환자로부터 난자를 채취하는 과정에서 얻어 사용하였다. 난소의 과배란 유도는 FSH(Metrodin, MerckSerono, Germany)와 hMG(IVF-M, LG Chem. Co., Korea) 또는 GnRH 작용제(Buserelin acetate; Suprefact, United Kingdom)와 FSH/hMG를 병용하여 시행하였다. 난포의 성장은 질식 초음파와 호르몬 측정으로 확인하였으며, 난포의 크기가 18 mm 이상이거나 난포당 E₂ 수준이 300~400 pg/ml 이상인 경우 hCG(Pergonal, MerckSerono) 10,000 IU를 주사하여 배란을 유도하였고, 주사 후 35~36시간에 질식 초음파로 난포를 확인하면서 질벽을 통하여 난포액을 채취하였다.

각각의 난포에서 추출된 난포액은 배양 접시에 옮기고, 난포액 내에 존재하는 과립-황체화 세포들을 채취하였으며, 배양액에 옮긴 후 혈구세포들을 분리하기 위해 과립-황체화 세포가 들어있는 배양액 1 ml를 40% percoll 3 ml 위에 조심스럽게 올려놓고 300×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 과립-황체화 세포들은 중간에 층을 형성하게 되며, 혈구세포들은 바닥에 가라앉는다. 과립-황체화 세포들을 채취하여 배양액으로 3번 세척한 다음 0.1% collagenase(Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO)가 들어있는 배양액으로 옮겨 주었다. 37°C 배양기에서 30분 경과 후 과립-황체화 세포들을 26G 주사 바늘을 이용하여 여러 번 흡입과 배출을 해줌으로써 멍쳐져 있던 세포 덩어리를 날개의 세포들로 분리시킨 다음 hemocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. 생존율을 측정하기 위하여 trypan blue 용액(Sigma Chemical Co.)을 사용하여 염색한 후 염색되지 않은 세포를 계수하여 생존율을 계산하였다. 배양에 사용한 세포는 생존율 70% 이상을 보이는 것으로 배양액 1 ml당 100,000 개의 세포를 넣어 배양하였다.

2. 과립-황체화 세포의 배양

준비된 과립-황체화 세포들은 24-well 배양접시(Nunc, Denmark)의 1 well 당 100,000개/ml의 세포를 넣어, 37°C에서 95% 공기과 5% CO₂가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(dMEM; GIBCO, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)에 10% fetal bovine serum(FBS; GIBCO)과 2 mM L-glutamine(GIBCO), 100 U/ml penicillin(GIBCO), 100 µg/ml streptomycin(GIBCO)을 첨가하여 사용하였다. 준비된 과립-황체화 세포를 24-well 배양접시에 옮겨서 48시간 배양한 후 배양접시 바닥에 세포들이 충분히 부착되어 있는 것을 확인하고 배양액을 갈아주었으며, 다시 24시간 배양 후 배양액을 갈아주면서 배양접시 바닥에 부착된 세포를 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포를 계수하여 생존율을 계산하였다. 배양액 교환 후 실험군에는 각각 5, 50, 500 µg/ml cortisol (Sigma Chemical Co.)와 1 IU/ml FSH(Sigma Chemical Co.)를 처리하였다. 24시간 배양 후 배양액을 수거하여 호르몬 양을 측정하고 부착된 세포에서 세포자연사를 조사하였다.

3. TUNEL 방법에 의한 세포자연사 확인

배양된 과립-황체화 세포에서 세포자연사를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) kit(ApopTag; Millipore, Billerica, MA)를 사용하였다. 배양된 세포는 4% neutral buffered formalin로 10분간 고정된 후 Tris buffer로 세척하였다. ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 5분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme를 첨가한 후 37°C에서 90분간 반응시켰다.

반응을 중단시키기 위하여 stop buffer를 상온에서 10분간 처리한 후 Tris buffer로 3번 세척하였다. 세척 후 FITC가 결합되어 있는 anti-digoxigenin antibody로 37°C에서 30분간 처리한 후 Tris buffer로 세척하고 propidium iodide로 2차 염색을 시행하였다. Fluorescence mounting 용액으로 봉입한 후 형광 현미경하에서 세포자연사가 일어난 세포를 조사하였다. 세포자연사 비율은 임의적으로 선택된 200배 시야에서 각각 다른 시야로 5번을 옮기면서 300~500개의 세포를 계수하였으며, 이와 같은 계수를 5번의 각각 다른 실험에서 반복하였다.

