

Effects of Follicle Stimulating Hormone on γ -Ray Irradiated Immature Mouse Ovarian Follicles

Jin-Kyu Kim, Chang-Joo Lee, Young-Keun Lee,
Kang-Won Song* and Yong-Dal Yoon*

Korea Atomic Energy Research Institute,
*Dept. of Biology, Hanyang University

난포성숙호르몬이 감마선 조사된 미성숙 생쥐 난포에 미치는 영향

김진규 · 이창주 · 이영근 · 송강원* · 윤용달*

한국원자력연구소, *한양대학교 생물학과
(1998년 3월 5일 접수, 1998년 7월 27일 채택)

Abstract - To assess the radioprotective effects of follicle stimulating hormone (FSH) on ovarian follicles, 3 week-old female mice were irradiated with 8.33 Gy of γ -ray (group R) and followed by 5 IU ip-injection of FSH (group RF). For control groups, 5 IU of saline (group C) or 5 IU of FSH (group F) was ip-injected. Ovaries were collected 0h, 6h, 12h, 1d, 2d, 4d, and 8d after irradiation or saline/FSH injection, and followed by fixation in neutral buffered formalin for routine histochemistry. Immunohistochemistry was used to assess the status of follicles and DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis for total DNA. Staining specific for apoptotic follicles showed high intensity at 6h and 12h in group R and RF. On the other hand, staining specific for proliferating follicles showed noticeably high intensity at 8d in group R and RF. DNA fragmentation of 185bp increased with time in all experimental groups. Especially 370bp appeared at 6h in group R, then disappeared after 1d. In case of group RF, it appeared at 12h and disappeared after 1d. From the above results, the irradiated antral follicles become completely disappeared from 4d to 8d, and then new follicles started to grow again at 8d. FSH had delaying or suppressing effects on follicular atresia after irradiation. In addition, it became clear that radiation-induced follicular atresia was mediated by granulosa cell apoptosis.

Key words : γ -radiation, FSH, atresia, apoptosis

요약 - 뇌하수체 분비호르몬인 FSH의 방사선방어 효능을 조사하고자 생후 3주된 미성숙 생쥐에 γ 선을 전신조사하거나(R), 전신조사 후 FSH 5 IU를 복강주사(RF)하였다. 대조군은 동량의 식염수를 복강주사하거나(C) 혹은 FSH를 복강주사(F)하였다. 0시간, 6시간, 12시간 1일, 2일, 4일, 그리고 8일 후에 각 군별로 5마리씩 경추과열로 도살한 후 난소를 채취하였다. 난소는 neutral buffered formalin에 고정된 후 통상적인 표본조직을 만들었다. HE 염색을 기본으로 면역조직화학염색을 비교하였으며 전체 DNA를 추출하여 agarose gel 전기영동을 실시하여 DNA fragmentation의 정도를 알아보았다. 방사선 조사군인 R군과 RF군에 있어서 6시간에서 12시간에 apoptosis를 반영하는 면역조직화학적 염색률이 높게 나타났으며, 8일 경과시 분열세포의 존재비를 반영하는 염색률이 높게 나타났다. 또한 DNA fragmentation의 정도를 보면, 모든 실험군에서 185bp의 DNA ladder가 시간에 따라 증가하는 경향을 보였다. 370bp의 DNA는 R군의 경우 6시간에 나타났으며 1일 이후 감소하였다. RF군의 경우 12시간에 나타나 1일 이후 감소하였다. F군에서는 370bp가 보이지 않았다. 본 실험의 결과, 강소형성 난포가 피폭되는 경우 4일 이후 8일에 이르러 난소내에서 완전히 소멸되고, 8일에 새로운 원시난포가 성장하는 것이 확인되었다. FSH는 방사선에 피폭된 난포의 퇴화를 지연 혹은 억제시키는 방사선방어 효과가 있었으며, 방사선에 의한 난포의 퇴화는 과립세포의 apoptosis를 매개로 하여 일어남을 알 수

있었다.

중심어: γ -방사선, 난포성숙호르몬, 퇴화, 세포자연사

서론

퇴화되는 난포는 과립세포의 핵이 이상응축되며 [1, 2], 협막세포층이 이상비대하거나 스테로이드 합성능이 현저하게 증가되는 등 조직학적, 내분비학적인 특성을 갖는다 [3~6]. 이러한 난소내 난포의 퇴화는 최근 과립세포의 apoptosis에 의하여 매개된다고 보고되고 있다 [7~9].

