

폐쇄에 따른 돼지 여포액내 단백질의 전기영동 양상에 관한 연구

한양대학교 자연과학대학 생물학과

김종흠 · 윤용달 · 김문규

— Abstract —

A Study on the Pattern of Proteins on Electrophoresis in the Porcine Follicular Fluid During Atresia

Jong Heup Kim, Yong-Dal Yoon and Moon Kyo Kim

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

This experiment has been done to evaluate the relationship between the follicular atresia and the protein patterns on electrophoresis of the follicular fluids in porcine ovary.

The protein concentration of the follicular fluids was lower than that of serum, and gradually decreased as the follicle size became larger.

The number of protein bands of follicular fluid on electrophoresis was less than that of serum, and gradually increased as follicle size became larger. Three specific bands were detected on disc PAGE and one band (M. W. 75,000) on SDS PAGE in the follicular fluids, while not in serum. One band (A) at β -globulin region on disc PAGE became heavier, as follicles became atretic. Two bands less than (M.W. 20,000) were detected only in the large follicular fluid. Another band (M.W. 43,000) was not detected in necrotic group, whereas all other groups showed it.

It could be concluded that the component and composition of the proteins in porcine follicular fluids changes according to the follicular size during atresia. Therefore, detection of the changing pattern of proteins in the follicular fluid can be used as a basic criterion for the identification of the follicular atretic stage.

서 론

포유류의 난소내 여포는 극히 일부만이 성숙하여 배란하게 되고 대부분은 난자를 배란하지 않는 폐쇄여포(atretic follicle)로 된다(Ridchard 1980, review).

여포의 폐쇄정도는 여포내 난자의 괴사정도, 난자를 싸고 있는 난구세포의 형태, 과립세포의 핵내 염색질의 이상응축, 그리고 협막세포층의 이상비대 및 섬유화등을 기준으로 삼아 판정하였다(Wallach and Noriega, 1970; Bill and Greenwald, 1981; Ryan, 1981). Byskov (1977) Peluso 등(1977) 그리고 Tsafiri와 Braw(1984) 등은 쥐의 난소내 여포의 폐쇄과정을 첫째, 과립세포 중에서 핵내 염색질 이상응축이 일어난 것이 5~20%이고 여포액내 백혈구

가 없는 상태, 둘째, 백혈구가 여포내에 침투해 있는 상태, 셋째, 백혈구가 여포내에 침투해 있고 기저막이 파괴된 상태 등 3단계로 구분하였다. Braw 등(1976)은 사람을 포함한 포유동물의 난자는 과립세포의 핵내 염색질의 이상응축이 일어난 후에야 퇴화한다고 보고하였다.

한편, 여포액내 구성요소 중 단백질의 농도는 혈청의 70~80%라고 보고하였고(bovine: Desjardine, 1966; porcine: Pangan and Menge, 1971; human: Shalgi, 1973; Edward, 1974), 소의 여포액내 단백질 종류는 40여 가지라고 보고되었다(Anderson *et al.*, 1976). 또한 McGaughey(1975)는 돼지에서 여포액내 α -globulin의 전기영동 이동성이 대여포액의 것보다 소여포의 그것이 빠르다고 보고함으로써 여포의 크기에 따라 여포액내 단백질이 같지 않음을 시

사하였다.

위와같이 여포액과 폐쇄에 관한 보고는 많이 있으나 폐쇄의 전전상태와 여포액내 단백질과의 상관성에 관한 보고는 없었다. 따라서 본 실험은 난소내 여포의 폐쇄의 정도를 분류하고 그 정도에 따라 여포액내 단백질의 전기영동 양상을 분석하여 그 상관관계를 알아보고자 행하였다.

재료 및 방법

폐지의 난소를 도살장(서울, 마장동)에서 얻어 얼음상자(4°C)에 넣어 실험실로 운반한 즉시 난소내 여포는 날개로 적출하여 직경에 따라 소(3mm 이하), 중(4~6mm) 그리고 대(7mm 이상)로 구분하였다. 여포들의 일부는 조직학적인 관찰로 여포의 상태를 판별하기 위하여 Bouin 액으로 고정된 후 알코올로 탈수하여 파라핀에 포매하고 8 μ m의 두께로 잘라 HE 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 다른 여포들은 여포액내의 단백질분석을 위하여 저온냉동기(-70°C)에 급냉동시킨 후 여포의 일부분을 냉동절편기(Histostat, AO. model 975C)로 10 μ m의 두께로 잘라 여포의 상태를 판정하고 남은 여포조직으로부터 여포액을 채취하여 분석하기 전까지 냉장고(-20°C)에 보관하였다.

여포액내 단백질농도는 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin(BSA)를 기준 단백질로 삼아 분광광도계(spectrophotometer, Shimadzu, UV-150-02)로 750nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하였다. 유의성검정은 Student's *t* test를 하였다.

전기영동은 discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis(disc PAGE)와 sodium dodecyl sulfate PAGE(SDS PAGE)를 이용하였다.

Disc PAGE는 Davis(1964)의 방법을 약간 변경하여 사용하였는데 running gel은 7% acrylamide(Sigma), 0.23% N, N'-methylene-bis-acrylamide(Bis, Sigma), 0.375M Tris-HCl(pH 8.8), 0.07% ammonium persulfate(Sigma) 그리고 0.0025% N, N, N', N'-tetramethylethyldiamine(TEMED)의 수용액을 만들고 진공상태에서 기포를 제거한 다음 굳혔다. Space gel은 1.25% acrylamide, 0.32% Bis, 0.25M Tris-HCl(pH 6.8), 0.0005% riboflavin 그리고 0.57% TEMED의 수용액을 running gel위에 얹어 굳혔다. 시료는 여포액 10 μ l에 0.05M Tris-HCl(pH 6.8) 65 μ l를 넣어 희석시킨 후 0.01% bromophenol blue 75 μ l를 혼합하여 그 중 30 μ l를 gel위에 올리고 0.01M Tris-glycine(pH 8.3)을 영동완충용액으로 하

여 32mA로 전류를 고정하여 3시간 영동시켰다. 영동이 끝난 후 12.5% trichloroacetic acid(TCA)용액에서 60°C를 유지하며 2시간 고정시키고 0.25% Coomassie brilliant blue 용액으로 1시간동안 염색한 후 탈색용액(methanol: acetic acid, glacial: H₂O = 2: 3: 35)으로 탈색하여 그 영동상을 분석하였다.