4. 세포자연사 확인을 위한 DNA 분절화 분석

획득된 과립-황체화 세포에 0.2 ml 분쇄 완충액을 첨가하고 조직분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 시료에 12.5 µl의 10% SDS를 넣고 65°C에서 30분간 방치하였다. 여기에 35 µl의 8 M potassium acetate를 넣고 시료를 잘 섞은 후 60분간 단백질이 가라앉도록 얼음에 방치한 후 시료를 4°C, 5,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 1.5 ml 미량원심분리 시험관으로 옮기고, 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 재추출하였다. 상층액을 1.5 ml 미량원심분리 시험관에 옮기고, 0°C에서 보관한 2.5배 부피의 100% ethanol을 첨가, -70°C 초저온 냉동고에서 1시간 이상 침전시켰다. 이들 시료를 4°C에서 14,000×g으로 30분간 원심분리하여 DNA를 추출하고 침전물은 50 µl의 1X TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시킨 후 1 µl의 DNase-free RNase(500 µg/ml; Boehringer-Mannheim, IN)을 첨가하고 60분 동안 37°C에서 방치하였다. 시료의 DNA를 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol로 추출 후, 동량의 chloroform:isoamyl alcohol로 재추출하였다. 상층액을 모아서 0.1배 부피의 3 M sodium acetate와 0°C에 보관한 2.5배의 100% ethanol로 DNA를 침전시키고 -70°C 초저온 냉동고에서 적어도 60분 이상 방치시켰다. 이것을 4°C에서 14,000×g으로 30분간 원심분리하고, 0°C에 보관된 0.2 ml의 80% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 압축 결정물을 25 µl의 증류수에 녹이고, 260 nm의 흡광도에서 DNA량을 측정한 다음 -20°C에 보관하였다. 이렇게 추출된 DNA를 lane당 5 µg의 농도로 1.5% agarose gel에 loading하고, running buffer로는 TBE 용액을 사용하

였으며, 50 V에서 3시간 동안 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 transilluminator로 확인하였다.

5. 배양액 내 스테로이드 호르몬의 측정

배양액 내 호르몬의 정량은 ACS:180™ system (Ciba-Corning, USA)을 이용한 화학발광면역 측정법(Chemiluminescence assay; CIA)으로 시행하였다. 획득된 세포는 2 동안 배양한 후 새 배양액으로 교환해 주었고, cortisol와 FSH를 농도별로 처리하였다. 처리 후 24시간에 배양액을 획득하여 P₄와 E₂를 측정하였다.

6. 통계학적 분석

실험은 5번 반복하였으며, 스테로이드 농도와 세포자연사 비율은 모두 평균±표준오차로 표시하였다. 통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA, Tukey test 방법을 사용하였으며, 대조군과 실험군을 비교하여 *p* 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 생존율에 미치는 Cortisol의 영향

Cortisol이 사람 과립-황체화 세포에 세포 죽음을 유발시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 배양된 과립-황체화 세포에 cortisol을 처리하고 세포의 생존율을 조사하였다. 세포의 생존율은 배양 1일째 세포의 수를 100%로 하고 그것에 대한 상대적인 비율로 나타내었다. Cortisol 처리 후 2일 동안은 모든 실험군 간에 생존율이 80% 내외로 큰 차이를 보이지 않은 반면, 3일째부터는 50과 500 µg/ml cortisol을 처리한 군에서 생존율이 감소하는 경향을 보이다가 4일째와 5일째에는 생존율이 60% 이하로 통계학적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 1A). 이러한 생존율의 감소가 FSH에 의하여 억제될 수 있는지를 조사하기 위하여 cortisol 50 µg/ml와 FSH 1 IU/ml를 함께 처리한 후 세포의 생존율을 조사하였다. Cortisol만을 처리한 군에서 5일째 생존율은 43.5%를 보였으며, cortisol과 FSH를 함께 처리한 실험군에서도 40.1%를 보여 cortisol에 의한 세포의 죽음은 FSH에 의해 회복되지 못한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B).

