大韓不妊學會誌: 第29卷 第3號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 3, 2002, 9

인간난포에서 Apoptosis 관련 단백질 및 Apoptotic 세포의 면역학적 발현

연세대학교 의과대학 부속 영동 세브란스 병원 산부인과학교실,
연세대학교 의과대학 병리학교실*

박성록 · 이병석 · 양우익* · 김종화 · 박병주 · 박기현 · 조동제 · 송찬호

The Immunologic Expression of Apoptosis Related Proteins and Apoptotic Cells in Human Ovarian Follicles

Sung Rok Park, Byung Seok Lee, Woo Ick Yang*, Jong Hwa Kim, Byung Joo Park, Ki Hyun Park, Dong Jae Cho, Chan Ho Song

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective: To investigate the expression of apoptosis related proteins and apoptotic cells on the human ovarian follicles.

Materials and Methods: Thirty five Formalin-fixed paraffin-embedded human ovarian tissue blocks were selected from the surgical pathology files of the department of pathology, College of Medicine, Yonsei University, for the period from 1996 to 1998. All specimen were from premenopausal women aged from 32~45. Ovarian tissues were collected from the patients performing hysterectomy for benign uterine diseases. Immunohistochemical staining was performed for the detection of DNA fragmented cell, Bcl-2, Bax, Fas and Fas-ligand.

Results: Bcl-2 and bax were not expressed on the surrounding cells and oocyte of the primary, primordial and preantral follicles. Fas and Fas-ligand (Fas-L) were not expressed on the surrounding cells on the primordial and primary follicles. But expressed on the surrounding granulosa cells and oocyte in the primordial and primary follicles. In the healthy follicles, Bcl-2 was expressed on the granulosa cells, however, Bax was not expressed. DNA fragmented cells were expressed on the inner granulosa cell layer of atretic follicles.

Conclusion: Fas, Fas-ligand, and Bax may be responsible for the follicular atresia and Bcl-2 may be involved in the follicular survival in the human ovary.

Key Words: Apoptosis, Bcl-2, Bax, Fas, Fas-ligand, Human ovary

1972년 Kerr 등이 apoptosis가 생리적 형태의 세포사이며 조직의 평형을 유지하는데 중요한 역할을 한다고 보고한 이래 여러 조직에서 apoptosis에 관한 연구가 활발하게 지속되고 있다. 특히 난소는 매달 난포의 성장, 우성난포의 선택, 배란, 난포의 퇴화, 황체의 퇴화를 겪는 매우 역동적인 조직이다. 따라서 이러한 주기적 변화를 보이는 난소는 매우 좋은 apoptosis의 본보기이다. 처음에 recruit된 난포들이

주관책임자: 이병석, 우) 135-720 서울특별시 강남구 도곡동 146-92, 영동 세브란스 병원 산부인과학교실
Tel: (02) 3497-3435, Fax: (02) 3462-8209, e-mail: dr222@yumc.yonsei.ac.kr

Table 1. Immunologic expression of apoptosis related proteins and DNA fragmented cells in human ovarian follicles

	Bcl-2	Bax	Fas	Fas-ligand	DNA fragmented cells
Primordial follicle	-	-	+‡	+‡	-
Preantral follicle	-	-	+¶	+¶	-
Atretic follicle	-	+†	+‖	+‖	+**
Healthy follicle	+*	-	-	-	-

-; Negative staining, +; Positive staining, *; Positive stained on oocyte and granulosa cells, †; Positive stained on granulosa cells and theca cells, ‡; Positive stained on oocyte, ¶; Weakly stained on oocyte and granulosa cells, ‖; Positive stained on granulosa cells and theca cells, **; Positive stained inner granulosa cells