SDS PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 사용하여 gel을 만들어 굳히고 표지단백질로는 0.1% lysozyme(M. W. 14,300, Sigma), 0.2% pepsin(M. W. 34,700, Sigma), 0.2% egg albumin(M. W. 45,000, Sigma), 0.2% BSA(M. W. 66,000, Sigma), 0.05% phosphorylase B(M. W. 97,4000, Sigma) 그리고 0.05% β -galactosidase(M. W. 116,000, Sigma)를 사용하였으며, Laemmli 완충용액을 사용하여 10배로 희석시킨 여포액은 30 μ l씩 gel위에 올렸다. 영동완충용액은 disc PAGE의 용액에 0.1% SDS를 혼합하여 사용하였고 위에 기술한 방법과 같이 조작한 후 그 영동상을 분석하였다.

결 과

1. 조직학적 관찰 결과

여포내 난자와 난구세포, 과립세포 그리고 협막세포층의 상태를 조직학적으로 관찰하여 여포의 폐쇄 정도에 따라 다음과 같이 5가지 여포군으로 나누었다.

정상군(Normal group): 난자의 모양과 난구세포가 정상이며, 과립세포가 협막세포층에 일량하게 배열되어 있고 협막세포층이 잘 발달되어 있는 여포군(plate I, Fig. 1, 2).

초기군(Initial group): 난자는 외견상 퇴화의 징후가 뚜렷하지 않으나 일부 난구세포가 여포강 내부로 부유되어 떨어져나가 난자를 일량하게 싸고 있지 않으며, 과립세포와 협막세포층은 정상군과 별 차이가 없는 여포군(plate I, Fig. 3, 4).

응축군(Pyknotic group): 난자의 모양이 퇴화되어 있고 난구세포는 대체로 염색질이 이상응축되어 여포강 내부로 부유되어 있으며, 과립세포는 핵내 염색질이 이상응축되어 있고 일부는 여포강 내로 부유되었고, 협막세포층은 섬유상 세포로 변하여 있는 여포군(plate II, Fig. 1, 2).

괴사군(Necrotic group): 난자의 핵질과 세포질은 퇴화되어 있으며 난자에 붙어 있는 한두층의 난구세포도 괴사상태이고, 과립세포는 핵내 염색질이 이상응축되어 협막세포층으로부터 여포강내로 전부 부유되어 있고 협막세포층에는 콜라겐섬유가 많이 집적되어 있는 여포군(plate II, Fig. 3, 4).

Table 1. Protein concentration of the follicular fluid from porcine ovarian follicles according to the atretic stage

Atretic stage	Small	Medium	Large
Normal	*71.7 ± 3.0	60.9 ± 8.6	58.2 ± 3.4
Initial	68.6 ± 7.3	64.9 ± 4.0	53.6 ± 4.9
Pyknotic	64.9 ± 4.0	63.7 ± 4.0	54.0 ± 2.1
Necrotic	56.1 ± 11.0	55.1 ± 10.6	47.3 ± 6.4
Cystic	63.7 ± 1.3	51.8 ± 5.8	47.3 ± 7.9

*mean ± SE(mg protein/ml follicular fluid) n=10 76.2 ± 4.9(mg protein/ml porcine serum)

낭종군(Cystic group): 난자가 퇴화되어 거의 찾을 수 없으며, 과립세포도 소멸되어 협막세포층 섬유상세포로 되어 있고 낭종액(cystic fluid)으로 있는 여포군(plate III, Fig. 1. 2)

소여포에서 낭종군은 거의 찾아 볼 수 없고 대여포에서는 피사군을 거의 찾아 볼 수 없었다.

2. 단백질 농도

각 여포군의 소, 중, 대에 따른 단백질농도는 Table 1에 나타내었다.

크기가 커감에 따라 여포액내 단백질농도는 유의하게($P < 0.01$) 감소되었다. 일반적으로 정상군의 농도가 높은 경향을 보였으며 각 여포군간의 유의성 없었으나 피사군이 낮은 경향을 나타냈다. 여포의 단백질농도는 혈청의 그것에 비해 70~80%를 나타내었다.

3. 전기영동 양상분석

Disc PAGE양상은 plate IV와 V에 나타내었다. 소, 중, 대의 여포에서 혈청에 없는 각각 3개씩 같은 밴드가 나타났고(plate IV, V, 검은 화살표머리). 여포에서는, 혈청에 있으나 여포액에 없는 밴드 11개(plate IV, 빈 화살표머리)였으며, 중여포에서는 혈청에 있으나 여포액에 없는 밴드가 5개(plate IV, 빈 화살표머리)였다. 그리고 소여포에는 없으나 중여포에 나타난 뚜렷한 밴드는 4개(plate IV, 화살표 a, b, c, d)였고 2개는 불분명하였다. 대여포에서는 혈청에 있으나 소, 중여포에서 볼 수 없던 적은 이동성을 가진 대여포 특유의 밴드가 나타났으며(plate V, 화살표 e), 혈청내 β -globulin의 밴드는 정상군에서 보이지 않다가 응축군에서 적 밴드로 나타났고 피사군에 이르러서는 굵게 나타났다(plate V, 큰 화살표 A).