난포의 퇴화를 인위적으로 유발시키는 방법으로서는 방사선 조사를 들 수 있다. 즉, X선을 조사하거나 [10], 감마선을 조사 [11]하면 흰쥐 및 생쥐 등 설치류의 난소내 난포가 퇴화된다 [12]. 방사선은 세포의 apoptosis를 유발하는 한 요인인 것으로 보고되었다 [13]. 방사선이 apoptosis를 유발하는 것은 세포의 형태, 크기, 성장단계에 따라 차이가 있을 수 있으며, 그 세포가 갖는 내재적인 방사선민감도(radiosensitivity)에 따라 달라진다. 그러므로, 난포의 성장단계에 따라 방사선에 대한 영향이 달라질 수 있는데, 이는 방사선에 피폭되는 순간의 세포 발달상태에 따라 난포내 과립세포의 apoptosis가 달라질 수 있음을 의미한다. 또, 방사선은 세포내 protein kinase C의 활성을 억제함으로써 세포내 ceramide의 농도를 증가시켜 apoptosis를 일으키는 것으로 보고되었다 [14, 15].

난포성숙호르몬(follicle stimulating hormone, FSH)은 과립세포의 유사분열능을 증가시키며, FSH 자신의 수용체 수를 증가시키고, 난포액내 glycosaminoglycan의 분비를 증가시켜 난포의 크기를 증가시키는 작용을 갖는다. 또 FSH는 aromatase의 활성을 증가시키고, 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH) 수용체의 수를 증가시키며, inhibin 등의 여러 다양한 성장인자를 지정하는 유전자의 발현을 유도한다 [16]. 또한, 미성숙개체에 FSH를 투여하게 되면 난포의 성장이 촉진되며, 강소형성난포의 경우 퇴화되는 비율이 감소된다 [17].

그러나 방사선에 의해 유발되는 난포의 퇴화 역시 apoptosis 과정에 의한 것인지에 관해서는 보고된 바가 없다. 즉, 방사선이 어떤 기작에 의해 난소내 난포의 퇴행적인 변화를 유발시키는지 밝혀지지 않았다. 또한 난포의 성숙을 유발하는 요인과 apoptosis를 유발하는 요인이 동시에 난포에 작용하는 경우 난포의 반응에 대해서도 보고된

바가 없다.

그러므로 본 실험은 방사선에 의한 난포의 퇴화가 과립세포의 apoptosis에 의해 매개되는지를 알아보고, 방사선에 피폭됨으로서 유발된 난포의 퇴화가 FSH에 의해 억제 혹은 지연될 수 있는지를 알아보고자 시행되었다.

재료 및 방법

실험동물 및 방사선의 조사

본 실험에서 사용한 생쥐는 서울대학교 실험동물사육실로부터 공급받은 생후 3주된 ICR 품종의 암컷으로서 사료와 물을 충분히 공급하면서 (14시간 조명, 10시간 소등) 일주일 동안 적응시킨 후에 사용하였다.

방사선 조사는 기존에 보고된 방법[12]을 따랐다. 즉, 한국원자력 연구소의 감마선 발생장치(Cobalt-60, 약 1kCi, Atomic Energy Canada Ltd.)를 이용하였다. 방사선원과 실험동물 사이의 거리를 106cm로 일정하게 하고 6.94rad/min의 선량율로 LD₈₀₍₃₀₎이 되는 8.33Gy로 방사선을 조사하였다. 이때의 조사선량은 Friche dosimeter로 측정하였다.

대조군(C), 방사선조사군(R), FSH처리군(F), 방사선조사후 FSH 처리군(RF)으로 구분하여 각각 0시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 4일, 8일군으로 나누었다. FSH는 고순도 FSH(Serono)로서 방사선 조사가 끝난 후 즉시 F군과 RF군에 5 IU를 복강 주사하였다. Ether 마취하에, 난소를 적출 4% paraformaldehyde 혹은 10% neutral buffered formalin에 고정하였다.

난소의 조직절편 제작

고정된 난소는 alcohol로 탈수과정을 거쳐 xylene으로 투명화시킨 후 paraffin으로 포매하였으며 박편절단기(microtome, Lipshaw)를 사용, 6 μ m로 박절하였다. 모든 난소의 절편은 가장 큰 절편(largest cross sectionate)을 이용하였다. 일부 절편은 대조를 위해 hematoxylin-eosin으로 일반 염색을 한 후, Canada balsam (Wako)으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다.