자라면서 오직 한 개의 난포만 자라 성숙한 난포가 되고 나머지 난포들은 퇴화되는데 과연 어떻게 이러한 과정들이 이루어지는지에 대해 최근 apoptosis의 기전으로 설명되고 있다.[1] 여러 동물 실험으로부터 난소의 apoptosis의 기전에 대한 연구들이 많이 이루어지고 있고 이것에 대한 중요한 기전의 이해도 부분적으로 이루어지고 있다.[2,3] 그러나 인간난소에서의 난포의 성장과 퇴화의 기전에 대한 이해는 아직 매우 제한적이다. Funayama 등[4]은 퇴화성 황체 이외의 난소에서 apoptosis가 발견되지 않는다고 보고하였으나 Yuan & Giuidice 등[5]은 DNA fragmented cell이 antral follicle과 preovulatory follicle에서 보이므로 난포의 퇴화가 apoptosis를 통한 생리적 과정이라고 제시하였다.

세포들에서 apoptosis 과정이 일어날 때는 능동적으로 유전자의 발현과 단백질의 합성이 필요하다.[6] 난포퇴화시 난포에서 발현되는 알려진 apoptosis 관련 유전자로는 Bcl-2, Bax, Bcl-xlong, Bcl-xshort, P53과 Fas 등이 있다.[7~9] 이러한 유전자들의 발현은 즉 난포의 퇴화와 성장에 조절인자로서 작용을 한다는 것을 제시한다. 그 중에서도 Bcl-2 유전자군의 중요성은 확립되었다. Bcl-2 유전자는 follicular lymphoma에서 t (14; 18) chromosomal translocation의 breakpoint에서 발견되었다.[4] Ratts 등[10]은 Bcl-2 유전자 knock-out mouse 실험에서 난자를 갖는 정상 원시난포의 생성에 중요한 역할을 하는 유전자라고 제시하였다. 또한 Fukaya 등[11]은 Bcl-2가 인간난포의 과립세포 (granulosa cell)에서 발현되므로 이것이 인간난포의 성장에 중요한 유전자라고 제시하였다.

Bax는 21-kDa의 단백질로 Bcl-2와 이형접합체 (heterodimer)를 이루거나 Bax와 동형접합체 (homodimer)를 형성하여 Bcl-2의 역할을 상쇄하는 작용을 하여 세포소실 (cell death)을 유도하는 유전자로 밝혀졌다.[12]

Fas는 tumor necrosis factor receptor family에 속하는 유전자로[13] 면역반응의 기능을 저하시키는 작용을 하여 자가면역질환의 기전에도 관여하며 anti-Fas 항체나 Fas-ligand와 결합하여 세포의 죽음을 유도하는 signal을 유도한다. Hakuno 등[14]은 토끼에서 Fas와 Fas-ligand system이 난소 자연사를 시작하는데 역할을 함을 밝혀내었다. Fas는 사람에서 난포 (ovarian follicle), 황체 (corpus luteum), interferon gamma로 전처치된 배양된 과립막세포 (cultured human granulosa cell)에서 발견되는 것으로 보아 Fas는 사람에서도 난소의 자연사에 관여하는 것으로 보인다.[15] 그러나 활성화된 어떤 특별한 유전인자나 그 활성화의 순서는 명확하지 않다. 그러므로 우리는 인간난소에서의 난포의 역동성을 밝히기 위해 Bcl-2, Bax, Fas, Fas-ligand 같은 apoptosis와 관련된 단백질이 과연 난포의 성장과 퇴화에 어떠한 역할을 하는지 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

35개의 인간난소 검체는 1996년부터 모아진 영동세브란스 병원 병리학교실의 surgical pathology files로부터 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직절편 (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks)을 검색하였고 환자의 연령이 32~45세인 환자 중 부인과 양성질환으로 자궁적출술시 제거한 난소에서 채취하였다. 각각의 예에서 진단을 확인하기 위해 hematoxylin과 eosin으로 염색된 슬라이드를 재검토

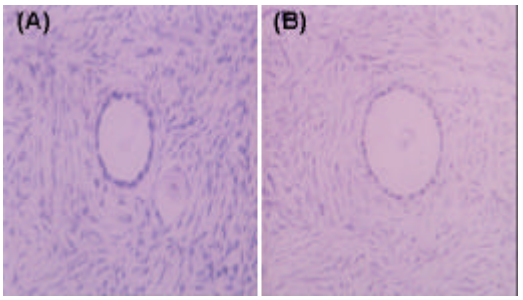

Figure 1. Immunostaining for **(A)** Bax, showing no reactivity in the primary and the primordial follicle, **(B)** Bcl-2, showing no reactivity in the primary follicle (original magnification ×400).

