

돼지 난소내 여포의 폐쇄과정중 과립세포의 결합능의 변화

한양대학교 자연과학대학 생물학과

장철수* · 이창주 · 윤용달 · 김문규

=Abstract=

Change of hCG Binding Capacity on the Granulosa Cell of Porcine Ovary During Follicular Atresia

Choul-Soo Chang*, Chang Joo Lee, Yong-Dal Yoon and Moon Kyoo Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133, Korea

In order to study the mechanism of follicular atresia, follicles were classified into the normal groups and the atretic ones, according to the criteria with or without corpus luteum, size of follicles, vascularization, status of granulosa cells and the hypertrophy of theca layers in the porcine ovary.

To estimate the binding capacity of human chorionic gonadotropin (hCG) receptor on the granulosa cells during atresia, hCG were iodinated by the chloramine-T method and then purified through the column chromatography.

The concentrations of hCG receptor in each group were measured by the hCG receptor binding assay. Binding capacity in large normal follicles were 1.16%, but atretic ones were 0.45%. But in medium and small follicles (below 6mm in diameter), the binding capacity in normal follicles were 0.09%, but atretic ones were 0.05%, which was lower than those of large follicles.

The present result suggests that the concentrations of hCG receptors on granulosa cells is decreased when the follicles become atretic and be used as a sort of criteria for the identification of follicular atresia.

서 론

포유동물의 난소내 여포는 생식주기 중 시상하부의 조절을 받는 뇌하수체의 생식소 자극 호르몬(gonadotropin hormone, GTH), 즉 luteinizing hormone(LH), 혹은 follicle-stimulating hormone(FSH) 등에 의해 극히 일부만이 성장하여 배란되고 대부분은 퇴화하거나 폐쇄되어 소멸된다(Byskov, 1978, 1979; Tsafiri and Braw, 1984). 이러한 폐쇄과정은 그에 따른 형태학적, 조직학적 연교에 의해 전 시기를 통해 일어날 수 있다고 보고되었다(Peters, 1969; Hage et al., 1978; Ryan, 1981; Tsafiri and Braw, 1984).

그러나 최근 정상여포와 폐쇄여포의 차이를 구별하는 방법이 연구되기 시작하였다. 폐쇄에 따른 기능적인 변화로는 스테로이드 합성의 불균형이 폐쇄

*김천보건전문대학 임상병리과

의 주요 원인으로 보고되고 있다. Lee and Yoon(1985). 배란 전 여포의 성장성숙 및 steroidogenesis는 과립세포의 Gonadotropin hormone의 반응성 변화에 따라 달라진다(Richards, 1980). 발정전기(proestrus)의 배란 전 여포는 LH surge에 의해 배란하고 이어 협막세포(theca cell) 및 과립세포(granulosa cell)가 황체화(luteinization)한다. FSH는 다음 발정기에서 배란될 여포 선택에 필요하며 이들 surge를 없애면 강소형성의 초기여포(early antral follicle)가 난소에서 폐쇄되며 FSH를 투여하면 다시 정상화한다. FSH는 초기 폐쇄를 억제하는 것으로 알려졌다(Peters et al., 1976; Hirshfield and Midgley, 1978). 그러므로 생식선자극호르몬수용체가 많은 여포는 생식선자극호르몬과 결합하여 성장하고 배란하여 수용체 수가 적은 여포는 폐쇄되는 것으로 보고되어 있다(Carson et al, 1979; Richards and Midgley, 1976).

폐쇄가 시작되는 기작에 대한 연구는 현저한 형

Text-Table 1. Classification of the follicles isolated from the porcine ovaries

Corpus luteum	Size	Follicular status	
		Normal	Atretic
Absent (NCL)	Small (S) <3mm	NCL-SN	NCL-SA
	Medium (M) 4-6	NCL-MN	NCL-MA
	Large (L) <7	NCL-LN	NCL-LA
Present (CL)	Small (S) <3mm	CL-SN	CL-SA
	Medium (M) 4-6	CL-MN	CL-MA
	Large (L) <7	CL-LN	CL-LA

Porcine follicles were classified according to with or without corpus luteum, size and the normal or atretic phase of the nuclei of porcine granulosa cells.

태적 변화가 일어난 후 폐쇄정도를 알게되므로 매우 어려운 상태에 있다. 따라서 본 실험은 여포의 육안적 관찰과 조직학적 관찰을 기준으로 폐쇄상태를 판별하고 여포의 성장과 폐쇄에 따른 과립세포 수용체 수의 변화 및 그 양상을 규명하기 위하여 행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

돼지 난소를 도살장(마장동, 우성농역주식회사)에서 도살직 후 채취하여 얼음상자에 4℃를 유지한 채 실험실로 운반하였다. 난소를 냉장실 (cold room)로 옮겨 한체의 유무에 따라 난소를 구분하고 개개의 여포를 크기별로 소 (small, 직경 <3mm), 중 (medium, 직경 4~6mm), 대 (large, 직경 >7mm) 로 구분하였다. 저배율 현미경 하에서 횡관분포가 뚜렷하고 여포액이 투명하며 과립세포층이 균일하게 분포되어 있으면 정상여포군 (normal follicle)으로 횡관분포가 불분명하고 여포액이 불투명하며 과립세포층이 불균일한 경우를 폐쇄여포군 (atretic follicle)으로 일차적으로 구분하였다.