2. Cortisol에 의해 유발된 세포자연사 확인

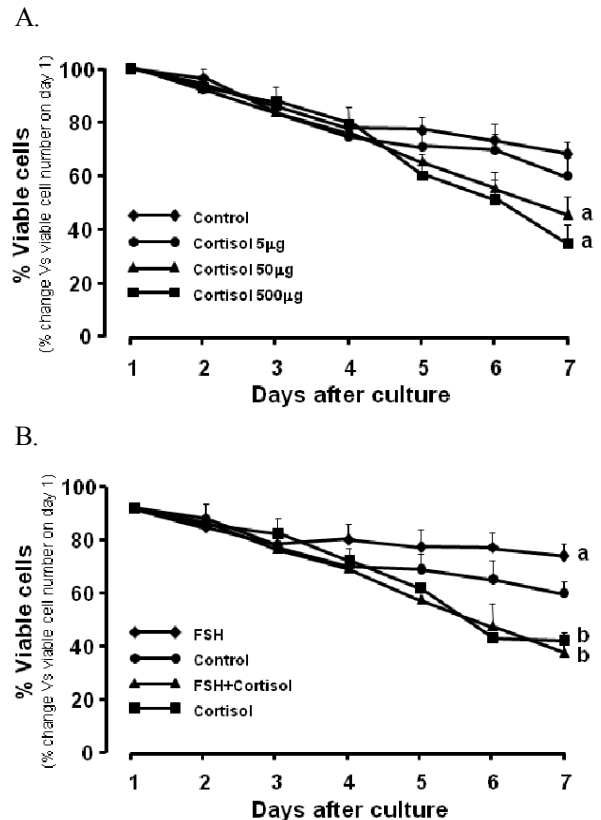


Fig. 1. Viability of the cultured granulosa-lutein cells after treatment with different doses of cortisol or FSH. The granulosa-lutein cells were cultured for 7 days in the media containing 5, 50, and 500 µg/ml cortisol or 1 IU/ml FSH. The cells attached on the plates were stained with 0.4% trypan blue and the number of stained cells was counted. All data were expressed as means±standard error. a, b *p*<0.05 versus control.

이러한 세포의 죽음이 세포자연사에 의한 것인지를 확인하기 위하여 배양된 세포에서 TUNEL 방법으로 세포자연사를 조사하였고, 또한 배양된 세포에서 추출된 DNA를 이용하여 분절화 정도를 분석하였다. FSH와 cortisol을 처리하고 3일째에 TUNEL 방법으로 apoptotic 세포들을 확인한 결과, 대조군 세포에서는 몇 개의 세포에서만 TUNEL 방법에 의해 염색된 것을 확인할 수 있었고, FSH만을 처리한 군에서는 염색된 apoptotic 세포를 거의 찾아볼 수 없었다. 반면 cortisol만을 처리한 실험군과 FSH를 함께 처리한 실험군 모두에서는 전체 세포의 50% 이상에서 염색된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). DNA 분절화 분석 결과에서도 cortisol만을 처리

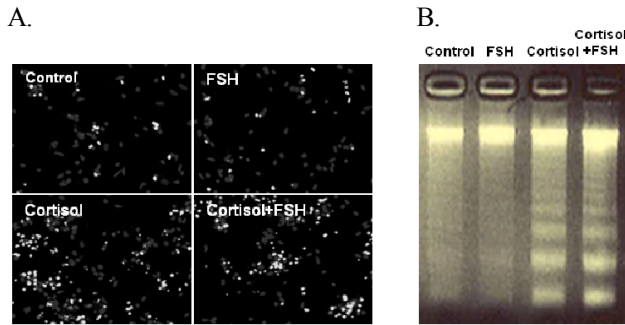


Fig. 2. Detection of apoptotic cells in the cultured granulosa-lutein cells after treatment with cortisol or FSH (A). The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 50 $\mu\text{g/ml}$ cortisol or 1 IU/ml FSH. The cells attached on the plates were stained by using TUNEL assay kit and counter-stained with propidium iodide. Apoptotic cells stained by TUNEL show as white. Magnification, $\times 200$. **Analysis of DNA fragmentation in the cultured granulosa-lutein cells after treatment with cortisol or FSH (B).** The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 50 $\mu\text{g/ml}$ cortisol or 1 IU/ml FSH. DNA extracted from the cultured cells was resolved by 1.5% agarose gel electrophoresis. The DNA fragments on gel were stained with ethidium bromide and visualized on UV transilluminator.

한 군과, cortisol과 FSH를 함께 처리한 군 모두에서 DNA 분절화 정도가 많이 일어나는 것을 알 수 있었다(Fig. 2B).

3. 세포자연사에 미치는 Cortisol의 영향

Cortisol에 의해 일어난 세포자연사 정도를 정확히 분석하기 위해 TUNEL 방법으로 염색된 apoptotic 세포를 계수하였다. Cortisol 5 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 군에서 apoptotic 세포의 비율은 $26 \pm 12.7\%$ 로 cortisol을 처리하지 않은 대조군($13 \pm 18.7\%$)에 비하여 유의한 차이 없이 나타났으나, 50와 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 군에서는 각각 $62 \pm 17.7\%$ 와 $60 \pm 10.5\%$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 3A). FSH가 cortisol에 의해 유발된 세포자연사를 억제할 수 있는지를 알아보기 위하여 위와 동일한 방법으로 FSH 1 IU/ml와 cortisol 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 함께 처리한 결과, apoptotic 세포의 비율은 FSH만은 처리한 군에서 2% 이하로 세포자연사가 완전히 억제된 반면, cortisol을 처리한 군에서는 $60 \pm 19.6\%$ 를 보여 유의하게 증가된 것을 알 수 있었다. 한편, FSH와 cortisol을 함께 처리