SDS PAGE양상은 plate V, Fig. 2에 나타내었다. 여포에서는 혈청에 없는 분자량 75,000의 밴드가 나타났고(검은 화살표머리). 혈청에 있으나 여포액

에 없는 밴드는 10개였다(빈 화살표머리). 또한 혈청에 있는 분자량 40,000의 밴드는 정상군에서는 나타나지 않고 그의 폐쇄군에서는 나타났고(화살표 A) 중여포에서는 혈청에 없는 분자량 75,000의 밴드가 나타났으며(검은 화살표머리), 소여포에서는 볼 수 없었으나 혈청에 나타났던 분자량 200,000의 밴드가 나타났고(화살표 1). 한편 피사군에서는 다른 여포군과는 달리 혈청에 있는 분자량 43,000의 밴드(화살표 B)와 분자량 38,000의 밴드(화살표 D)가 나타나지 않았고 분자량 41,000의 밴드가 특이하게 나타났고(화살표 C). 대여포에서는 혈청에 없는 분자량 75,000의 밴드와 분자량 20,000이하의 두 밴드가 나타났고(검은 화살표머리), 혈청에 있으나 소, 중여포에서 나타나지 않은 분자량 200,000 이상의 두 밴드가 나타났고(화살표 2). 분자량 100,000의 밴드(화살표 3), 그리고 분자량 20,000의 밴드(화살표 4)도 나타났고. 한편 중여포와 같이 혈청에 있는 분자량 43,000의 밴드가 다른 군에서는 있었으나 특이하게 피사군에서는 나타나지 않았다(화살표 B). SDS PAGE 상에 나타난 특이 단백질들은 Table 2로 정리하였다.

논 의

포유류의 난소내 폐쇄여포의 관정은 조직학적인 관찰과 스테로이드 호르몬의 분비상태를 종합하여 관정하여 왔으며(Condon *et al.*, 1979; Gondos, 1982; Callesen, 1984; Tsonis *et al.*, 1984), 최근에는 여포액내 inhibin의 소실(Henderson *et al.*, 1984)이나, chondroitin sulfate의 높은 농도(Bellin and Ax, 1984)로 폐쇄화를 판정하기도 하였다. 본 실험에서는 난자의 피사, 과립세포의 핵내 이상응축, 그리고 협막세포층의 이상비대등을 종합 관찰하여 폐쇄상태를 판정하고(Marion *et al.*, 1968; McNatty *et al.*, 1979; Ryan, 1981), Byskov(1974), Hay 등(1976) 그리고 Tsafiri와 Braw(1984) 등이 폐쇄과정을 3단계로 구

Table 2. Differences in the selected bands on SDS PAGE between follicular fluid and serum during development of atresia

M.W. of selected band	Small					Medium					Large					Serum
	N	I	P	E	C	N	I	P	E	C	N	I	P	E	C	
20,000 >	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
41,000	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
43,000	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
75,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
100,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
200,000	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
200,000 <	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

N; Normal group, I; Initial group, P; Pyknotic group, E; Necrotic group, C; Cystic group.
 "+" and "-" indicate presence and absence, respectively.

분한 것을 참조하여 실험군을 설정하였으며 이에 정상군과 낭종군을 첨가하였다. 과립세포의 핵내 염색질 이상용축의 정도로 보아, 초기군에서 용축군으로 용축군에서 괴사군으로 진전되는 것이라 생각되며(Helmreich *et al.*, 1979; Braw and Tsafiri, 1980; Koering *et al.*, 1982), Peluso 등(1980)의 보고와 같이 낭종군이 최종단계인 것으로 사료된다.

난소내 여포액의 단백질 농도는 혈청의 그것에 비하여 70~80%로 측정되었고, 여포의 크기가 성장하면서 여포액내 단백질 농도가 점진적으로 낮아진 것은 다른 동물들(bovine: Anderson *et al.*, 1976; human: Braw *et al.*, 1976; mare: Condon *et al.*, 1979)에서도 보고된 바 있는 일반적인 현상이다. 여포의 폐쇄화가 진전되어 잡에 따라 여포액내 단백질 농도가 낮아지는 경향을 나타내었는데, 폐쇄여포에서 ATPase와 alkaline phosphatase의 활성도가 높으며(Adams *et al.*, 1966, Weir and Rowlands, 1977), 특히 헤파톡에 이들 효소의 활성도가 강하게 나타난다는(Kim *et al.*, 1980) 것으로 보아 이는 헤파톡의 수분에 대한 수송능력이 커지는 것으로 사료된다.

Disc 전기영동상을 분석해 볼 때, 여포액은 혈청에서부터 유입된다는 보고가 있으나(Shivers *et al.*, 1964; Pangan and Menge, 1971), 여포액에서는 혈청에 없는 밴드가 나타난 것을 보면, 이는 과립세포에서 생성한 단백질이라고 사료된다. 한편 Civen 등(1965)과 Amin 등(1976)은 여포내에 RNA를 많이 포함하고 있는 과립세포가 단백질 합성을 활발히 할 것이라고 시사한 바 있다. 또한 핵용축된 과립세포의 라이소솜에서 분리된 autophagic vacuole에 의해 헤파톡층이 파괴되어 낭종화된다(Peluso *et al.*, 1980)는 보고가 있어서 낭종액이 혈청과 거

의 동일함을 뒷받침해 준다.