또한 조직학적 관찰을 위해 일차적으로 구분된 여포를 냉동절편기 (Histostat, American Optical, model 1950)에 이용하여 여포를 10μm의 두께로 조직 절편을 만들었다. Slide에 부착된 조직을 absolute alcohol과 diethyl ether의 혼합액(1:1, V/V)에 30분간 고정시켰다. 조직학적 염색을 위하여 무수알콜로 30초간 처리한 후 50% ethyl alcohol까지 연속적으로 10초 간격으로 처리하여 수화 (hydration)시켰다. 핵은 hematoxylin으로 3분간 염색시키고 과잉의 hematoxylin을 증류수로 제거한 후 세포질은 eosin으로 염색하였다. 수화과정의 역순으로 탈수 (dehydration)한 후 xylene으로 2분간 3회에 걸쳐 청명 (clearing)시켰다. 그후 canada balsam을 이

용하여 봉입 (mounting)하여 영구 조직 표본을 제작하였다. 완성된 조직 표본을 저배율 (100×)로 검경하여 힘막세포층 (theca layer)과 과립세포 (granulosa cell)가 균일하게 분포되어 있고 핵의 염색질이 균일한 것을 정상군으로 판정하였다. 그리고 과립세포의 핵이 응축되어 있거나 불규칙하게 배열 또는 힘막세포와 과립세포층의 연결이 파괴된 여포를 폐쇄군으로 분리하였다. 여포 중 정상 및 폐쇄의 구별이 불분명한 것은 판정 대상에서 포함시키지 아니하였다. 위의 결과들을 토대로 각각의 여포는 12군별로 구분하였다 (Text-Table 1).

판정된 여포는 각군별 과립세포의 hCG 수용체수를 측정하고자 disposable plastic syringe (23 Gauge, Taiyang Co, Seoul)를 여포에 찔러 넣고 여포액을 뱀나 밀어 넣는것을 3회 이상 반복하여 여포액과 과립세포를 시험관 (12×75mm, Pyrex)에 옮기고 4℃ 500×g에서 10분간 원심분리 시켰다 (Minifuge GL, Heraeus Christ). 과립세포가 함유된 침전물에 pH 7.5로 조절된 Medium TC-199 (TC-199, HEPES, 5mM, fetal calf serum, 4%, NaHCO₃, 1.1g)을 가해 재현탁시킨 후 이를 hemocytometer (Neubauer)에 넣어 과립세포수를 측정하여 10⁷ cells/ml 되게 조절하였다.

2. Human chorionic gonadotropin과 radioiodination

인산완충액 (0.1M 완충액 I, pH 7.5)을 조제하기 위해 Na₂HPO₄·2H₂O 46.4g과 NaH₂PO₄·H₂O 5.644g을 증류수 1l에 용해하였다. 0.03M인산완충액 (완충액 II, pH 7.5)은 완충액 I을 증류수로 10배 희석한 후 bovine serum albumin (Fisher) 0.5%를 첨가하였으며 0.01M 인산완충액 (완충액 III, pH 7.5)은 완충액 II를 증류수로 희석하여 조제하였다. 표지용 호르몬으로 매우 순수하게 정제된 hCG (Organon, 5000 IEP/8mg)를 사용하였다. 방사능

Table 1. The labelling yield of ¹²⁵I to human chorionic gonadotropin

Reaction time (MIN)	Counting time (MIN)	Total CPM	Bound CPM	Labelling yield (%)
1	1	304,088	103,998	34.2
3	1	969,579	473,154	48.8
5	1	708,102	349,094	49.3
10	1	856,005	453,692	53.0

The radioiodination was carried out by a modified chloramine-T method of Hunter and Greenwood(1962). The labelling yield was calculated by counting the radioactivity of 1 μl bound form precipitated by 20% TCA.

물질로는 영국의 Radiochemical Center의 Amersham의 제품을 이용하였다. 표지용 산화제로는 chloramine-T 20mg을 완충액 III 100ml에 녹여 사용하였으며 환원제는 실험때 마다 Na₂S₂O₅ 70mg을 완충액 III 100ml에 녹여 사용하였다.

hCG의 ¹²⁵I 표지에는 산화제를 이용한 chloramine-T법 (Hunter and Greenwood, 1962)을 변형하여 실시하였다. 먼저 polypropylene minivial (5×5×15mm)에 인산완충액 II 10μl에 고순도의 hCG 10μg, ¹²⁵I 0.5mCi, chloramine-T 2μg, 각각 10μl를 넣고 잘 섞어 실온에서 10분간 반응시킨 후 여기에 sodium metabisulfite 7μg을 넣어 반응을중지시켰다. 이 반응액을 column으로 옮겨 chromatography 방법으로 ¹²⁵I-hCG를 정제하였다. 표지율 (labelling yield)을 계산하기 위해 단위 시간에 약 1μl의 반응액을 완충액 II 1ml에 옮긴 후 총 방사능 (total radioactivity)을 측정하였다. 여기에 20% Trichloroacetic acid 1ml를 가해 1,000×g에서 10분간 원침하여 상층액 (free form)을 제거하고 표지된 ¹²⁵I-hCG (bound form)의 방사능을 측정하였다. 표지 백

Table 2. Maximum binding capacity of the purified hCG to beta hCG antibody using column chromatography

Fraction No.	Total CPM	Bound CPM	B/T (%)
14	10,871	152	1.4
15	12,037	144	1.2
16	11,444	298	2.6
17	10,298	4,115	40.0
18	10,125	4,253	42.0
19	10,020	4,909	49.0
20	10,187	5,501	54.0
21	10,307	1,958	19.0
22	11,098	266	2.4
23	11,010	132	1.2
24	11,163	178	1.6
25	10,008	110	1.1

분율은 ¹²⁵I-hCG/hCG/total radioactivity×100으로 계산하였다.

¹²⁵I로 표지된 hCG를 정제하기 위해 냉장실에서 Ultrogel AcA 44 (Pharmacia)의 column (16×300mm, Pharmacia)으로 chromatography를 수행하였다. 이때 유출액 (분획채취기 fraction collector, LKB product, model 2112)로 완충액 II 50μl가 들어있는 plastic tube에 한 방울당 20초의 속도로 1ml씩을 채취하였다. 유출액은 액체 섬광계수기 (liquid scintillation counter, packard, Tri-Carb scintillation spectrophotometer, model 4420, counting efficiency: 57%)로 방사능을 측정하여 표지 hCG의 작분획을 얻었다.