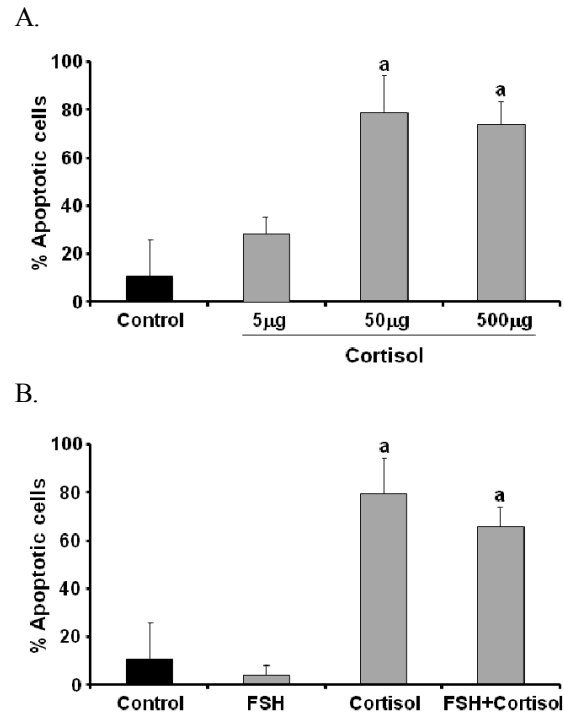


Fig. 3. Effects of cortisol and FSH on the apoptosis of the cultured granulosa-lutein cells. The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ cortisol or 1 IU/ml FSH. The cells were fixed and stained by using TUNEL assay kit. The number of the cells stained with propidium iodide and the apoptotic cells stained by TUNEL was counted. All data were expressed as means \pm standard error. a, $p < 0.05$ versus control.

한 군에서는 $62 \pm 10.5\%$ 를 보여 cortisol에 의한 apoptotic 효과를 FSH가 억제시키지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

4. 스테로이드 생성에 미치는 Cortisol의 영향

3일간 배양한 과립-황체화 세포에 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 cortisol과 1 IU/ml FSH를 처리한 후 배양액내 P_4 와 E_2 의 양을 측정 한 결과, P_4 의 농도는 FSH만을 처리한 군에서 $31 \pm 7.1 \text{ ng/ml}$ 로 대조군 $13 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ 에 비해 3배 정도의 증가를 보였다. 반면, cortisol을 함께 처리하면 농도 의존적으로 P_4 의 양이 감소하였고, 50와 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 실험군에서 P_4 의 농도는 각각 16 ± 5.1 과 $5 \pm 2.5 \text{ ng/ml}$ 로 FSH만을 처리한 군에 비교하여 유의하게 감소하였다(Fig. 4A). 또한 E_2 의 농도를 측정 한 결과 모든 군에서 대조군과 큰 차이 없이 비슷한 수준을 보였다(Fig. 4B).

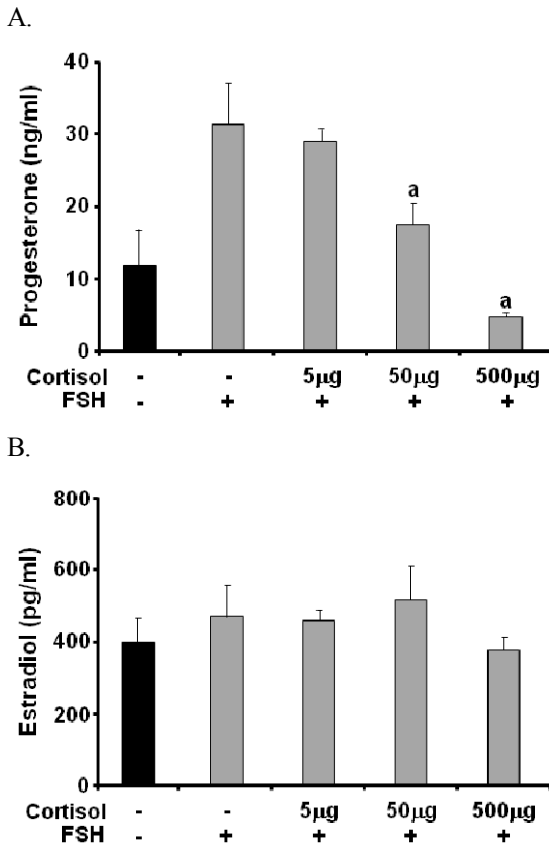


Fig. 4. Effects of cortisol and FSH on the progesterone and estradiol production by granulosa-lutein cells. The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ cortisol or 1 IU/ml FSH. The concentration of progesterone and estradiol in the cultured media was measured by using chemiluminescence assay kit. All data were expressed as means \pm standard error. a, $p < 0.05$ versus FSH only.