SDS PAGE에서 보면(Table 2) 혈청내에는 볼 수 없는 여포액내 고유밴드들(M.W. 20,000, 75,000)이 있는데 이것들은 과립세포에서 생성, 분비되는 여포액내 특이단백질이라 생각되며 Bae 등(1981)이 보고한 특이단백질이거나 OMI(Hillensjö *et al.*, 1979) 혹은 inhibin(DePaolo *et al.*, 1979; Hillensjö *et al.*, 1980)과 관계가 있다고 사료된다. 그리고 혈청이나 여포액내에 함께 존재하는 밴드(M.W. 43,000)는 여포의 크기와 관계없이 괴사군에서만 나타나지 않았는데 이 단백질은 괴사를 억제하는 효과를 가졌거나 아니면, 괴사가 일어난 결과로서 분해 소멸되는 것으로 사료된다. 한편 혈청에는 있으나 소, 중 여포의 여포액에 없다가 대여포액에 나타난 밴드들(M.W. 20,000이하, 41,000, 100,000, 200,000이상)이 있는데 이는 혈청내의 이런 단백질들이 소, 중여포의 강소로 쉽게 침투할 수 없는 상태에서, 대여포로 되면서 침투하게 된다고 생각된다.

위의 모든 결과들을 종합해 볼 때, 여포액내 단백질 양상은 폐쇄 정도와 크기에 따라 차이가 있으므로, 여포의 상태를 고려하지 않고 다만 크기에 따라 여포액내 단백질을 분석한다면 그 결과는 큰 오류를 포함하게 될 것이라고 사료된다. 전기영동에 나타난 특이한 밴드는 여포액내에만 존재하는 특이한 단백질이다. 폐쇄 정도 혹은 크기에 따라 생멸하는 단백질에 관하여 앞으로 더 분석, 연구한다면 여포의 폐쇄 기작을 이해하는 데 더욱 접근할 수 있을 것이다.

REFERENCES

Adams, E.C., Hertig, A.T. and Forster, S.: *Studies*

- on guinea pig oocytes. II. Histochemical observations on some phosphatases and lipid in developing and in atretic oocytes and follicles. *Am. J. Ant.*, 119:303-340, 1966.
- Amin, H., Richart, R.M., and Brinson, A.O.: Preovulatory granulosa cells and steroidogenesis. *Obstetr. Gynecol.* 47:562-568, 1975.
- Anderson, M.M., Krøll, J., Byskov, A.G. and Faber, M.: Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J. Reprod. Fert.*, 48:109-118, 1976.
- Bae, I.H., Hwang, S.Y., Chung, S.O. and Cho, W. K.: Detection of proteins from porcine follicular fluid and their effect in the maturation of mouse oocyte in vitro. *Kor. J. Fertil. Steril.* 8:1-12, 1981.
- Bellin, M.E. and Ax, R.L.: Chondroitin sulfate: An indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology*, 114:428-434, 1984.
- Bill II, C.H. and Greenwald, G.S.: Acute gonadotropin deprivation. I. A model for the study of follicular atresia. *Biol. Reprod.*, 24:913-921, 1981.
- Braw, R.H., Byskov, A.G., Peters, H. and Faber, M.: Follicular atresia in the infant human ovary. *J. Reprod. Fert.*, 46:55-59, 1976.
- Braw, R.H. and Tsafiriri, A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fert.*, 59:267-272, 1980.
- Byskov, A.G.S.: Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J. Reprod. Fert.*, 37:277-285, 1974.
- Callesen, H.: Follikulær atresi hos kvæg af. *Annual Report, Sterility Research Institute, The Royal veterinary and Agricultural Univ. København*, pp. 97-111, 1984.
- Civen, M., Brown C.B. and Hilliard a.: Ribonucleic acid and protein synthesis in ovary. *Bioclim. Biophys. Acta*, 114:127-134, 1966.
- Condon, W.A., Ganjam, V.K., Kenney, R.M. and Channing, C.P.: Follicular atresia in the mare. In: *Ovarian follicular development and function*. Midgley, A.R. and W.A. Sadler, ed. Raven Press, New York, pp. 75-78, 1979.
- Davis, B.J.: Disc alectrophoresis: II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404-427, 1964.
- DePaolo, L.V., Shander, D., Wise, P.M., Baracough, C.A. and Channing, C.P.: Identification of inhibin-like activity in ovarian venous plasma of rats during the estrous cycle. *Endocrinology*, 105:647-654, 1979.
- Desjardins, C., Kirton, K.T. and Hafs, H.D.: Some chemical, immunochemical and electrophoretic properties of bovine follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, 11:237-244, 1966.
- Edward, R.G.: Follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, 37:189-219, 1974.
- Gondos, B.: Ultrastructure of follicular atresia in the rat. *Gamete Res.*, 5:199-206, 1982.
- Hay, M.F., Cran, D.G. and Moor, R.M.: Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tissue Res.*, 169:515-529, 1976.
- Helmreich, O.B., Gougeon, A., Thebault, A., Sartarelli, D., Milgrom, E., Frydman, R. and Papiernik, E.: Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: Differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48:686-694, 1979.
- Henderson, K.M., Franchimont, P., Charlet-Renard, Ch. and McNatty, K.P.: Effect of follicular atresia on inhibin production by bovine granulosa cells in vitro and inhibin concentration in the follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, 72:1-8, 1984.
- Hillensjö, T., Channing, C.P., Pomerantz, S.H. and Kripner, A.S.: Intrafollicular control of oocyte maturation in the pig. *In vitro*, 15:32-39, 1979.
- Hillensjö, T., Pomerantz, S.H., Kripner, A.S., Anderson, L.D. and Channing, C.P.: Inhibition of cumulus cell progesterone secretion by low molecular weight fractions of porcine follicular fluid which also inhibit oocyte maturation. *Endocrinology*, 106:584-591, 1980.
- Kim, M.K., Kim, S.R. and Cho, W. K.: Changes in phosphatase activity of the mouse uterus during the estrous cycle. *Kor. J. Zool.*, 23:61-68, 1980.
- Koering, M.J., Goodman, A.L., Williams, R.F. and Hodgen, G.D.: Granulosa cell pyknosis in the dominant follicle of monkeys. *Fertil. Steril.*, 37:

837-844, 1982.