3. 감마선 방사능 품질 측정

감마선 방사능의 측정용 액체섬광계수기로 실험하였다. 베타선 측정용 scintillation solution을 제조하기 위해 2,5-diphenylhexazul 22.5μg을 1l의 toluene에 용해한 후 Triton X-100 1.5l를 가했다. 조제한 scintillation solution 5ml를 표준 glass counting vial (20ml 용)에 넣은 후 40% ZnO, 5ml를 가해 혼합하여 glass insert vial을 삽입하였다. 여기에 감마선을 방출하는 시료가 들어있는 시험관을 넣어 액체섬광계수기로 측정하고 동일한 시료를 다시 γ-counter (Abbot Co, USA, ANSR RE-1454, No 71572)로 측정하여 상관관계를 구하였다.

4. hCG의 방사면역 측정

표지된 hCG의 최고결합능 (maximum binding capacity)을 알아보기 위해 표지된 hCG를 tracer로 사용하고 Amerlex β-hCG RIA kit (Amersham)의 이중항체법 (second antibody method)을 이용하여 항체와의 결합능을 알아보았다. 표준시료로서 β-hCG의 농도 0, 4, 10, 25, 50, 100, 200, 400 mIU/ml 용액 100μl씩을 anti β-hCG serum 100μl를 가한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 여기에 tracer를 100μl당 10,000 CPM이 되도록 혼합한 후 항온수조에서 다시 45분동안 반응시켰다. 여기에

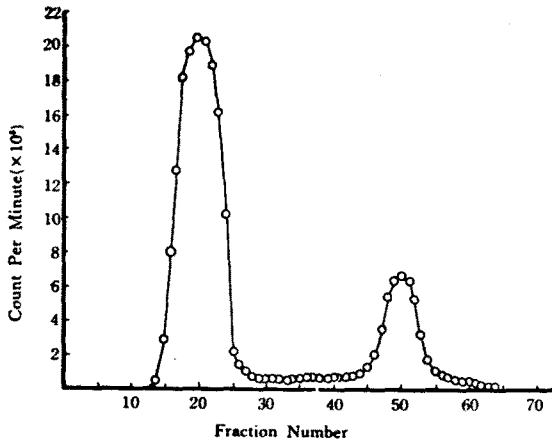


Fig. 1. Elution pattern of radioiodinated human chorionic gonadotropin using column chromatography. Human chorionic gonadotropin was iodinated using chloramine-T by a modified method of Hunter and Greenwood (1962). Radioiodinated hCG was purified through Aca 44 column by eluting with 0.03 M Sodium phosphate buffer. 50 ul of each fraction (1 ml) was counted using a scintillation spectrophotometer by a developed method in the present study.

second antibody 1ml를 가해 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 원심분리기를 이용하여 1,500 × g 에서 30분동안 원침 후 침전물을 액체섬광계수로 방사능을 측정하였다.

5. hCG 수용체 수의 측정

과립세포의 hCG 수용체 수를 측정하기 위해 과립세포 (10⁶ cells/ml) 100μl에 표시된 ¹²⁵I-hCG의 총 방사능은 각각 40,000, 25,000, 1,000, 2,000 CPM 되게 섞은 후 500μl 되게 Medium TC-199을 가했다. NSB는 과립세포 100μl에 cold hCG 5μg, 100μl를 가해 포화시킨 후 항온수조에서 3시간 반응시켰다. 반응 후 Medium TC-199 1ml씩을 가해 원심 분리 (500 × g, 10 mins, 4°C)하여 상층액을 제거하고 침전물의 방사능을 측정하였다.

결 과

Radioiodination시 Chloramine-T를 이용해 표시되는 ¹²⁵I-hCG의 표지율은 반응 시간에 따라 다르게 나타났는데 이때 표지백분율을 table 1에 나타내었다. hCG와 ¹²⁵I의 결합은 chloramine-T를 첨가한 후 5분 내에 40.3%로 모든 반응이 일어났으며 그후 10분까지 반응증가는 낮아졌다.

표지된 hCG를 순수 분리하기 위해 chromatog-

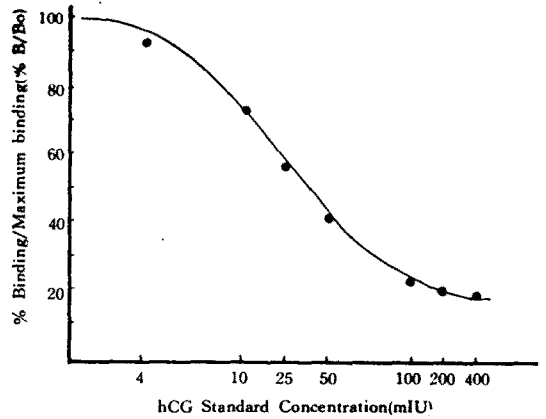


Fig. 2. Standard dose response curve for hCG radioimmunoassay using radioiodinated hCG. The RIA was carried out using all reagents of β-hCG Kit (Amerlex, Amersham) except the radioiodinated tracer.

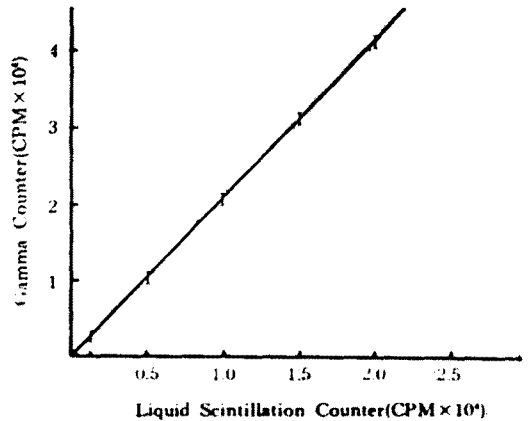


Fig. 3. Relationship between counting efficiency with gammacounter and that in liquid scintillation counter. The radioactivity of ¹²⁵I gamma ray was determined using a liquid scintillation counter by a developed method in the present study.

raphy 한 결과를 Fig. 1에 표시하였다. Elution pattern에서 2개의 peak가 나타났으며 첫번째 peak는 (15~25분획) 표시된 hCG peak (bound form)이었으며 두번째 peak는 hormone에 결합되지 않은 inorganic ¹²⁵I (free form)으로 확인되었다. 이때 bound form은 전체 Na-¹²⁵I의 78.8%이었다.