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunohistochemistry

Xylene과 ethanol에서 탈파라핀시킨 절편을 3% H₂O₂-methanol 용액에 10분간 처리하여 endogenous peroxidase를 제거했다. 대조군은 LSAB kit (DAKO K-680)내의 blocking serum으로 10분간 처리하였다. Primary antibody (monoclonal, NCL-PCNA, Novocastra Lab., Newcastle upon Tyne, UK)를 조직에 충분히 도포한 후, 조직이 마르지 않도록 실온의 습윤상자 안에서 18시간 동안 반응시킨 다음, Tris buffer, pH 7.2 (DAKO S-3001)에 5분간 3회 수세하였다. 2차항체인 biotinylated rabbit anti mouse IgG (1/250)를 조직에 충분히 도포한 후 실온의 습윤상자 안에서 10분간 반응시킨 다음, Tris buffer, pH 7.2 (DAKO S-3001)에 5분간 3회 수세했다. Streptavidin labeled horseradish peroxidase를 조직에 충분히 도포한 후 37°C의 습윤상자 안에서 20분간 반응시킨 다음, Tris buffer, pH 7.29 (DAKO S-3001)에 5분간 3회 수세했다. Diaminobenzidine (DAB, Research Genetics Co.)로써 10분간 발색시킨 다음 Harris hematoxylin으로 핵 염색을 실시하였다. Ethanol 및 acetone, xylene으로 탈수와 투명화시킨 후 polymount (Polyscience)로 봉입하여 현미경으로 관독하였다.

In situ 3'-end labeling immunohistochemistry

In situ 3'-end labeling은 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) 방법에 의한 *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag; Oncor, Gaithersburg, MD)를 사용하였다. 조직절편을 xylene에서 paraffin을 제거하고 alcohol과정을 거쳐 물에 세척한 후 슬라이드 위에 500 μ l의 PBS를 처리하여 37°C에서 30분간 배양하였다. PBS를 제거한 후에 250 μ l의 proteinase K (PK) 용액을 슬라이드에 떨어뜨려 37°C에서 30분간 배양한 후 물에 수세하였다. 50 μ l의 TdT buffer를 처리하여 실온에서 10분간 배양한 후 TdT buffer를 제거하고, 50 μ l의 TdT solution (TdT buffer 45 μ l, biotin-dUTP 2.5 μ l, TdT 2.5 μ l)을 처리하여 37°C에서 60분간 배양하였다. TdT 용액을 제거한 후 TB 용액에서 15분간 배양하여 물로 잘 세척하고, 50 μ l의 blocking solution에서 10분간 실온배양하였다. Peroxidase가 접합된 streptavidin에 30분간 반응시키고, Tris saline에 세척하였다. 100 μ l의 0.3% methyl green으로 3분간 counter staining

하였으며, 염색 후 흡수종이로 슬라이드 위에 염색액을 제거하였다. 즉시 xylene 과정을 거친 다음 Canada balsam으로 봉입하였다.

DNA fragmentation analysis

12.5 μ l의 10% SDS를 넣고 65°C에서 30분간 방치하였다. 여기에 35 μ l의 8M potassium acetate를 넣고 시료를 잘 섞은 후 60분간 단백질이 가라앉도록 얼음에 방치한 후 시료를 4°C, 5,000 x g 에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 1.5ml의 미량 원심분리 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 1.5ml의 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 x g로 30분간 원심분리하여 DNA를 추출하고 침전물은 50 μ l의 1x TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 용해시킨 후 1 μ l의 DNase-free RNase (500 μ g/ml; Boehringer-Mannheim, IN)를 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 3M sodium acetate와 0°C에 보관한 2.5배의 100% ethanol로 DNA를 침전시키고, -60°C 초저온 냉동고에서 적어도 60분이상 방치시켰다. 이것을 4°C에서 14,000 x g로 30분간 원심분리하고, 0°C에 보관된 0.2ml의 80% ethanol로 세척하고 Speed-Vac concentrator (Savant Instrument, NY)로 15분간 진공하에서 건조시켰다. 압축결정물을 25 μ l의 증류수에 녹이고, 260nm의 흡광도에서 DNA의 양을 측정한 다음 -20°C에 보관하였다. 이렇게 추출된 DNA를 lane 당 5 μ g의 농도로 2% agarose gel에 loading하고, running buffer로는 TBE용액을 사용하였으며, 50V에서 3시간 동안 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 transilluminator로 확인하였다.