- Laemmli, U.K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₁*, *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A. and Randall, R.J.: *Protein measurement with the Folin-phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- Marion, G.B., Gier, H.T. and Choudary, J.B.: *Micromorphology of the bovine ovarian follicular system*. *J. Anim. Sci.*, 27: 451-465, 1968.
- McGaughey, R.W.: *A comparison of the fluid from small and large ovarian follicles of the pig*. *Biol. Reprod.*, 13: 147-153, 1975.
- McNatty, K.P., Smith, D.M., Makris, A., Osathanondh, R. and Ryan, K.J.: *The microenvironment of the human antral follicle: Interrelationships among the 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.*, 49: 851-860, 1979.
- Pangan, S.M. and Menge, A.C.: *Immunologic studies on human follicular fluid*. *Fertil. Steril.*, 22: 367-372, 1971.
- Peluso, J.J., Steger, R.W. and Hafez, S.E.: *Surface ultrastructural changes in granulosa cells of atretic follicles*. *Biol. Reprod.*, 16: 600-604, 1977.
- Peluso, J.J., Charlesworth, C.E., Bolender, D.L. and Steger, R.W.: *Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia*. *Cell Tissue Res.*, 211: 105-115, 1980.
- Richards, J.S.: *Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation*. *Physiological Reviews*, 60: 51-89, 1980.
- Ryan, R.J.: *Follicular atresia: Some speculation of biochemical markers and mechanisms*. In: *Dynamics of ovarian function*. Schwartz, N. B. and M.H. Dunn, ed. Raven Press. New York, pp. 1-11, 1981.
- Shalgi, R., Kraicer, P., Rimon, A., Pinto, M. and Soferman, N.: *Proteins of human follicular fluid: The blood-follicle barrier*. *Fertil. Steril.*, 24: 429-434, 1973.
- Shivers, C.A., Metz, C.B. and Mann, C.L.: *Some properties of pig follicular fluid*. *J. Reprod. Fert.*, 8: 115-120, 1964.
- Tsafirri, A. and Braw, R.H.: *Experimental approaches to atresia in mammals*. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 6: 226-265. Oxford Univ. Press, 1984.
- Tsonis, C.G., Carson, R.S. and Findlay, J.K.: *Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 beta and testosterone concentrations, and diameter and atresia of individual ovine follicles*. *J. Reprod. Fert.*, 72: 153-163, 1984.
- Wallach, E.E. and Noriega, C.: *Effects of local steroids on follicular development and atresia in the rabbit*. *Fertil. Steril.*, 21: 253-267, 1970.
- Weir, B.J. and Rowlands, W.: *Ovulation and atresia*. In: *The Ovary*. Zuckerman, L. and B.J. Weir, ed. Vol. 1: pp. 285-301. Academic Press, New York, 1977.

PLATE EXPLANATION

Plate I

Fig. 1. The oocyte-cumulus complex in Normal group showing healthy cumulus cells, intact zona pellucida and evenly bright ooplasm($\times 300$).

Fig. 2. The theca layer and granulosa cells in Normal group showing regularly exploding granulosa cells($\times 300$).

Fig. 3. The oocyte-cumulus complex in Initial group showing irregular oocyte-surrounding cumulus cells, uneven zona pellucida, slightly dark phase of ooplasm and germinal vesicle appearing pyknotic chromatin($\times 300$).

Fig. 4. The theca layer and granulosa cells in Initial group showing normal-like phase, well-developed theca layer and regular exploding granulosa cells($\times 300$).

Plate II

Fig. 1. The oocyte-cumulus complex in Pyknotic group showing degenerating oocyte and irregular oocyte-surrounding pyknotic cumulus cells($\times 300$).

Fig. 2. The theca layer and granulosa cells in Pyknotic group showing a number of pyknotic granulosa floating in antrum, and fibrous theca layer($\times 300$).

Fig. 3. The oocyte-cumulus complex in Necrotic group showing oocyte-surrounding necrotic cumulus cells, broken zona pellucida, and degenerated oocyte($\times 300$).

Fig. 4. The theca layer and granulosa cells in Necrotic group showing necrotic granulosa cells floating in antrum and hypertrophic fibrous theca layer($\times 300$).

Plate III

Fig. 1, 2. The follicle wall in Cystic group showing no granulosa cells in antrum and thickened fibrous theca layer($\times 150$).

Plate IV

Fig. 1. The banding patterns of proteins in small follicular fluid and serum as control on disc PAGE. The bands pointed with blank arrow head indicate present in serum only, and those of black arrow head, in follicular fluid only.

Fig. 2. The banding patterns of proteins in medium follicular fluid and serum as control on disc PAGE. Arrow heads are the same meaning as Fig. 1.

N; Normal group, I; Initial group, P; Pyknotic group, E; Necrotic group, C; Cystic group, S; Serum

Plate V

Fig. 1. The banding patterns of proteins in large follicular fluid and serum as control on disc PAGE. Arrow heads are the same meaning as Fig. 1., Plate IV. The bande is absent in the small and medium follicular fluid. Note the specific band(large arrow A).

Fig. 2. Diagram of the banding patterns of proteins in the follicular fluid and serum as control on SDS PAGE. Arrow heads are the same meaning as Fig. 1., Plate IV. The bands of A to D and 1 to 4 are something meaningful in comparison of the experimental groups and serum.