각 분획의 표지 hCG의 순수도를 알아보기 위해 각분획을 선택하여 각각의 ¹²⁵I-hCG를 β-hCG의 항체와 결합시켜 그 최고 결합능을 측정하여 table 2에 나타내었다. column chromatography 실시 중 17분획에서부터 표시된 hCG가 급격히 증가하여 20분획에서 가장 높은 결합 능력을 보였고 16분획 이

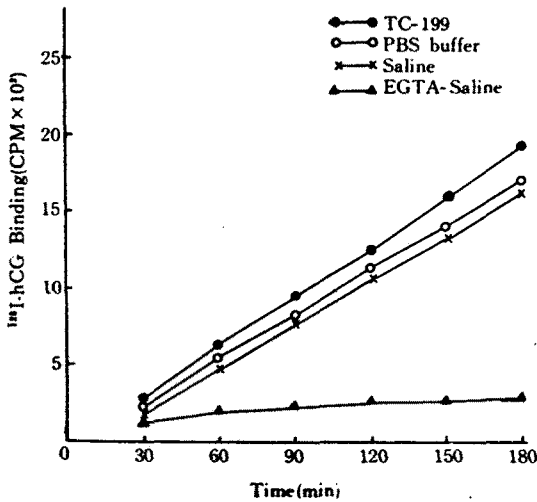


Fig. 4. Comparison of total bindings in incubation media for hCG receptor binding to porcine granulosa cells.

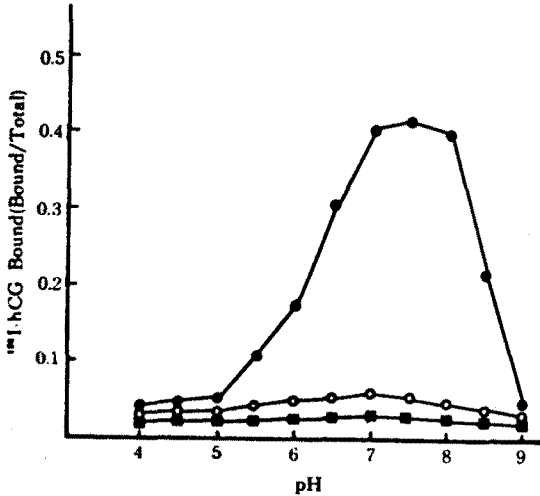


Fig. 5. Effect of pH on the binding of ¹²⁵I-hCG to porcine granulosa cell receptor. Total binding (●-●), non specific binding (○-○) and background (■-■). Incubation time was 3 hours at 37°C.

전 및 22분획 이후에서는 거의 결합력이 없었다. 그러므로 17, 18, 19, 20분획을 합하여 -60°C deep freezer에 보관하였다가 필요시 사용하였다.

또한 이들을 이용하여 hCG 각 표준액의 농도에 따른 표준곡선 (standard curve)을 작성하였다 (Fig. 2). 이 결과 B/Bo는 4mIU/ml β-hCG 존재하에서는 90.8%, 200mIU/ml β-hCG에서는 20.3%의 최대 억제 효과를 나타내었다.

방사능 물질을 측정하기 위해 ¹²⁵I-hCG가 0.2~1×40⁴ CPM이 들어있는 시료를 액체섬광계수기 및

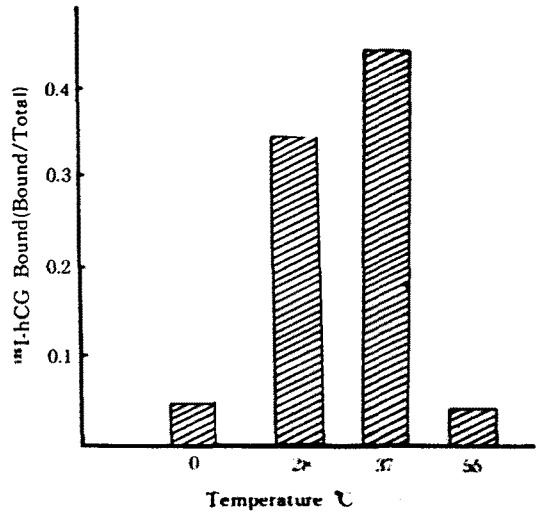


Fig. 6. The effect of temperature on binding of ¹²⁵I-hCG to porcine granulosa cells.

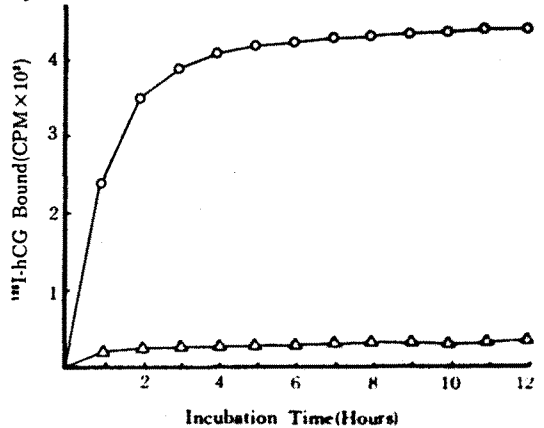


Fig. 7. The effect of incubation time upon binding of ¹²⁵I-hCG to granulosa cells harvested from porcine large follicles. Results are expressed for 1 x 10⁶ cells as mean CPM bound with amount 10,000 CPM of ¹²⁵I-hCG.

감마계측기로 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. β-counter로 이용했을 경우 γ-counter에 비해 약50%의 측정효율을 나타내었다. 또한 위의 농도 구간에서 상호 직선에 가까운 값을 나타내어 β-counter로 감마선 방사능의 측정이 가능함을 알 수 있었다.