5. 화학면역발광측정법의 정도관리

회수율은 측정 kit(018303A; Ciba-Corning, USA)에 포함되어 있는 고농도 관리 혈청을 1.0배, 0.8배, 0.6배, 0.4배, 0.2배로 희석하여 계산하였으며, 3회 반복하여 평균값을 구한 결과 E_2 는 83%, P_4 는 85%로 나타났으며, 변이 계수는 전체적으로 10% 내외를 보였다(Table 2). 감도는 각 호르몬

Table 2. Recovery rate and sensitivity of ACS:180™ for estradiol (E_2), progesterone (P_4) and luteinizing hormone (LH)

	Recovery rate (%)		Sensitivity
	Mean \pm SD	CV (%)	
E_2	82.50 \pm 9.56	11.59	13.10 (pg/ml)
P_4	85.33 \pm 2.52	2.29	0.25 (ng/ml)
LH	118.33 \pm 8.50	7.18	0.20 (mIU/ml)

의 저농도 관리 혈청을 1/16배까지 희석하여 측정할 수 있는 최저값을 계산하였으며, 3회 반복 측정하여 평균값을 감도로 정한 결과 E_2 는 13.1 pg/ml, P_4 는 0.25 ng/ml를 보였다(Table 2). 정확도는 각 호르몬 농도를 확인한 고농도의 혈청을 희석하여 각 농도별로 5회씩 측정 후 평균값을 구하여 계산하였다. 정확도는 E_2 에서 각 검사간 상관관계가 $Y=0.98x - 45.41$ ($r=0.999$, $p < 0.001$), P_4 에서 $Y=0.83x+0.09$ ($r=0.999$, $p < 0.001$)를 나타냈다(Table 3). 각 호르몬 측정시 검사간 정밀도와 검사내 정밀도는 상기한 3종의 관리 혈청을 이용하여 분석하였다. 검사내 정밀도는 농도별로 동일한 관리 혈청을 연속 측정하여 변이 계수를 구하였고, 검사간 측정값의 재현성과 시약의 안정성을 평가하기 위한 검사간 정밀도는 3종의 동일 관리 혈청과 동일한 측정 시약을 이용하여 측정 후 변이 계수를 구하였다. 3가지 표준 검체를 사용하여 얻은 검사내 정밀도 및 검사간 정밀도는 각각의 변이 계수가 대부분 10% 이하로 나타났으나, 저농도 표준 검체의 정밀도는 10%를 조금 상회하였다(Table 4).

논 의

난소내 과립세포의 세포자연사는 난포액내에 존재하는 여러 가지 물질에 의하여 촉진되거나 억제될 수 있다. 그 중에 cortisol은 난포액에서 높은 농도로 존재하면서 과립세포에서 발현되는 cortisol 수용체와 결합하여 국부적으로 난소의 기능을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다(Sasson & Amsterdam, 2003). 본 연구에서도 난자 채취 과정에서 획득한 난포액에

Table 1. Levels of steroid and peptide hormones in human follicular fluid

Hormones	E_2 (ng/ml)	P_4 ($\mu\text{g/ml}$)	T (ng/ml)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	PRL (ng/ml)	Cortisol ($\mu\text{g/ml}$)	TSH (mIU/ml)	hCG (mIU/ml)
Mean \pm SD	1,664.3 \pm 2,125.3	13.1 \pm 8.1	7.4 \pm 3.6	3.2 \pm 2.5	5.0 \pm 3.1	45.7 \pm 26.9	75.7 \pm 25.3	2.7 \pm 1.4	74.0 \pm 49.8

Table 3. Accuracy of ACS:180™ for estradiol (E₂), progesterone (P₄) and luteinizing hormone (LH)

E ₂ (pg/ml)		P ₄ (ng/ml)		LH (mIU/ml)	
Added (pg/ml)	Found (Mean±SD)	Added (ng/ml)	Found (Mean±SD)	Added (mIU/ml)	Found (Mean±SD)
1,436	1,377±141	26.6	22.2±1.2	112	110±2
718	665± 57	13.3	11.0±0.4	56	66±3
359	300± 34	6.7	5.5±0.1	28	33±6
239	201± 22	4.4	4.1±0.3	19	25±0
180	129± 29	3.3	2.7±0.6	14	17±2
144	100± 14	2.7	2.3±0.2	11	14±2
Y=0.98x-45.41		Y=0.83x+0.09		Y=0.96x+5.94	
r=0.999		r=0.999		r=0.995	
p<0.001		p<0.001		p<0.001	

Table 4. Within-run and between-run precisions of ACS:180™ in measurement of estradiol (E₂), progesterone (P₄) and luteinizing hormone (LH)

	E ₂ (pg/ml)		
	Con A	Con B	Con C
Within precision (n=5)	37.44±2.99 (CV=7.98%)	154.03±9.22 (CV=5.99%)	233.69±7.97 (CV=3.41%)
Between precision (n=10)	41.82±9.70 (CV=23.19%)	160.80±9.75 (CV=6.07%)	243.21±16.25 (CV=6.68%)
	P ₄ (ng/ml)		
	Con A	Con B	Con C
Within precision (n=5)	1.22±0.06 (CV=5.08%)	7.95±0.34 (CV=4.25%)	22.58±1.12 (CV=4.98%)
Between precision (n=10)	1.31±0.19 (CV=14.55%)	7.67±0.67 (CV=8.79%)	21.41±1.65 (CV=7.71%)
	LH (mIU/ml)		
	Con A	Con B	Con C
Within precision (n=2)	0.7±0.1 (CV= 14.29%)	12.7±0.1 (CV=0.79%)	1,709±0.6 (CV=3.35%)
Between precision (n=10)	1.31±0.35 (CV=26.39%)	12.39±1.99 (CV=16.09%)	18.2±2.29 (CV=12.68%)