통계분석

통계적 유의성은 Student *t* test로 각 군간을 비교하였으며, *p*가 0.05보다 적은 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

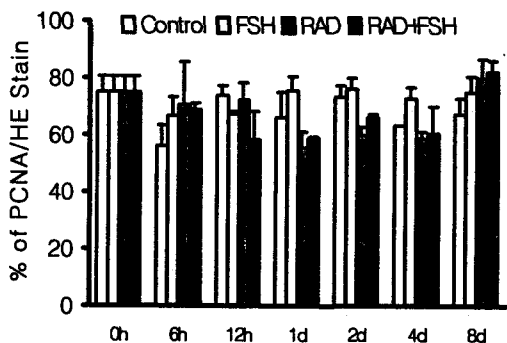


Fig. 1. Percent (%) of PCNA-stained follicles to HE-stained total follicles of irradiated mouse ovaries. h, hour; d, day. Bar represents standard error of the mean. Each experimental group had 5 individuals.

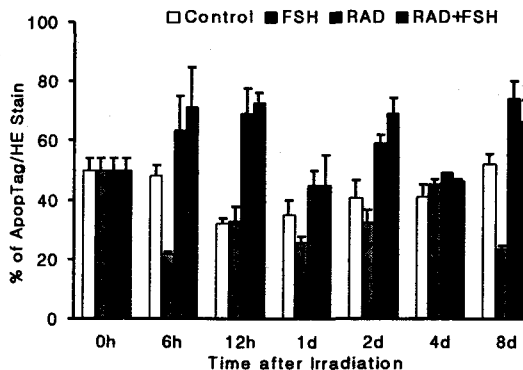


Fig. 2. Percent (%) of *in situ* 3'-end labelled follicles to HE-stained total follicles of irradiated mouse ovaries. h, hour; d, day. Bar represents standard error of the mean. Each experimental group had 5 individuals.

결 과

실험동물의 생존율

방사선 조사에 따른 생쥐의 반치사선량(LD₅₀₍₃₀₎)을 결정하기 위하여 15 마리씩의 생쥐를 0.5 Gy/min의 선량률로 0, 2.5, 5.0, 7.5 그리고 10.0 Gy를 조사한 후 30일 간의 생존율을 조사하였다. 방사선조사에 따른 선량반응관계는 일반적으로 선형-이차함수(linear-quadratic equation)로 표현할 수 있으나 본 연구에서는 0~10 Gy 선량범위에 대하여 (1)식과 같은 일차함수적인 선형관계식을 사용하여 실험결과를 표현하였다. 산출된 반응관계식의 회기계수는 0.97로서 실험결과에 대한 선량반응관계 수립의 적정성을 나타내었다. 이러한 선량반응관계식을 근거로 산정된 반치사선량 LD₅₀₍₃₀₎은 7.29 Gy였으며, 80% 치사선량 LD₈₀₍₃₀₎은 8.33 Gy였다.

$$S = 96.667 - 0.064D \quad (r^2 = 0.97, n = 5) \quad (1)$$

여기서, S : 생존율, D : 방사선량(Gy)이다.

실험동물의 체중 및 난소중 변화

방사선 조사후 시간에 따른 체중 및 난소의 무게변화를 각각 Table 1과 Table 2에 나타내었다. 방사선을 조사하지 않은 C군과 F군에서는 시간경과에 따라 체중이 점차 증가하는 경향을 보였다. 그러나 방사선이 조사된 실험군에 있어서는 시간경과에 따른 체중증가 양상이 뚜렷하지 않을 뿐

아니라 8일째에 이르러서는 C군 체중에 비해 63% (R군) 및 72% (RF군) 수준에 머무는 유의한 차이 ($p < 0.05$)를 나타내었다. 좌·우측 난소 무게에 있어서도 C군과 F군은 시간변화에 따른 증가양상을 보였으나 R군 및 RF군에 있어서는 방사선 조사 1일 경과후 난소 무게가 감소하기 시작하여 8일에 이르러서는 대조군에 비해 뚜렷한 중량 감소를 나타내었다 ($p < 0.05$).

Table 1. Change of body weights (g) of control (C), FSH-injected, irradiated, and irradiated and FSH-injected immature female mice.

Time	C	F	R	RF
0h	10.96±1.17	10.96±1.17	10.96±1.17	10.96±1.17
6h	8.98±0.92	9.64±2.16	11.26±1.58	9.22±1.18
12h	10.00±1.34	9.12±0.99	11.30±1.90	9.16±2.18
1d	14.16±2.04	11.50±2.00	12.28±1.98	12.70±0.95
2d	11.76±1.08	11.88±1.57	11.86±0.48	11.76±1.70
4d	12.80±1.48	12.22±1.07	11.42±0.50	12.50±1.89
8d	19.96±2.22	16.38±2.08	*12.50±2.18	*14.46±2.12

#, Data are expressed mean±SEM (g). *, Significantly different from control ($p < 0.05$). C, control; F, FSH injected group; R, irradiated group; RF, irradiated and FSH injected group. Number of experiments are 5 individuals in each group. h and d mean hour and day, respectively.