과립세포의 hCG 수용체수를 측정할 때 최적의 media를 얻고자 동일량의 tracer와 과립세포 (1×10⁶ cells/tube)를 media에 넣고 반응시킨 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 사용된 media로는 0.3M 인산완충액, 0.85% 생리식염수 EGTA-Saline, Medium TC-199을 사용하였다. EGTA-Saline을 media로 쓴 경우를 제외하고 결합능은 180분까지 시

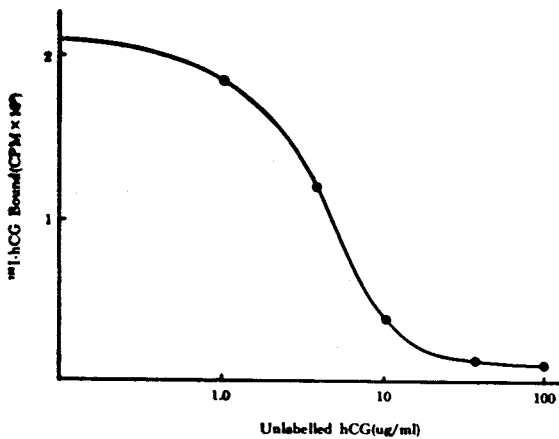


Fig. 8. Competition between labeled and unlabeled hCG for binding site on granulosa cells. Granulosa cells that had been incubated for 3 hours were exposed to ^{125}I -hCG in the presence of the indicated concentrations of unlabeled hormone.

간이 경과함에 따라 증가하였다. 180분에서 EGTA-Saline의 경우 Medium TC-199의 13%, 인산완충액은 86.8%, Saline은 84.2%의 결합율을 나타내었다. 그러므로 이후의 황체자극호르몬 수용체수의 측정은 Medium TC-199으로 사용하였다.

pH가 hCG 수용체에 결합하는 능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Medium TC-199의 pH를 4~9까지 달리했을 때 결합능의 변화물 Fig. 5에 나타내었다. pH 7이하의 산성 및 pH 8.5 이상의 알카리에서는 급격한 변이를 보였으며 pH 7~8 사이에서 높은 결합능을 보였다.

과립세포의 hCG 수용체의 결합이 배양온도에 의한 영향을 알아보기 위하여 배양온도를 0, 26, 37, 55°C의 4단계로 변화시킨 결과물 Fig. 6에 나타내었다. 표지된 ^{125}I -hCG와 hCG 수용체와의 결합능은 37°C일 때 최고의 결합능을 보였다.

반응시간에 따른 결합능을 알아보기 위해 대여포의 과립세포를 (1×10^6 cells/100 μl) Medium TC-199 300 μl 에 넣고 tracer (10,000 CPM/100 μl)를 가해 37°C에서 반응시킨 후 반응시간에 따른 결합능을 Fig. 7에 나타내었다. 처음 반응시간 2시간내 총 결합능의 85% 이상으로 증가하였고 그 이후에는 완만하게 증가하였다.

^{125}I -hCG가 hCG 수용체와의 결합을 억제하기 위하여 non specific binding (NSB)을 측정하고자 (Fig. 8) cold hCG를 희석하여 1000, 100, 10, 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 한 후 이들 100 μl 와 tracer (10,000 CPM/100 μl), 과립세포 (1×10^6 cells/ μl), Medium TC-199 300 μl 를 37°C, 3시간 반응시켰다. 이때 hCG 수용체에 대한 cold hCG 농도가 0.1 μg 에서는 85.7%, 1

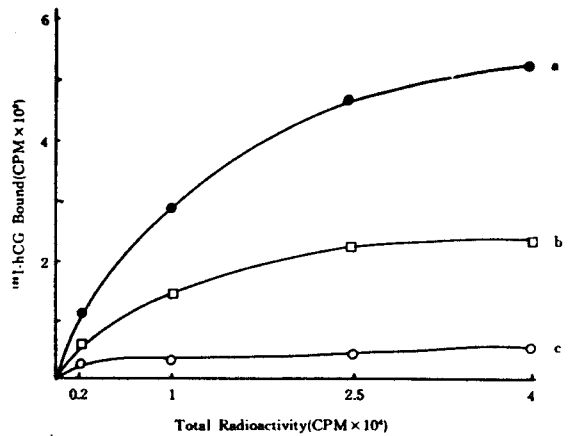


Fig. 9. Binding of ^{125}I -hCG to granulosa cells harvested from the large follicles (above 7mm in diameter) of the porcine ovaries without corpus luteum. a: normal follicles, b: atretic follicles, c: non-specific binding.

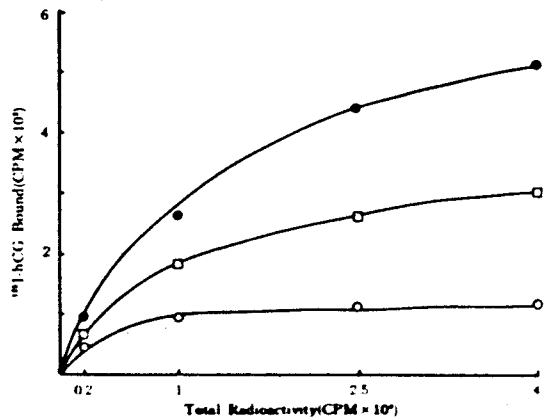


Fig. 10. Binding of ^{125}I -hCG to granulosa cells harvested from the medium follicles (4~6mm in diameter) of the porcine ovaries without corpus luteum.

μg 에서는 57.1%, 10 μg 에서는 14.4%, 100 μg 에서는 7.2%, 1,000 μg 에서는 6.9%로 10 μg 이상의 농도에서는 ^{125}I -hCG 결합능을 억제하였다 (Fig. 8).