서 cortisol 농도를 측정된 결과, 100 µg/ml 내외의 높은 농도로 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 비록 난소내 세포들이 glucocorticoid 합성을 위한 모든 효소들을 가지고 있지 않지만(Omura & Morohashi, 1995), 11β-hydroxysteroid dehydrogenase(11β-HSD) 효소를 이용한 glucocorticoid 대사 촉진 유발시켜 cortisol을 합성할 수 있는 것으로 알려지고 있다. 즉, 사람은 두 가지 형태의 11β-HSD 이성

체, 11β-HSD1과 11β-HSD2를 가지고 있으며, 이 중에 11β-HSD1은 사람 과립-황체화 세포에서 발현하면서(Michael et al., 1994) cortisone을 cortisol으로 전환시키는 반면, 배란전 난포세포에서 발현되는 11β-HSD2는 cortisol을 cortisone으로 불활성화시킨다(Shimojo et al., 1997; Tetsuka et al., 1997; Whorwood et al., 1992). 특히, 난포 발달 과정 중 미성숙 난포의 과립세포에서는 다량의 11β-HSD2를 합성함

으로써 난소내로 들어오는 cortisol을 불활성화시켜 난포 발달을 유지할 수 있다(Tetsuka et al., 1997). 반면, 배란시기 때 방출되는 LH는 난포 세포내 11β -HSD1을 발현시켜 cortisone을 cortisol로 전환시켰고, 그 작용으로 배란이 촉진되는 것으로 알려져 있다(Michael et al., 2003). 그러나 배란후 난포액에 높은 농도로 존재하는 cortisol이 과립-황체화 세포에 어떤 영향을 미치는지는 정확히 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 배란전 난포에 고농도로 존재하는 cortisol이 과립-황체화 세포에 미칠 수 있는 영향을 알아보기 위하여, 과립-황체화 세포에 cortisol을 농도별로 처리하고 세포자연사와 분비되는 E_2 와 P_4 의 양을 조사하였다. 먼저 과립-황체화 세포에서 세포자연사를 확인한 결과, 처리된 cortisol 농도에 의존적으로 세포자연사가 증가하는 것을 알 수 있었고, 또한 이러한 cortisol에 의한 과립-황체화 세포의 죽음이 FSH에 의해 회복되지 못한다는 것도 알 수 있었다.

이러한 실험 결과는 기존에 알려진 면역세포를 대상으로 한 연구 결과와 유사함을 보였다. 즉, 흰쥐의 면역세포를 배양하면서 glucocorticoid를 처리한 결과, 몇 시간 안에 세포들이 죽어가기 시작하는 것을 관찰할 수 있었고(Bourgeois & Newby, 1977), 만성 림프성 백혈병 세포를 포함한 다양한 면역종양세포에서도 glucocorticoid를 처리한 결과, 세포자연사에 의해 세포가 죽어가는 것을 확인할 수 있었다(Pisetsky & Fairhurst, 2007). 그러나 최근 유선 상피세포, 간세포, 난소내 난포세포 등 분비샘 세포를 대상으로 한 연구에서 glucocorticoid가 사이토카인에 의한 세포자연사 신호를 억제함으로써 세포의 죽음을 억제시키고, 이로 인하여 세포의 기능을 증진시키는 것으로 보고하고 있다(Feng et al., 1995; Hillier & Tetsuka, 1998). 특히, 소를 대상으로 한 실험에서 황체시기에 glucocorticoid를 반복적으로 투여할 경우 황체의 기능을 증진시키면서 황체의 수명을 늘릴 수 있으나(Kanchev et al., 1976; Dobson et al., 1987), 양을 대상으로 한 실험에서는 스트레스에 의한 cortisol의 증가가 난소의 생리적 주기의 이상을 초래하고 생식 신경내분비 기능을 억제하는 것으로 보고하고 있다(Macfarlane et al., 2000; Breen et al., 2005). 이와 같이 glucocorticoid가 직접적으로 난소의 기능을 조절한다는 많은 실험 결과가 보고되고 있으나, 난소내 세포에 대한 glucocorticoid의 정확한 역할에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다.

본 실험에서 cortisol에 의한 과립-황체화 세포의 죽음이

면역세포에서와 같이 세포자연사에 의해 진행된다는 것을 확인할 수 있었다. 이런 결과는 cortisol이 과립-황체화 세포에 직접적으로 작용하여 세포자연사를 유발시킬 수 있으며, 이로 인하여 난포 발달에 이상을 초래할 수 있음을 의미한다. 또한 본 실험 결과에서 cortisol의 세포자연사 효과를 FSH가 억제시키지 못함을 알 수 있었는데, 이러한 결과는 부신피질 기능에 이상이 생기거나 과도한 스트레스로 인한 혈청내 cortisol량이 증가할 경우 난소 폐쇄를 유발시킬 수 있으며, 아울러 여러 원인으로 혈중 cortisol 농도가 높은 환자인 경우 과배란 유도시 다량의 FSH 투여만으로 양질의 난자를 얻기 힘들 것으로 판단된다.