Table 2. Changes of ovarian weights (mg) of control (C), FSH-injected, irradiated, and irradiated and FSH-injected immature female mice.

Time	C		F		R		RF	
	LO	RO	LO	RO	LO	RO	LO	RO
0	*1.20±0.56	1.21±0.67	1.20±0.56	1.21±0.67	1.20±0.56	1.21±0.67	1.20±0.56	1.21±0.67
6h	1.02±0.34	1.40±0.55	1.40±0.17	1.32±0.38	0.96±0.33	1.30±0.41	1.88±0.42	1.62±0.41
12h	1.48±0.22	1.58±0.25	1.32±0.15	1.32±0.33	1.24±0.24	1.36±0.51	1.46±0.27	1.30±0.49
1d	1.94±0.48	1.76±0.45	1.78±0.53	1.78±0.40	1.06±0.23	1.08±0.13	1.20±0.31	1.58±0.57
2d	1.64±0.31	1.70±0.53	1.58±0.20	1.84±0.40	1.14±0.23	1.08±0.26	1.26±0.34	1.30±0.28
4d	1.94±0.46	1.92±0.61	2.08±0.52	1.66±0.79	1.18±0.22	1.08±0.28	1.42±0.17	1.36±0.34
8d	2.24±0.77	2.20±0.89	2.02±0.58	1.66±0.44	*0.53±0.32	*0.68±0.25	1.30±0.30	1.16±0.34

#, Data are expressed mean±SD (mg). *, Significantly different from control (p<0.05). LO and RO mean left ovarian weight and right ovarian weight, respectively. C, control; F, FSH injected group; R, irradiated group; RF, irradiated and FSH injected group. Number of experiments are 5 individuals in each group. h and d mean hour and day, respectively.

Table 3. Immunohistochemistry of ovarian sections obtained from immature mice.

Group	histochemistry	6h	12h	1d	2d
C	PCNA	++	+	+	+
	TUNEL	+	+	+	+
F	PCNA	+++	++	+	+
	TUNEL	+	+	-	-
R	PCNA	-	+	+	+
	TUNEL	+++	++	+	-
RF	PCNA	++	+	+	++
	TUNEL	++	++	+	-

C; control; F: FSH treated; R: irradiated; RF: FSH treatment after irradiation. PCNA; proliferative cell nuclear antigen staining. TUNEL; *in situ* 3'-end labeling. +++ very intensive; ++ intensive; + normal; - weak

면역)조직화학적 관찰결과

PCNA, *in situ* 3'-end labeling, 그리고 HE에 의한 (면역)조직화학적 염색의 결과를 Table 3에 나타내었다. 최대조직절편내 PCNA에 의해 염색된 난포를 HE에 염색된 전체 난포로 나눈 값 (PCNA/Total follicle No. x 100)을 Fig. 1로 나타내었다. PCNA에 의한 염색의 정도는 F군의 경우 1일 이후 4일까지 높게 나타났으며, 8일에는 R군과 RF군에서 증가하는 경향을 보였다.

최대조직절편내 *in situ* 3'-end labelling 방법에 의해 염색된 난포의 수를 전체 난포의 수로 나눈 값 (ApopTag/Total follicle No. x 100)을 Fig. 2에

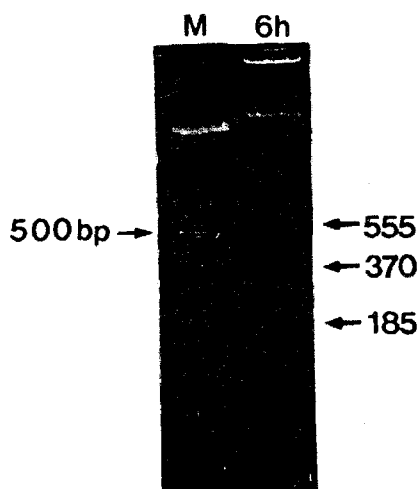


Fig. 3. DNA fragmentation analysis showing radiation-induced atresia were mediated by apoptosis. M, marker. DNA of mouse ovaries at 6h after irradiation was extracted and electrophoresed to show the fragmentation pattern.

나타내었다. F군의 경우 6h이후 4d를 제외하고 다른 군에 비해 상대적으로 낮은 값을 보인 반면, R군과 RF군은 6h에서 12h에 높은 값을 보였고, 8d에서 다시 증가하였다.