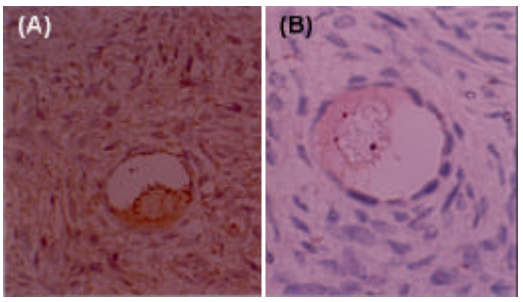

Figure 2. Immunostaining for **(A)** Fas, **(B)** Fas-ligand, showing no reactivity except on the oocyte in the primordial follicle (original magnification ×400).

하였다.

1. 면역조직화학적 검사

면역조직화학염색 방법은 microwave-oven heating과 avidin-biotin complex 방법으로 시행하였다. 자세한 방법은 다음과 같다. Xylene으로 dewax 후 농도별 알콜 용액으로 rehydration시켰다. Endogenous peroxidase activity는 3% hydrogen peroxide 용액으로 10분간 incubation시켰다. Bcl-2와 Bax를 위한 검체는 citrate buffer (0.01 MM, PH 6.0)에 immersion시켰고 Fas와 Fas-Ligand에 대한 검체는 750 W의 microwave oven에 15분간 EDTA 용액에 immersion시켰다. 그리고 실온에 20분간 놔둔 후 Bcl-2 monoclonal 항체 (Dako)는 1 : 80으로 희석하였고, Bax polyclonal 항체 (Pharminigen)는 1 : 1000으로 희석하였고, Fas monoclonal 항체 (Dako)는 1 : 20, Fas-L polyclonal 항체 (Santacrutz)는 1 : 100으로 희석하였다.

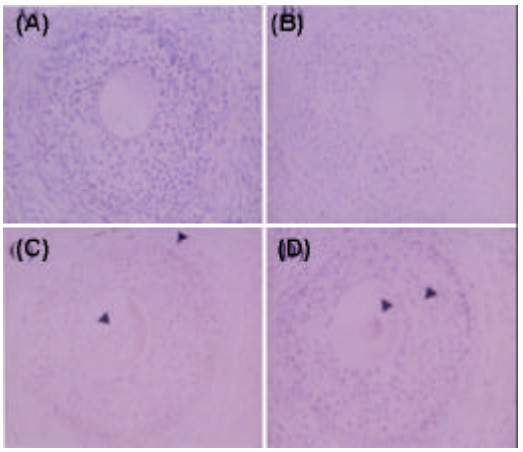

Figure 3. Immunostaining for **(A)** Bax, showing no reactivity, **(B)** Bcl-2, showing no reactivity, **(C)** Fas, weakly stained on the granulosa cells and oocyte, **(D)** Fas-ligand, faintly stained on the oocyte and some granulosa cells (×400).

2. DNA fragmented 세포의 검출

DNA fragmented cell을 검출해 내기 위해 DNA fragmentation detection kit (Tdt Frag, Oncogene)을 사용하였다. 과정을 요약하면 다음과 같다.