논문 사진 부도

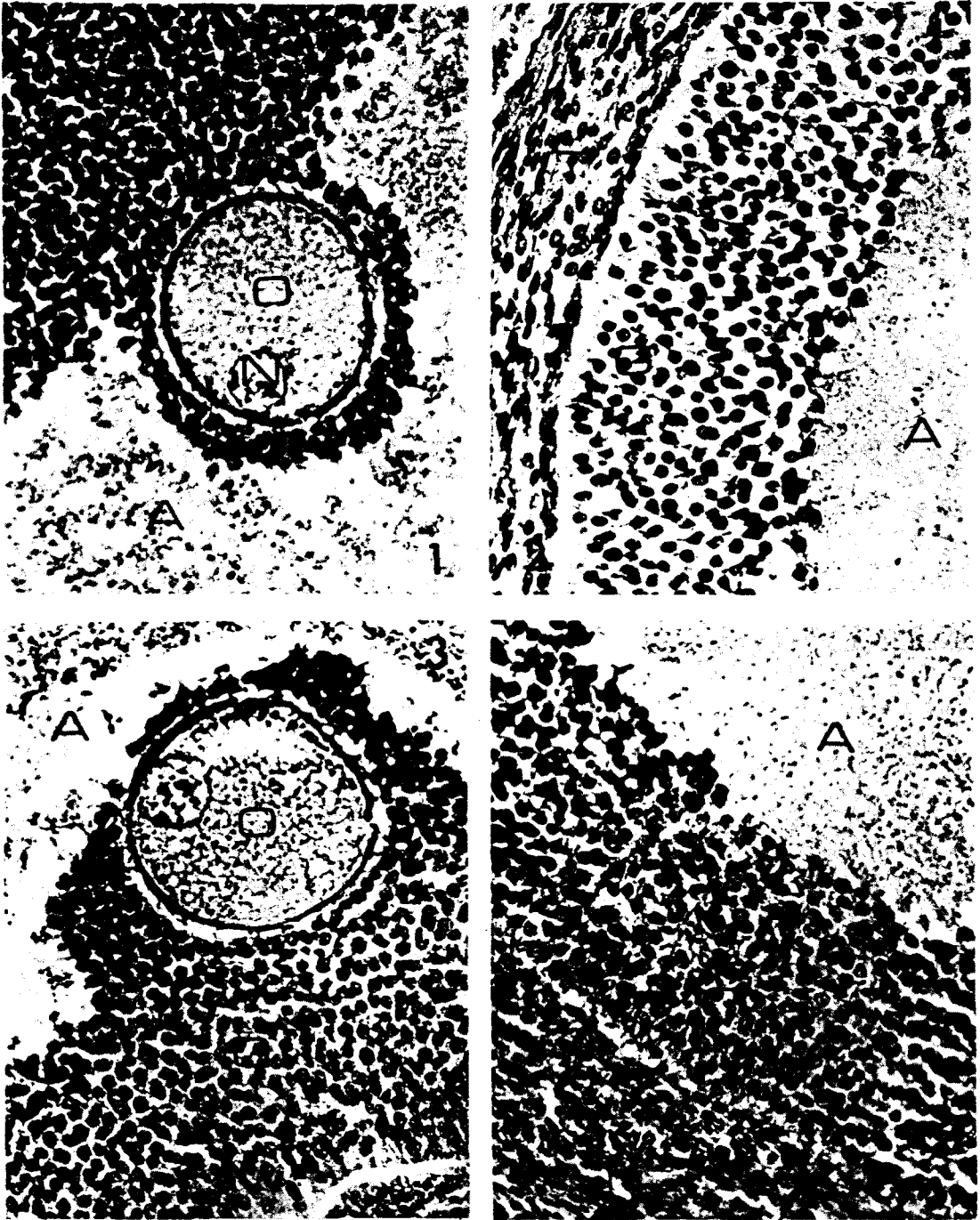


Plate I

》논문 사진 부도《

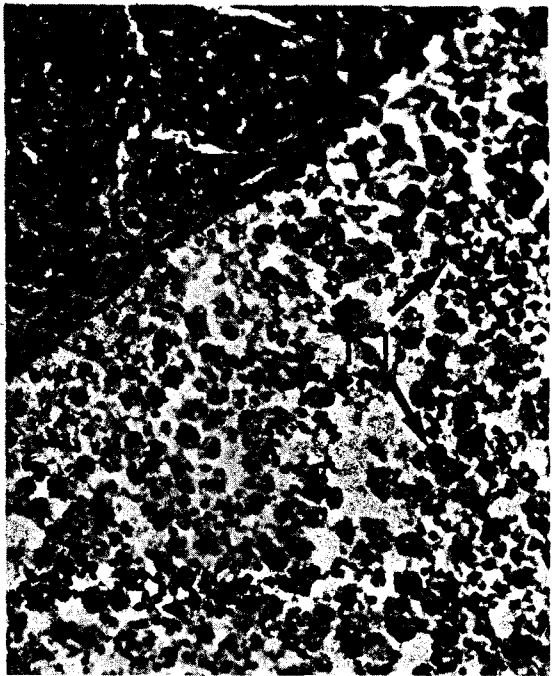