위의 결과들을 종합하여 최적의 hCG 수용체 측정방법을 정한 후 각군별 과립세포의 수용체수의 농도를 측정하였다. 황체가 없는 난소의 정상 및 폐쇄로 판정된 대여포에서 hCG 수용체의 변화를 측정한 바 최고결합능은 Fig. 9에 나타내었다. 정상 여포에서는 1.16% 퇴화여포에서는 0.46%의 결합능을 보였다. 황체가 없는 난소의 중여포에서 정상 및 폐쇄여포의 최고결합능은 Fig. 10에 나타내었다. 측정된 총 결합능은 정상 및 폐쇄여포에서 각각 0.09%, 0.05%이었다. 이는 대여포보다 급격한 감소를 나타내었다. 황체가 없는 난소의 소여포에

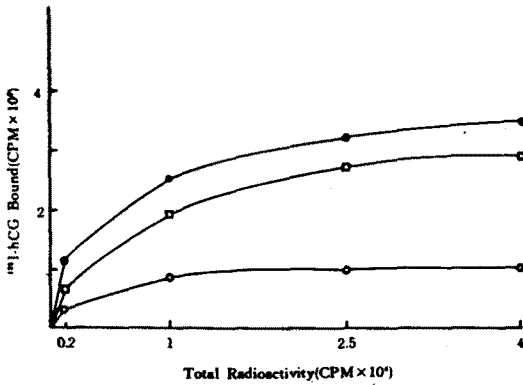


Fig. 11. Binding of ^{125}I -hCG to granulosa cells harvested from the small follicles (below 3mm in diameter) of the porcine ovaries without corpus luteum.

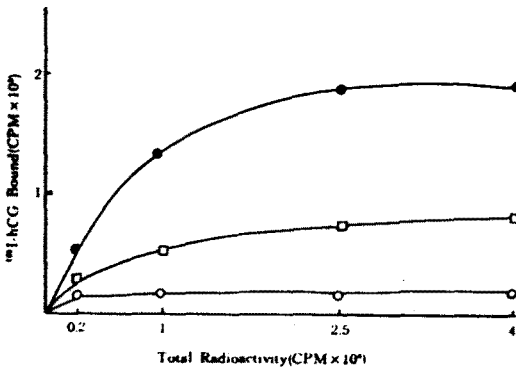


Fig. 12. Binding of ^{125}I -hCG to granulosa cells harvested from the large follicles (above 7mm in diameter) of the porcine ovaries with corpus luteum.

서 정상 및 폐쇄여포의 최고결합능은 Fig. 11에 나타내었다. 측정된 총 결합능은 정상 및 폐쇄여포에서 각각 0.06%, 0.05%이었다. 이는 대여포보다는 급격히 감소하였으나 중, 소여포에서는 커다란 차이를 보이지 아니하였다.

황체가 있는 난소의 대여포에서 정상 및 폐쇄여포의 최고결합능은 Fig. 12에 나타내었다. 측정된 총 방사능은 정상 및 폐쇄여포에서 각각 0.43%, 0.15%였다. 이는 황체가 없는 대여포보다는 낮은 결합능을 보였다. 황체가 있는 난소의 중여포에서 정상 및 폐쇄여포의 최고결합능은 Fig. 13에 나타내었다. 측정된 총 결합능은 정상 및 폐쇄여포에서 각각 0.08%, 0.03%이었다. 또한 황체가 있는 난소의 소여포에서 정상 및 폐쇄여포의 최고결합능은 Fig. 14에 나타내었다. 측정된 총 결합능은 각각 0.05%, 0.04%이었다.

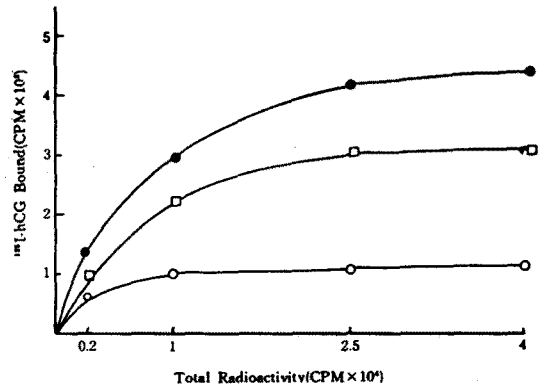


Fig. 13. Binding of ^{125}I -hCG to granulosa cells harvested from the medium follicles (4~6mm in diameter) of the porcine ovaries with corpus luteum.

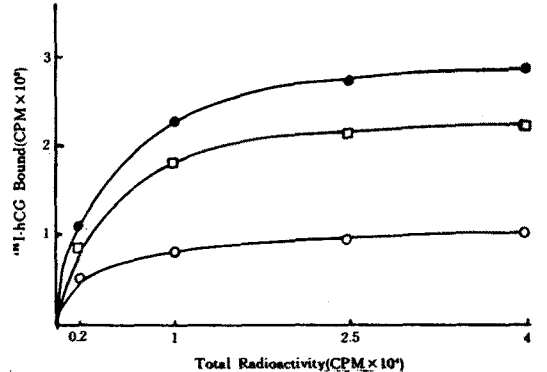


Fig. 14. Binding of ^{125}I -hCG to granulosa cells harvested from the small follicles (below 3mm in diameter) of the porcine ovaries with corpus luteum.

논 의

hCG의 표지법에는 Chloramine-T, lactoperoxidase, acylating agent (Hunter and Greenwood, 1962; Midgley, 1966; Yukitaka et al., 1972; Bolton and Greenwood, 1973; Cho et al., 1981)등을 사용하는 여러방법이 개발되어 있으나, 냉장온도에서 30초~1분간인 짧은 시간에 반응시키는 Hunter and Greenwood(1962)의 Chloramine-T법이 주로 사용되고 있다. 그러나 이 방법은 균일한 표지가 어려운 단점을 보완하고자 실온에서 10분간 반응시키고 표지된 tracer를 순수도가 높은 β -hCG의 황체와 결합시킨 결과 42.4%의 maximum binding을 나타내었다.