DNA fragmentation 분석 결과

방사선 조사후 6시간 경과시 난소로부터 추출한

DNA를 전기영동하여 DNA fragmentation의 양상을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. DNA가 185, 370 및 555bp로 분절됨으로써 방사선 조사에 의한 영향을 반영하였다. 모든 실험군에서 185bp의 DNA ladder가 시간에 따라 증가하는 경향을 보였다. 방사선 조사에 따라 유발되는 apoptosis를 특징적으로 반영하는 370bp의 DNA 분절의 경우 방사선 조사군에 있어 6시간에 나타나서 1일 이후 감소한 반면, 방사선 조사후 FSH를 처리한 RF군에 있어서는 370bp의 분절이 12시간에 나타나 1일 이후 감소하는 현상을 보였다(Fig.4). 두 실험군간 370bp 분절이 나타나는 데 6시간의 시차가 나타난 것은 FSH의 처리가 방사선에 의한 DNA분절에 영향을 미치고 있다는 것을 반증하는 결과이다.

논 의

본 실험에서 FSH를 주사함으로써 방사선에 의한 난포 퇴화가 억제 혹은 지연되는 효과를 관찰할 수 있었다. 이는 방사선 조사 후 즉시 주입된 FSH가 난소내 FSH 수용체에 결합함으로써 그 영향을 나타낸 때문인 것으로 생각된다. PCNA immunohistochemistry는 세포주기중 G₁, S, G₂, M시기에 검출되므로 분열하는 세포에만 특이적으로 염색되는 면역조직화학적 방법이며, ApopTag은 작은 조각으로 잘려진 DNA의 3'-말단에 결합함으로써 apoptosis 혹은 necrosis가 일어난 세포에만 염색되는 면역조직화학적 염색방법이다. PCNA와 ApopTag에 모두 염색되는 경우는 난포가 동시적으로 상반된 두 종류의 신호, 즉 apoptosis 유발인자와 성장인자에 노출된 경우, 난포의 반응은 두가지 모두에 영향을 받는 것이라 할 수 있다.

최근, 조류의 경우, ceramide의 처리나 혹은 UV radiation으로 과립세포의 apoptosis가 증가된다는 보고가 있다 [18]. Guinea pig의 경우, estrus cycle의 초기에 방사선 조사를 받은 경우에는 염색체 손상의 빈도가 낮으나, estrus cycle의 중간에 조사를 받은 경우의 난자는 염색체의 손상이 높아져 수일 내에 소멸된다 [19].

흰쥐에서 방사선조사에 의해 뇌하수체호르몬 분비세포에 손상을 입은 결과 FSH와 LH의 혈청내 농도가 감소하고 [10], 방사선조사를 받은 양의 경우, tertiary follicle이 퇴화되며, 또 뇌하수체의 gonadotrophic hormone 분비세포도 감소한다는 보고 [20]에 비추어 볼 때 RF군에서 apoptosis의 지연 혹은 방어 효과는 주입된 FSH의 영향이라

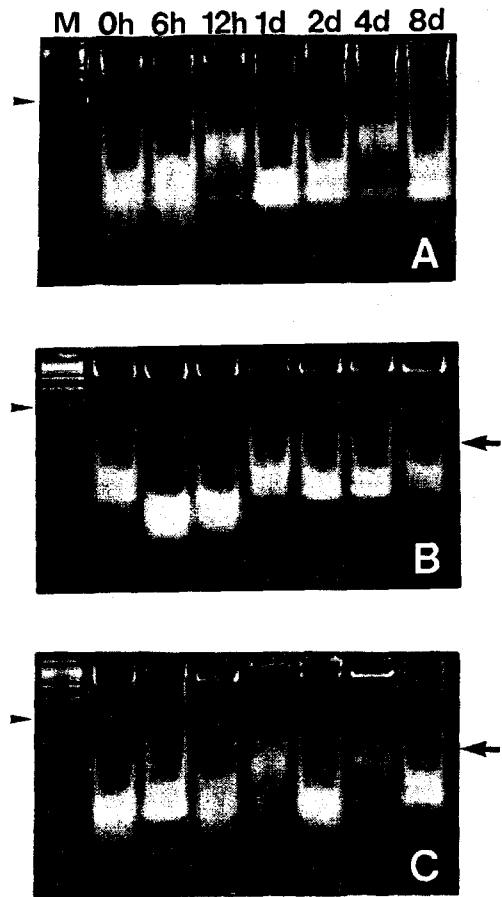


Fig. 4. DNA fragmentation analysis showing the delay effect of FSH on radiation-induced apoptosis. M, marker. In case of irradiation, DNA of mouse ovaries at 6h began fragmentation, but in case of irradiation and FSH treatment, DNA fragmentation began to show after 12h. Arrows, 370base pair(bp); arrow head, 1,000bp.