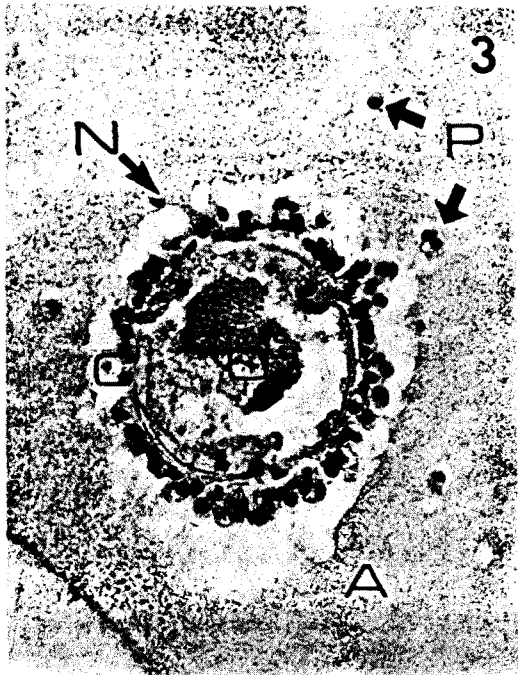
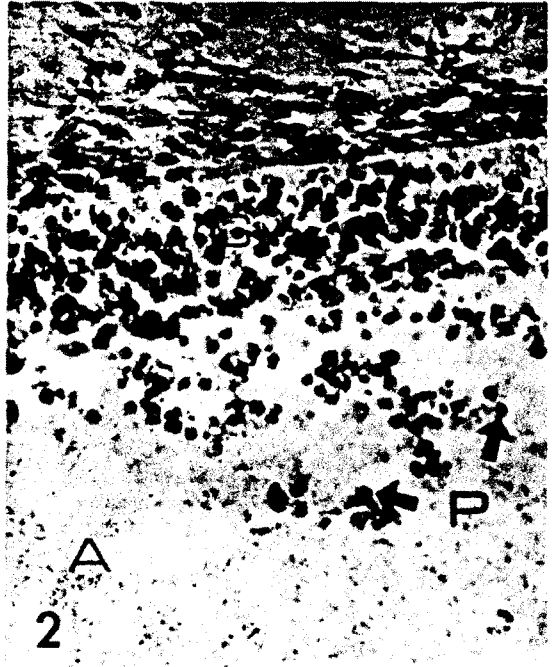
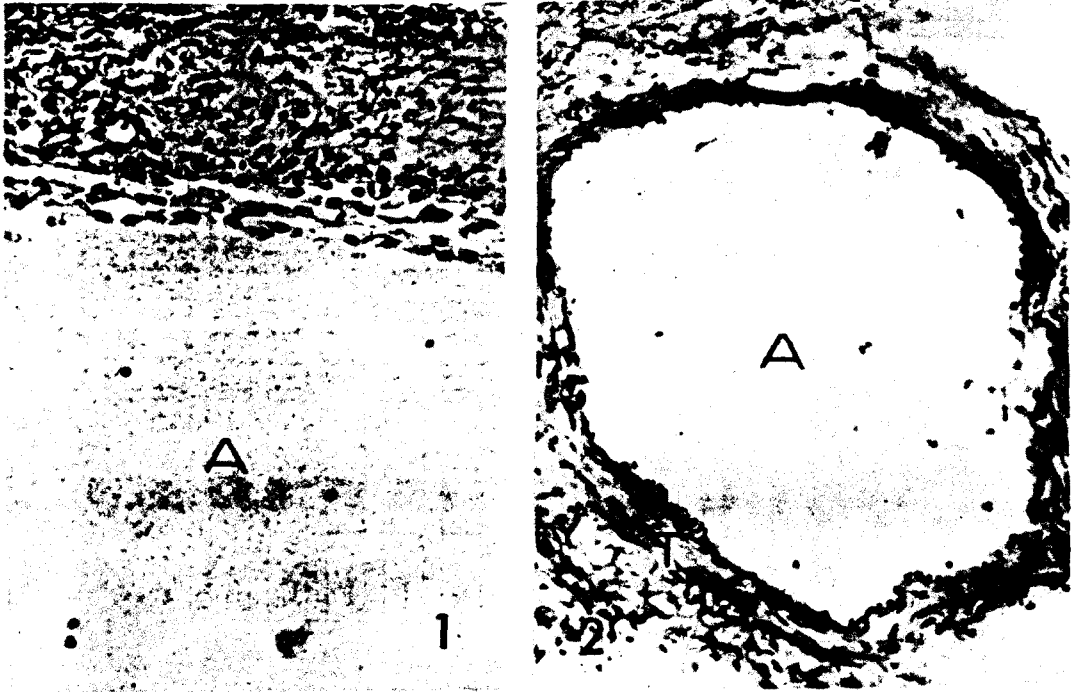