1) 조직절편의 파라핀을 제거하고 수화시킨다.
2) 검체의 permeabilization
3) Endogenous peroxidase의 불활성화
4) Equilibrium and labeling reaction
5) Termination of labeling reaction
6) DAB 용액의 검출 (Detection of DAB solution)
7) 대조염색 (Counterstaining)

결 과

Bcl-2와 Bax는 제 1차 난포 (primary follicle)와 원시난포 (primordial follicle)에서 주위 세포와 난자 (oocyte)에서 염색이 되지 않았으며 (Figure 1), Fas와 Fas-L은 원시난포의 주위 세포에서는 발현되지 않았으나 난자에서는 염색이 되었다 (Figure 2). 따라서 Fas와 Fas-L가 아마도 출생 전 혹은 출생 후 난자의 소멸이 일어날 때 작용할 것으로 추측할 수 있으리라 생각된다 (Figure 3). 제 2차 난포 (preantral follicle)에서는 Bcl-2와 Bax가 주위의 과립세포와 난자

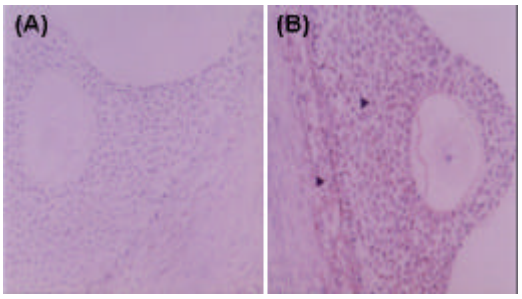

Figure 4. Immunostaining for **(A)** Bax, showing no reactivity, **(B)** Bcl-2, showing reactivity on the granulosa cells in the healthy follicle (×400).

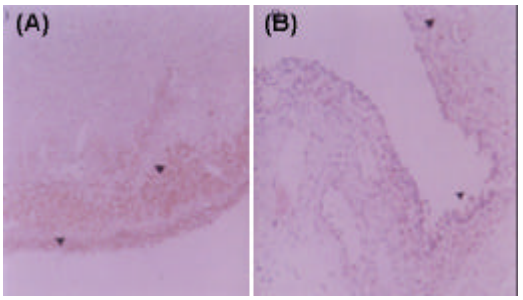

Figure 5. Immunostaining for **(A)** Fas, showing moderate reactivity on the granulosa cells and theca cells on the surrounding stroma, **(B)** Fas-ligand, showing weak reactivity on the granulosa cells and theca cells (×200).

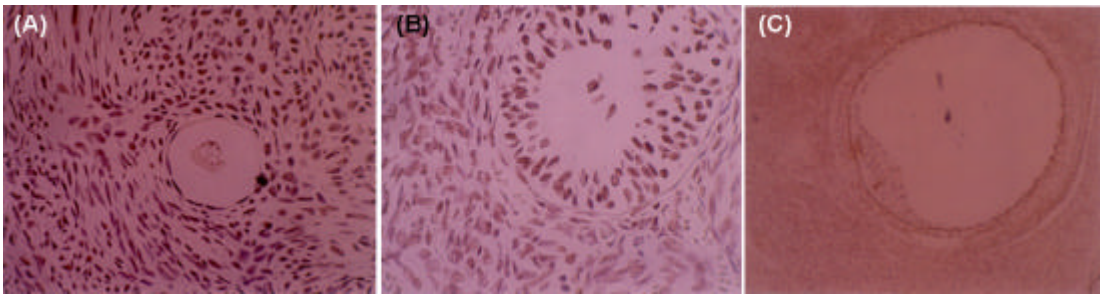

Figure 6. Immunostaining for DNA fragmented cells **(A)** in primordial follicle, showing no reactivity on the granulosa cells, oocyte and on the surrounding stroma, **(B)** in preantral follicle, showing no reactivity, **(C)** inner granulosa cells, showing reactivity (×100).