한편, 최근 소의 황체세포에 P_4 길항제를 처리한 실험에서 P_4 가 caspase-3 효소의 활성도를 억제시킴으로써 세포자연사를 억제시킬 수 있다는 보고가 있었다(Okuda et al., 2004). 따라서 본 실험에서도 과립-황체화 세포의 세포자연사가 P_4 량의 감소에 의해서 유발됐는지를 알아보기 위하여 배양한 과립-황체화 세포에 cortisol을 처리하고 P_4 의 양을 측정된 결과, P_4 의 양은 cortisol 농도가 증가할수록 감소하였다. 이러한 결과는 사람 임신 과정 중에 나타나는 혈중 cortisol 농도에 따른 P_4 분비량의 변화를 설명할 수 있다. 즉, 출산 전에 혈중 cortisol 농도는 최고점에 달하는 반면 P_4 농도는 급격히 떨어진다(Norwitz et al., 2001). 이러한 출산 전 P_4 농도의 급격히 감소는 황체세포의 세포자연사를 유발시키고, 이로 인하여 새로운 생리주기에 따른 난포 발달의 개시를 준비하는 것으로 설명할 수 있겠다.

아울러 본 실험 결과에서 P_4 합성의 감소는 FSH 처리에 의해 어느 정도 회복되었으나, 고농도의 cortisol을 FSH와 함께 처리한 결과에서는 회복되지 못한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 기존의 보고와는 다른 것으로서, Ben-Rafael 등 (1988)은 cortisol이 FSH의 작용과는 상관없이 독립적으로 사람 과립세포의 P_4 와 E_2 의 분비를 촉진시킨다고 보고하였고, Hsueh와 Erickson(1978)은 흰쥐의 과립세포를 가지고 한 실험에서 glucocorticoid는 FSH에 의한 E_2 의 생성을 억제하고 P_4 의 생성을 촉진시키는 것으로 보고하였다. 그러나 Ben-Rafael의 실험은 낮은 농도($10^{-7}M$)의 cortisol을 처리하고 단시간(6시간) 배양한 후에 P_4 와 E_2 의 분비량을 비교한 것으로서 본 실험과는 차이가 있다. 따라서 본 실험에서 나타난 P_4 분비량의 감소는 아마도 cortisol의 다량 처리로 인하여 cortisol이 P_4 수용체에 경쟁적으로 결합하면서 세포 자

체의 음성 되먹임 작용에 의해 P₄ 합성이 억제된 것으로 보이며(Ben-Rafael et al., 1988), 모든 실험군에서 E₂량의 변화가 없었던 것은 다량의 hCG 투여 이후 과립-황체화 세포 내 aromatase의 활성도가 완전히 억제되었기 때문으로 사료된다.

이상의 결과는 일정 농도 이상의 cortisol은 과립-황체화 세포의 세포자연사를 유발시킬 수 있으며, 또한 P₄의 합성을 억제시킴으로써 난포 폐쇄를 직접적으로 유발시킬 수 있음 보여준다. 또한 cortisol은 FSH와 상관없이 난포내 과립세포의 세포자연사를 유발시킬 수 있으나 난포액내 높은 농도의 P₄가 cortisol과 경쟁적으로 작용함으로써 그 효과는 억제될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 본 연구 결과들은 기존의 연구 결과와 차이를 보이고 있으며, 앞으로 사람 과립-황체화 세포에 대한 cortisol의 생리적인 관련성을 밝혀 그 기전을 명확히 할 필요성이 있다.

감사의 글

본 논문은 2009학년도 서울여자대학교 교내학술특별연구비의 지원을 받아 작성되었습니다.