Plate II

》논문 사진 부도《



ABBREVIATION

A: antrum

G: granulosa cell

O: oocyte

T: theca layer

C: cumulus cell

N: nucleus of oocyte

P: pyknotic cell

arrow N: necrotic cell

Plate III

》논문 사진 부도《

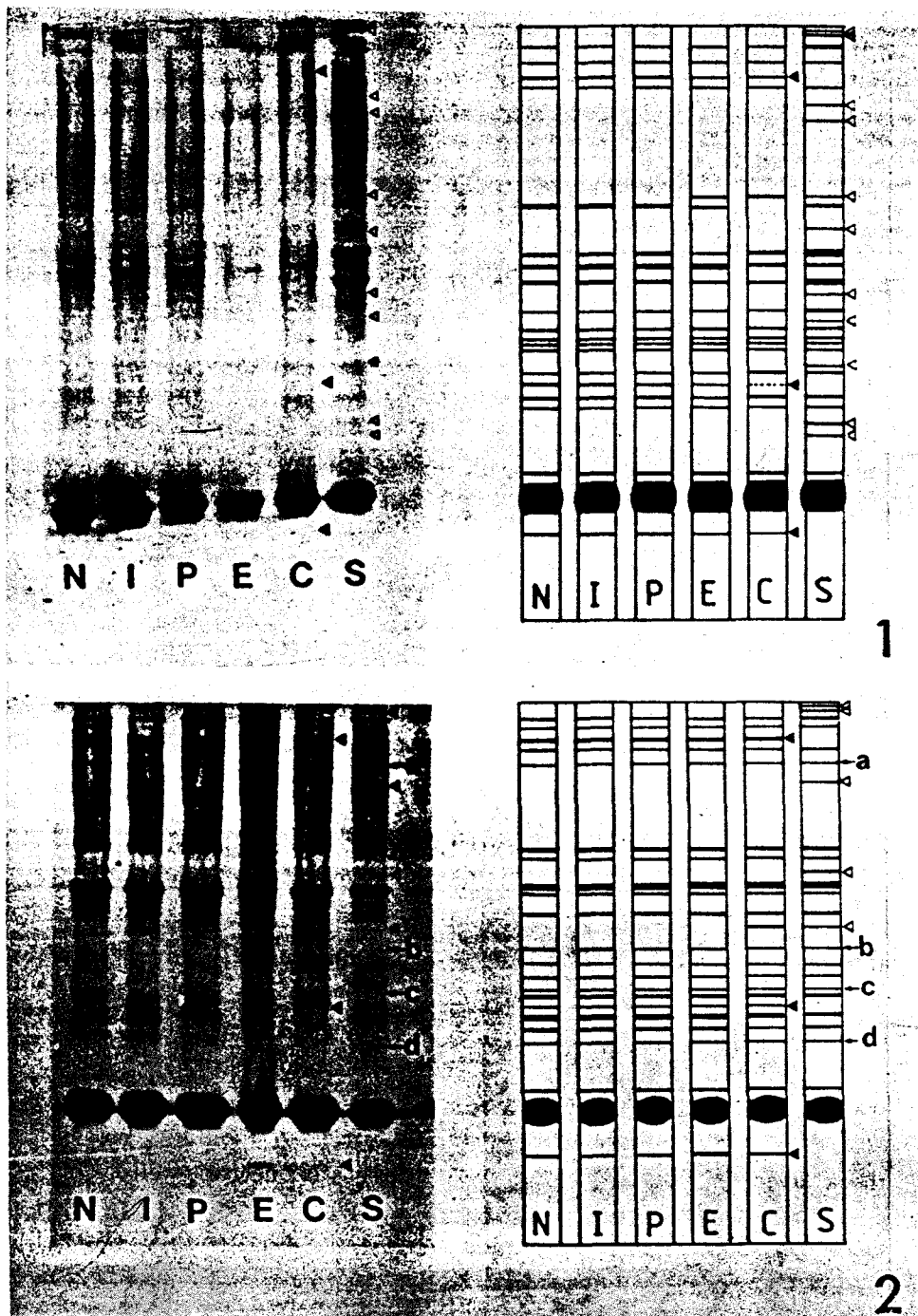
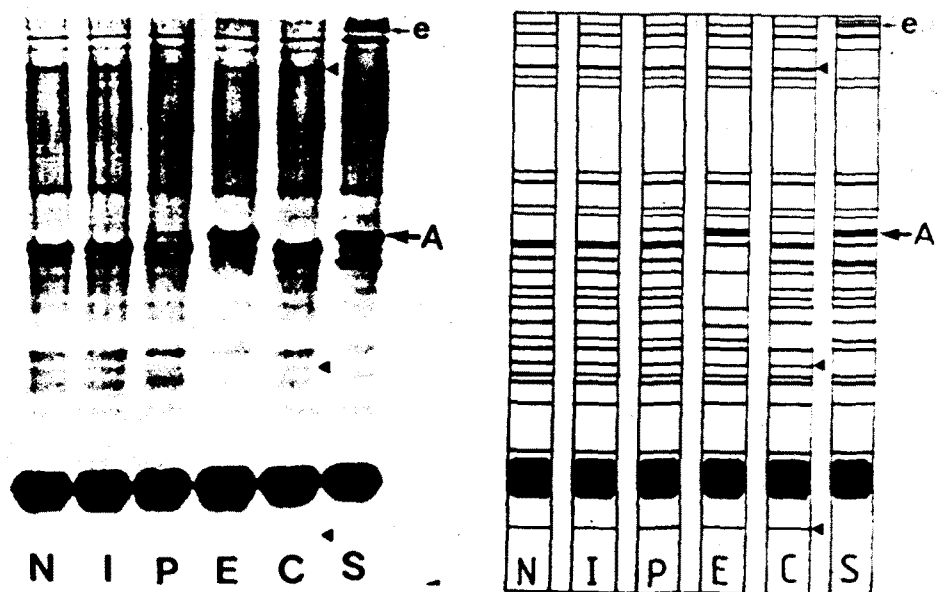
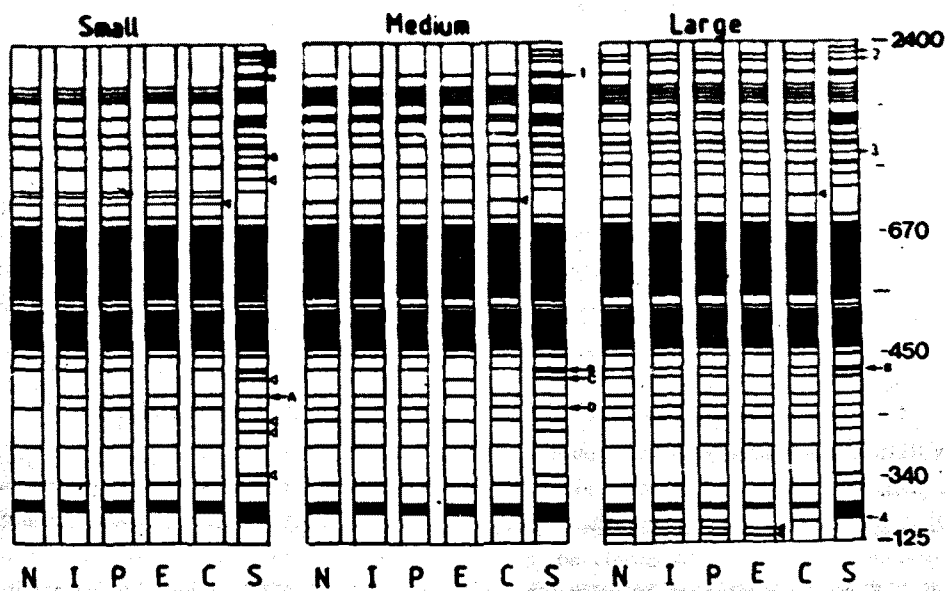


Plate IV

》논문 사진 부도《



1



2

Plate V