에서는 발현되지 않았으나 Fas와 Fas-L는 주위의 과립세포와 난자에서 약하게 발현됨을 알 수 있었다 (Figure 4). 이러한 소견은 건강한 난포에서 Bcl-2는 과립세포와 난포막세포 (theca cell)에서 모두 발현됨으로서 Bcl-2는 난포의 성장에 중요한 역할을 하리라 생각된다. 퇴화난포 (atretic follicle)에서는 Bax가 주위의 과립세포와 난포막세포에서 모두 발현되었으나 Bcl-2는 퇴화난포의 초기에 가장 바깥쪽 세포의 일부 세포에서만 발현됨을 알 수 있었다. Fas는 과립세포와 난포막세포와 주위의 기질세포에 중등도의 염색되는 양상을 보였고 Fas-L는 과립세포와 난포막세포에서 약하게 염색되었고 주위의 기질세포에는 염색되지 않았다 (Figure 5). DNA fragmented 세포는 원시난포, 제 1차 난포와 제 2차 난포, 그리고 자라나는 건강한 난포에서 모두 발현되지 않았으나 퇴화난포의 과립세포 중 가장 내부에 위치한 과립세포에서 발현되었다 (Figure 6). 이상의 결과를 종합해 보면 Table 1과 같다. 따라서 난포퇴화시 과립세포의 소실이 가장 안쪽 층에서 소실되는 것으로 생각되며 난포의 퇴화에 apoptosis 관련 단백질인 Fas와 Fas-L, Bax 등이 작용하여 난포퇴화를 일으키는 것으로 생각된다.

고 찰

난소는 우성난포의 선택, 난포의 퇴화, 배란, 황체의 퇴화라는 난포의 선발과정을 거치는 역동적인 조직이다. 이러한 난소의 주기에 대한 모델은 apoptosis의 좋은 모델이다. 현재 연구에서 원시난포 (primordial follicle)와 제 1차 난포 (primary follicle)에서는 Bcl-2와 Bax가 나타나지 않았다. 그러나 Fas와 Fas-ligand가 원시난포와 제 1차 난포의 난모세포 (oocyte)에서 나타난다는 것은 Fas와 Fas-ligand가 출생 이후에 원시난포들을 제거하는 역할을 할 것이

라는 점을 제시한다. 제 2차 난포 (preantral follicle)에서는 Fas가 난모세포에서처럼 과립막세포에 희미하게 나타난다. 그러나, 난모세포에 나타나는 Fas는 원시난포 안의 난모세포에 나타나는 Fas에 비해 약하게 나타난다. Sakamaki 등[16]은 Fas가 과립막세포 (granulosa cell)와 황체세포 (luteal cell)에는 나타나지만 성숙된 쥐들의 난모세포에는 나타나지 않는다고 보고하였다. Kondo 등[7]은 인간의 난소에서의 Fas의 역할을 발견하기 위한 연구에서, Fas는 제 2차 난포 (preantral follicle)의 과립막세포 (granulosa cell)에는 나타나지 않는다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 Fas가 옅게 나타나는 것은 아마도 Fas가 표현되는지를 알아보기 위한 실험상의 기술이나 방법의 차이 때문일 것이다. 퇴화난포의 초기단계에서 Bcl-2는 몇 개의 가장 바깥 층에서 옅게 염색되는데 비해, Bax는 난포막세포 (theca cell)에 뿐만 아니라 과립막세포 (granulosa cell)에도 나타난다. Bcl-2는 일단 퇴화과정 (atretic process)이 시작되면 과립막세포들의 가장 안 층에서부터 없어지는 것 같다. 이를 뒷받침하는 증거로 퇴화난포에서 DNA fragmented 세포가 가장 안쪽의 과립세포에서 발견되는 것으로 보아 Bcl-2의 소실로 가장 안쪽의 과립세포가 죽어가는 것으로 생각된다. 따라서 이러한 Bcl-2와 Bax는 난포의 퇴화와 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 그리고 Fas는 과립막세포들에 주로 나타나지만, Fas-ligand는 Fas에 비해 과립막세포에서 옅게 염색되며 Fas-ligand의 발현 정도는 퇴화난포의 후반기에 증가하는 것으로 보여 Fas의 출현은 난포의 퇴화시 Fas-ligand의 출현보다 늦게 나타나는 것으로 여겨진다.