일반적으로 방사면역측정법에서 감도(sensitivity)를 높이기 위하여 ^{125}I 등 감마선으로 표지하는 방법을 사용하고 있다. 그러나 일반적인 실험실에서 감마선의 측정을 위한 고가의 측정기를 갖추어야 하

는 문제점을 해결하고자 본 실험에서는 특수한 counting vial을 만들고 ^{125}I 의 감마선을 측정하기 위하여 액체섬광계수기를 energy level로 설정하여 감마선 방사능의 약 50% 정도의 방사능을 측정하였다. 그러므로 본 실험에 사용한 counting vial을 액체섬광계수기에 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

본 실험 중 hCG 수용체 측정에 Medium TC-199가 가장 좋은 maximum binding capacity를 나타내었다. 일반적으로 과립세포를 분리하기 위하여 Ca^{2+} Chelating agent인 EGTA를 사용하여 왔으나 EGTA-Saline에서는 hCG가 과립세포에 결합하는 것이 현저히 억제되는 것으로 보아 소량의 Ca^{2+} 이 반응에 필요한 것으로 사료된다. 또한 pH, 온도, 반응시간 등 적절한 반응조건이 hCG가 과립세포의 수용체와 결합하는데 주요한 요인이 다시 확인되었다.

hCG는 α, β -subunits를 가지며 분자량이 약 40,000인 glycoprotein hormone이다. α -subunit는 LH, FSH 및 TSH의 amino acid 서열과 매우 유사하여 β -subunit는 LH의 amino acid 서열과 거의 일치하는 것으로 알려져 왔다 (Carlson et al., 1973). 그러므로 hCG와 LH는 매우 유사한 생물학적 작용을 나타내어 LH의 기능 평가에 hCG가 사용되고 있다.

Falck(1959년)의 2세포 합작설(two cell theory)에 의하면 협막세포는 LH에 의해 androgen을 생성하고 과립세포로 수송되어 FSH에 유도되는 aromatizing enzyme에 의해 estrogen으로 전환된다고 보고하고 있다 (Makris and Ryan, 1980; Erickson and Ryan, 1975, 1976; Fortune and Armstrong, 1977; Ryan, 1981). 이러한 androgen이 estrogen으로 전환되지 못하고 과량의 androgen이 폐쇄인자로 밝혀져 steroidogenesis의 변화가 여포의 성장 성숙 및 폐쇄의 주요 요인으로 알려져 있다 (Tsafiriri and Braw, 1984). 또한 혈중 hCG의 변화에 따라 맥락세포는 LH 수용체를 가지며 소여포 및 대부분의 과립세포는 FSH 수용체를 갖는다. 또 과립세포의 LH 수용체는 감소형성후 대여포에 존재한다 (Channing and Kammerman, 1973; Kammerman and Ross, 1975; Nakano et al., 1975; Channing, 1977; Channing and Tsafiriri, 1977). 그러므로 과립세포의 LH 수용체의 생성이 여포의 발달에 주요요인으로 생각되고 있다. 이들 GTH 수용체의 수는 폐쇄 초기에는 감소되지 않지만 그러나 폐쇄가 진행됨에 따라 현저히 감소한다고 보고되었다 (Carson et al., 1979; Braw et al., 1981). 또한 과립세포의 GTH 수용체의 감소로 aromatase의 활성도가 감소되어 andro-

gen 합성이 증가하고 estrogen이 감소되어 폐쇄가 진행되는 것으로 알려지고 있다. 그러므로 gonadotropin의 수용체 변이 또한 폐쇄의 주요 요인으로 생각되고 있다.

뇌하수체를 제거한 미성숙 흰쥐에서 estrogen과 FSH는 과립세포의 증식을 일으키나 두 호르몬의 작용 기작은 다르다고 보고되었다 (Rao et al., 1977). 즉 estrogen 단독으로는 과립세포의 GTH 수용체를 증가시키지 않지만 estrogen을 주고 FSH를 주면 과립세포의 FSH 및 LH 수용체 수가 증가한다 (Richards et al., 1976). LH 역시 초기 여포의 성장에 중요한 역할을 한다. 혈청 LH가 증가하면 소여포의 성숙이 일어나고 여기에 progerterone을 증가시키면 LH 효과는 증가한다. LH의 작용은 협막세포의 분화 (theca cell differentiation)를 자극하고 androgen의 합성을 증가시킨다고 보고되었다. 그러므로 위의 결과들을 종합해 볼 때 배란여포의 생성은 LH, FSH, steroids들의 균형에 의해 생기고 이것이 파괴되면 여포의 성장시기 어느 단계에서 폐쇄가 일어나는 것으로 보고되고 있다 (Peters et al., 1975).

본 실험에서도 과립세포의 hCG 수용체는 소여포군에 비하여 대여포에서는 현저히 증가되었다. 또한 각군의 소, 중, 대여포에서 여포가 폐쇄되면 수용체수가 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 그러나 LH의 수용체는 소, 중여포 사이에는 별다른 양식 차이를 나타내지 않았고, 여포의 크기가 커짐에 따라 과립세포의 수가 증가하는 양만큼만 증가하는 것으로 사료된다. 그러므로 폐쇄된 소, 중여포의 수용체 수의 감소는 gonadotropin, steroids 등의 영향으로 과립세포의 수가 감소된 때문으로 사료된다.

한편 흰쥐나 생쥐 등 소동물을 재료로 하거나 사람을 재료로 한 많은 연구들 (Tsafiriri and Braw, 1984)이 대부분 황체가 없는 여포기의 과립세포를 대상으로 연구되어져 왔다. 본 연구에서 황체가 있는 황체기의 난소내 정상 대여포군의 hCG 수용체가 여포기의 것에 비하여 현저히 낮은 것은 서로간의 호르몬에 대한 결합능에 차이가 있는 때문으로 사료된다. 즉 LH에 대한 responsiveness가 다를 것으로 사료된다. 황체가 있는 정상 대여포에서 과립세포의 hCG 결합이 여포의 폐쇄 대여포내 결합과 같은 한편 황체기의 대여포가 폐쇄시에는 $\frac{1}{3}$ 수준으로 결합능이 떨어지는 것이 관찰되었다. 그러므로 황체기와 여포기의 여포 폐쇄기작은 서로 차이점이 있을 것으로 사료된다.