할 수 있다. 인간의 경우, 방사선조사에 의해 small follicle에 손상이 일어나며 [21], FSH는 초기강소난포의 apoptosis를 억제하는 성장요인이라 보고되었다 [22]. 본 실험의 결과, FSH를 처리한 48시간 군에서 최대의 난포성장이 관찰되었으나, 이 후에 퇴화되는 난포의 빈도가 증가하였고, 방사선을 조사한 경우에는 6시간부터 퇴화난포가 관찰되어 이후 증가되었으며 8일에는 성장하는 난포가 관찰되었다. 그러나 방사선을 조사한 후 FSH를 처리한 군에서는 퇴화난포의 빈도가 12시간부터 나타나 1일 이후에 감소하였다. 이는 방사

선 조사로 인한 난포의 퇴화가 FSH에 의해 지연된 결과라 할 수 있다.

방사선이 직접적으로 DNA에 손상을 주어 자연 세포사를 유도하는 것이 아니라 세포막에 영향을 줌으로서 세포의 apoptosis를 증가시킬 것이라는 보고 [14]를 볼 때, 방사선에 전신노출되는 경우, 뇌하수체호르몬의 분비감소와 함께 과립세포가 직접적으로 영향을 받음으로서 난포의 퇴화가 유발되는 것으로 생각된다. 또한, 과립세포가 apoptosis됨으로서 퇴화가 진행된다는 것을 보여주는 185bp 및 370bp의 DNA 분절이 방사선조사군의 경우 6시간, 방사선 조사후 FSH를 투여한 군의 경우 12시간에 증가됨을 관찰함으로써, 방사선에 의한 난포의 퇴화 역시 apoptosis를 매개로 하여 일어남을 알 수 있었다.

본 실험의 결과, 감소형성난포가 피폭되는 경우 4일 이후 8일에 이르러 난소 내에서 완전히 소멸되는 것이 관찰되었다. 8일에 새로운 난포가 성장하는 것을 볼 수 있었는데, 이는 초기감소형성난포 뿐 아니라 방사선에 민감성을 갖는 원시난포 (radiosensitive primordial follicles) 모두 방사선에 의해 퇴화되며, 방사선에 대해 저항성(radioresistant)을 갖는 것으로 생각되는 원시난포가 성장함을 의미한다. 결론적으로 FSH는 방사선에 피폭된 난소내 난포의 퇴화를 지연 및 억제시키는 효과를 갖고 있음을 알 수 있었으며, 방사선에 의한 난포의 퇴화는 과립세포의 apoptosis를 매개로 하여 일어남을 알 수 있었다. 방사선을 이용하여 과립세포의 apoptosis 과정에 대한 상세한 분석연구가 가능할 것으로 생각하며, 추후 본 연구의 실험조건을 이용하여, 원시난포의 성장개시 기작 및 스테로이드생합성의 변화 등에 대한 연구가 이뤄질 경우 고등동물 난소내 난포 폐쇄에 관한 상세기작을 밝힐 수 있을 것이다.

결론

방사선에 의해 유발되는 난포의 퇴화가 apoptosis 과정에 의한 것임이 DNA 분절화 분석, TUNEL 면역조직화학염색에 의한 *in situ* 3'-end labeling 등에 의해 확인되었다. 한편, FSH는 방사선에 피폭된 생쥐난소의 apoptotic degeneration을 지연 혹은 억제시키는 효과를 갖고 있음도 확인되었다. 방사선에 피폭된 후 두 번의 생식주기를 거치는 동안 퇴화난포는 난소에서 제거되며, 새로운 난포가 성장함을 관찰할 수 있었다. 이는 방사선에 민감한 원시난포 이상의 난포 모두가 퇴화되

나, 방사선에 저항성을 보이는 원시난포는 이 후 성장을 계속할 수 있음을 의미한다. 생쥐의 난포는 방사선의 영향을 분석하기 위한 좋은 동물 모델로서의 가능성을 충분히 가지고 있다고 사료되며, 추후 과립세포의 radiation-induced apoptosis 과정에 대한 연구가 좀 더 이루어져야 한다고 생각된다. 또한 본 조건을 이용하여, 원시난포의 성장개시 및 억제기작 등에 대한 연구도 진행될 수 있을 것으로 판단되며, 본 실험모델은 생식세포에 대한 방사선의 작용기작, 방사선 방어제 개발 및 그 기작의 규명 등을 연구하는데 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