난포의 apoptosis는 난포 안의 호르몬, 성장인자, 사이토카인으로부터의 전달신호에 의해 난포의 성장과 퇴화를 일으키는 유전자를 활성화시켜 난포의 변화가 일어나는 것으로 추측된다. 난포의 생존을 유도하는 인자로서 성선자극호르몬, 에스트로젠, 표피성장인자, 인슐린유사성장인자 I, 기초섬유아세포 성장인자, 인터루킨 I 베타, 산화질소와 성장호르몬이 있다.[17] 다른 한편으로 난포 폐쇄를 유도하는 인자로서 안드로젠, 인슐린유사성장인자접합단백, reactive oxygen species, 변환성장인자-베타, 인터루킨-6가 있다.[17] 호르몬, 성장인자, 사이토카인은 난포 성장의 조절인자로서 아마도 세포죽음의 신호를 전달하고 순차적으로 난소의 특정유전자를 활성화시킨다. 따라서 우성난포에 선택된 생존인자들은 생존신호를 전달하고 그리고 이 신호가 Bcl-2와 같은 생존유전자를 활성화시키고 순차적으로 세포죽음을 방지하는 산물을 생산한다. 다른 한편으로 난포의 apoptosis의 진행에 있어, 난포의 퇴화를 유도하는 인자들은 세포죽음 신호를 전달하고 이 신호가 Bax, Fas와 같은 apoptosis를 유도하는 유전자를 활성화시키고 순차적으로 세포죽음을 유도하는 산물을 생산한다. Fas와 Fas-ligand, Bax는 난포퇴화의 조절인자로서의 역할을 할 것이며 Bcl-2는 난소의 난포 성장의 조절인자로서의 역할을 하는 것으로 생각된다. 따라서 이러한 apoptosis와 관련된 단백질은 인간난포의 역동적인 변화에 많은 영향을 주는 조절인자임을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. Annu Rev Physiol 1997; 59: 349-63.
2. Palumbo A, Yeh J. In situ localization of apoptosis in the rat ovary. Biol Reprod 1994; 51: 885-95.
3. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. Endocrinology 1991; 129: 2799-801.
4. Funayama Y, Sasano H, Suzuki T, Tamura M, Fukaya T, Yajima A. Cell turnover in normal cycling human ovary. J Clin Endocrionol Metab 1996; 81: 828-34.
5. Yuan W, Giudice LC. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 3148-55.
6. Owens GP, Hahn WE, Cohen JJ. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. Mol Cell Biol 1991; 11: 4177-88.
7. Lee BS, Yeh J. The molecular basis of follicular atresia: Apoptosis as a possible mechanism. Adv

Contracep Deliv Sys 1996; 2: 269-82.

8. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-Xlong messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology 1995; 136: 232-41.
9. Tilly KI, Banerjee S, Banerjee PP, Tilly JL. Expression of the p53 and Wilms' tumor suppressor genes in the rat ovary: gonadotropin repression in vivo and immunohistochemical localization of nuclear p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. Endocrinology 1995; 136: 1394-402.
10. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the number of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology 1995; 136: 3665-8.
11. Fukaya T, Funayama Y, Muakami T, Sugawara J, Yajima A. Does apoptosis contribute follicular atresia and luteal regression in human ovary? Horm Res 1997; 48 (suppl 3): 20-6.
12. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2/Heterodimerizes In Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell Death. Cell 1993; 74: 609-19.
13. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991; 66: 233-43.
14. Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, et al. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. Endocrinology 1996; 137: 1938-48.
15. Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson KP. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. Biol Reprod 1995; 52: 279-87.
16. Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S, Manabe N, Yonehara S. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. Mol Reprod Dev 1997; 47: 11-8.
17. Kondo H, Mauro T, Peng X, Mochizuki M. Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2702-10.