그러나 아직도 난소내의 여포 성장성숙기작과 폐

폐쇄발에 대한 연구는 시작 단계에 있다. 그러므로 폐쇄현상이 일어나는 기본 기작은 폐쇄 현상을 유도하여 정확한 폐쇄정도를 만들어 연구하거나 여포의 폐쇄정도를 조직학적으로 정확히 판정하여 그에 따른 세포학적, 내분비학적, 생화학적, 기능의 연관관계를 연구해야 한다고 사료된다.

REFERENCES

- Bolton, A.E. and Greenwood, F.C.: *The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugations to proteins to a ¹²⁵I-containing Acylating Agent.* *Biochem. J.* 133 : 529-539, 1973.
- Braw, R.H., Bar-Ami, S. and Tsafiriri, A.: *Effect of hypophysectomy on atresia of rat preovulatory follicles.* *Biol. Reprod.* 25 : 989-996, 1981.
- Byskov, A.G.: *Follicular atresia.* In: *The Vertebrate Ovary (ed.) R.E. Jones, New York: Plenum, pp. 533-562, 1978.*
- Byskov, A.G.: *Atresia.* In: *Ovarian Follicular Development and Function (ed.) A.R. Midgley and W.A. Sadler, New York: Plenum, pp. 41-58, 1979.*
- Carlsen, R.B., Bahl, O.P. and Swamiriathan, N.: *Human chorionic gonadotropin; linear amino acid sequence of the subunit.* *J. Biol. Chem.* 248 : 6810-6827, 1973.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Burger, H.G. and Trounson, A.O.: *Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia.* *Biol. Reprod.* 21 : 75-87, 1979.
- Channing, C.P.: *Follicle stimulating hormone stimulation of ¹²⁵I-human chorionic gonadotropin binding in porcine granulosa cell culture.* *Biol. Med.* 149 : 238-241, 1977.
- Channing, C.P. and Tsafiriri, A.: *Mechanism of action of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the ovary in vitro.* *Metabolism* 16 : 413-468, 1977.
- Channing, C.P. and Kammerman B.: *Characteristics of GTH receptors of porcine granulosa cells during follicle maturation.* *Endocrinology* 92 : 531-540, 1973.
- Cho, B.Y., Kim, B.K. and Koh, C.S.: *A study on radiolabelling method in radioimmunoassay.* *J. Nuclear Med.* 17 : 177-183, 1981.
- Erickson, G.F. and Ryan, K.J.: *The effect of LH FSH, dibutyryl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of estrogens by rabbit granulosa cells in vitro.* *Endocrinology* 97 : 108-113, 1975.
- Falck, B.: *Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants.* *Acta Physiol. Scand.* 47, suppl. 163 : 1-100, 1959.
- Fortune, J.E. and Armstrong, D.T.: *Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles.* *Endocrinology* 100:1341-1347, 1977.
- Hage, A.J., Groen-Klevant, A.C. and Welschen, R.: *Follicle growth in immature rat ovary.* *Acta Endocr. Copenh* 88:375-382, 1978.
- Hay, M.F., Cran, D.G. and Moor, R.M.: *Structural change occurring during atresia in sheep ovarian follicles.* *Cell Tissue Res.* 169 : 515-529, 1976.
- Hirshfield, A.N. and Midgley A.R. : *The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat.* *Biol. Reprod.* 19 : 601-621, 1978.
- Hunter, H.M. and Greenwood F.G.: *Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.* *Nature* 194:495, 1962.
- Kammerman, S. and Ross, G.T. : *Increase in numbers of gonadotropin receptors on granulosa cells during follicle maturation.* *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41 : 546-550, 1975.
- Lee, Y.K. and Yoon, Y.D. : *Change of the concentrations of steroid hormones in the porcine follicular fluid on atresia.* *The Kor. J. Fertil. Steril.* 12 : 8398, 1985.
- Makris, A. and Ryan, J.K. : *The source of follicular androgens in the hamster follicle.* *Steroids* 35 : 53-64, 1980.
- Midgley, A.R. : *Radioimmunoassay. A method for human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone.* *Endocrinology* 39 : 10-28, 1966.
- Nakano, R., Mixumo, T., Katayama, K. and Tojo, S.: *Growth of ovarian follicles in the absence of gonadotrophins.* *J. Reprod. Fert.* 45 : 545-546, 1975.
- Peters, H.: *The development of the mouse ovary from birth to maturity.* *Acta Endocr. Copenh* 62 : 98-116, 1969.

- Peters, H., Byskov, A.G., Himelstein-Braw, R. and Faber, M.: *Follicle growth: the basic event in the mouse and human ovary. J. Reprod. Fert.* 45:559-566, 1975.
- Rao, M.C., Richards, J.S., Midgley, JR. A.R. and Reichert JR. L.E.: *Regulation of gonadotropin receptors by luteinizing hormone in granulosa cells. Endocrinology* 101 : 512-523, 1977.
- Richards, J.S. and Midgley, A.R., JR.: *Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal development. Biol. Reprod.* 14 : 82-94, 1976.
- Richards, J.S., Ireland, J.J., Rao, M.C., Bernath, G. A., Midgley, A.R. and Reichert, L.E.: *Ovarian follicular development in the rat: Hormone regulation by E₂, FSH and LH. Endocrinology,* 99 : 1562-1570, 1976.
- Richards, J.S.: *Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. Physiol. Rev.* 60 : 51-89, 1980.
- Ryan, R.J.: *Follicular atresia. Some speculations on biochemical markers and mechanism. In: Dynamics of Ovarian Function.(eds.) N.B. Schwartz and M. Hunzicker-Dunn. Raven Press, New York pp. 1-11, 1981.*
- Tsafrifi, A. and Braw, R.H.: *Experimental approaches to atresia in mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology. Vol. 6, pp. 226-265, Oxford University Press, 1984.*
- Yukitaka, M., Vaitukaitis, J.L., Nieschlag, E. and Lipsett, M.B.: *Enzymatic radioiodination of gonadotropins. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34 : 23-32, 1972.
-