* 본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. M. J. Koering, A. L. Goodman, R. F. Williams and G. D. Hodgen, "Granulosa cell pyknosis in the dominant follicle of monkeys." *Fert. Steril.* **37**, 837-844(1982).
2. C. J. Lee, Y. D. Yoon, J. H. Kim and M. K. Kim, "The relationship between the pyknosis of granulosa cells and the change of steroid concentration in porcine ovarian follicles." *Kor. J. Fertil. Steril.* **16**, 35-40(1989).
3. G. S. Greenwald and P. F. Terranova, "Follicular selection and its control." in : *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. Neil, eds., pp387-445, Raven Press, New York (1988).
4. M. K. Kim, Y. H. Lee, J. H. Kim and Y. D. Yoon, "A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia." *Korean J. Zool.* **30**, 351-370(1987).
5. Y. K. Lee and Y. D. Yoon, "Changes of the concentrations of steroid hormones in the porcine follicular fluids on atresia." *Kor. J. Fertil. Steril.* **12**, 83-98(1985).
6. Y. D. Yoon, C. J. Lee, B. R. Do, J. H. Kim and M. K. Kim, "Biochemical studies on the metabolism of follicular maturation (II): Protein composition and steroid concentration in individually isolated medium-sized follicu-

- lar fluid of pig ovary." *Kor. J. Zool.* **33**, 63-69(1990).
7. A. J. W. Hsueh, H. Billig and A. Tsafri, "Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process." *Endocrine Rev.* **15**, 707-724(1994).
 8. A. L. Johnson, J. T. Bridgham, J. P. Witty and J. L. Tilly, "Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-xlong gene expression." *Endocrinology* **137**, 2059-2066(1996).
 9. J. L. Tilly, K. I. Tilly, M. L. Klenton and A. L. Johnson, "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* **136**, 232-241 (1995).
 10. J. Jarrell, E. V. YoungLai, A. McMahon, R. Barr, G. O'Connell and L. Belbeck, "Effects of ionizing radiation and pretreatment with [D-Leu6,des-Gly10] luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on developing rat ovarian follicles." *Cancer Res.* **47**, 5005-5008(1987).
 11. J. S. Shin, Y. K. Lee, M. K. Kim and Y. D. Yoon, "Changes of serum steroid level in the whole-body irradiated rat." *Kor. J. Fertil. Steril.* **21**, 297-303(1994).
 12. Y. K. Lee, J. K. Kim and Y. D. Yoon, " γ -ray effects on steroid hormone concentration of mouse ovarian follicles." *J. Korean Assoc. Radiat. Prot.* **19**, 179-188(1994).
 13. J. H. Hendry and C. M. West, "Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response." *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 709-719(1997).
 14. A. Haimovitz-Friedman, C. C. Kan, D. Ehleiter, R. S. Persaud, M. McLoughlin, Z. Fuks and R. N. Kolesnick, "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis." *J. Exp. Med.* **180**, 525-535(1994).
 15. J. Quintans, J. Kilkus, C. L. McShan, A. R. Gottschalk and G. Dawson, "Ceramide mediates the apoptotic response of WEHI 231 cells to anti-immunoglobulin, corticosteroids and irradiation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 710-714(1994).
 16. F. Schelle and J. Schoemaker, "The role of follicle-stimulating hormone in the selection of follicles in human ovaries: a survey of the literature and a proposed model." *Gynecol. Endocrinol.* **10**, 55-66(1996).
 17. S. M. Harman, J. P. Louvet and G. T. Ross, "Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia." *Endocrinology* **96**, 1145-1152(1975).
 18. J. P. Witty, J. T. Bridgham and A. L. Johnson, "Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide." *Endocrinology* **137**, 5269-5277(1996).
 19. P. Jacquet, L. de Saint-Georges, J. Buset, S. Baatout, J. Vankerkom and L. Bagnat-Mahieu, "Cytogenetic effects of X-rays in the guinea pig female germ cells. II. The maturing oocyte." *Mutat. Res.* **391**, 193-199 (1997).
 20. J. Arendarcik, M. Tokos, M. Praslicka and J. Balun, "The effect of graduated radiation doses on the follicular apparatus of the ovaries and the adenohipophysis in sheep." *Vet. Med. (Praha)* **28**, 597-604(1983).
 21. H. Peters, A. G. Byskov and J. Grinstead, "Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates." *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **7**, 469-85(1978).
 22. S. Y. Chun, K. M. Eisenhauer, S. Minami, H. Billig, E. Perlas and A. J. Hsueh, "Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor." *Endocrinology* **137**, 1447-1456(1996).