인용문헌

- Andersen CY (2002) Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J Endocrinol* 173:211-217.
- Baldwin DM (1979) The effect of glucocorticoids on estrogen-dependent luteinizing hormone release in the ovariectomized rat and on gonadotropin secretin in the intact female rat. *Endocrinology* 105:120-128.
- Ben-Rafael Z, Benadiva CA, García CJ, Flickinger GL (1988) Cortisol stimulation of estradiol and progesterone secretion by human granulosa cells is independent of follicle-stimulating hormone effects. *Fertil Steril* 49:813-816.
- Bourgeois S, Newby RF (1977) Diploid and haploid states of the glucocorticoid receptor gene of mouse lymphoid cell lines. *Cell* 11:423-430.
- Breen KM, Billings HJ, Wagenmaker ER, Wessinger EW, Karsch FJ (2005) Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology* 146:2107-2115.
- Channing CP, Tsai V, Sachs D (1976) Role of insulin, thyroxin and cortisol in luteinization of porcine granulosa cells grown in chemically defined media. *Biol Reprod* 15:235-247.
- Dobson H, Alam MG, Kanchev LN (1987) Effect of betametasone treatment on luteal lifespan and the LH response to GnRH in dairy cows. *J Reprod Fertil* 80:25-30.
- Fateh M, Ben-Rafael Z, Benadiva CA, Mastroianni L Jr, Flickinger GL (1989) Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertil Steril* 51:538-541.
- Feng Z, Marti A, Jehn B, Altermatt HJ, Chicaiza G, Jaggi R (1995) Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J Cell Biol* 131:1095-1103.
- Giddings SJ, Young DA (1974) An *in vitro* effect of physiological levels of cortisol and related steroids on the structural integrity of the nucleus in rat thymic lymphocytes as measured by resistance to lysis. *J Steroid Biochem* 5:587-595.
- Hallahan C, Young DA, Munck A (1973) Time course of early events in the action of glucocorticoids on rat thymus cells *in vitro*. Synthesis and turnover of a hypothetical cortisol-induced protein inhibition of glucose metabolism and of a presumed ribonucleic acid. *J Biol Chem* 248:2922-2927.
- Hillier SG, Tetsuka M (1998) An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *J Reprod Immunol* 39:21-27.
- Hsueh AJ, Erickson GF (1978) Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 32:639-648.
- Huang TJ, Shirley Li P (2001) Dexamethasone inhibits luteinizing hormone-induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory

- follicles. *Biol Reprod* 64:163-170.
- Jarrett RJ (1965) Effects and mode of action of adrenocorticotrophic hormone upon the reproductive tract of the female mouse. *Endocrinology* 76:434-440.
- Kaiser N, Edelman IS (1977) Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:638-642.
- Kanchev LN, Dobson H, Ward WR, Fitzpatrick RJ (1976) Concentration of steroids in bovine peripheral plasma during the oestrous cycle and the effect of betamethasone treatment. *J Reprod Fertil* 48:341-345.
- Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K (2008) Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 78:888-895.
- Macfarlane MS, Breen KM, Sakurai H, Adams BM, Adams TE (2000) Effect of duration of in fusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Anim Reprod Sci* 63:167-175.
- McKay LI, Cidlowski JA (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20:435-459.
- Michael AE, Cooke BA (1994) A working hypothesis for the regulation of steroidogenesis and germ cell development in the gonads by glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD). *Mol Cell Endocrinol* 100:55-63.
- Michael AE, Thurston LM, Rae MT (2003) Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction* 126:425-441.
- Munck A (1968) Metabolic site and time course of cortisol action on glucose uptake, lactic acid output, and glucose 6-phosphate levels of rat thymus cells *in vitro*. *J Biol Chem* 243:1039-1042.
- Nordeen SK, Young DA (1976) Glucocorticoid action on rat thymic lymphocytes. Experiments utilizing adenosine to support cellular metabolism lead to a reassessment of catabolic hormone actions. *J Biol Chem* 251:7295-7303.
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345:1400-1408.
- Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I, Skarzynski DJ (2004) Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 71:2065-2071.
- Omura T, Morohashi K (1995) Gene regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:19-25.
- Pisetsky DS, Fairhurst AM (2007) The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity* 40:281-284.
- Sasson R, Amsterdam A (2003) Pleiotropic anti-apoptotic activity of glucocorticoids in ovarian follicular cells. *Biochem Pharmacol* 66:1393-1401.
- Schoonmaker JN, Erickson GF (1983) Glucocorticoid modulation of follicle-stimulating hormone-mediated granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 113(4):1356-1363.
- Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF (1982) Rat ovary glucocorticoid receptor: identification and characterization. *Steroids* 39:569-584.
- Shimojo M, Ricketts ML, Petrelli MD, Moradi P, Johnson GD, Bradwell AR, Hewison M, Howie AJ, Stewart PM (1997) Immunodetection of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human mineralocorticoid target tissues: evidence for nuclear localization. *Endocrinology* 138:1305-1311.
- Streeten DH, Anderson GH Jr, Dalakos TG, Seeley D, Mallov JS, Eusebio R, Sunderlin FS, Badawy SZ, King RB (1984) Normal and abnormal function of the hypothalamic-pituitary- adrenocortical system in man. *Endocr Rev* 5:371-394.
- Tetsuka M, Thomas FJ, Thomas MJ, Anderson RA, Mason JI, Hillier SG (1997) Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2006-2009.

Wang M (2005) The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the metabolic syndrome. *Nutr Metab* 2(1):3.

Whorwood CB, Franklyn JA, Sheppard MC, Stewart PM (1992) Tissue localization of 11 β -hydroxysteroid de-

hydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:21-28.

(received 9 November 2009, received in revised form 1 December 2009, accepted 4 December 2009)