

Acute Degeneration of Primordial Follicles in Mouse Ovary after Whole-Body Irradiation

Chang Joo Lee, Ho Hyun Park*, Yong-Dal Yoon*,
Yeon Ku Kim, Jin Kyu Kim
Korea Atomic Energy Research Institute
¹Department of Biology, Hanyang University

전신조사된 생쥐 난소내 원시난포의 급성 퇴화

이창주 · 박호현* · 윤용달* · 김연구 · 김진규

한국원자력연구소, *한양대학교 생물학과
(1999년 6월 1일 접수, 1999년 7월 30일 채택)

Abstract - The present study was carried out to evaluate the morphological changes in the degenerating primordial follicles induced by γ -radiation. The prepubertal female mice of three weeks old ICR strain were whole-body irradiated with a dose of LD₈₀₍₃₀₎ (8.3 Gy). The ovaries were collected at 0 h, 3 h, 6 h, and 12 h post-irradiation. The largest cross sections were prepared with histological semi-thin sections and then observed microscopically. The ratio of normal to atretic follicles was reduced significantly after 6h post-irradiation. At 6 h post-irradiation, the number of degenerated primordial follicles increased. Germinal vesicles disappeared, and lipid droplets increased. No more ooplasmic membranes were seen. Granulosa cells became round in shape, and apoptotic cells started to appear. The ratio of normal to atretic follicles in the control group was 62.50 %. The ratio decreased with time after irradiation. The ratio decreased down to 51.61 %, 48.97 %, 11.11 %, and 7.14 % at 0 h, 3 h, 6 h, and 12 h, respectively. Taken together, ionizing radiation acutely induced the degeneration of primordial follicles. The patterns of degeneration are 1) apoptosis of one or more granulosa cells with relatively intact oocyte, 2) apoptosis of oocyte with intact follicle cells, or 3) apoptotic degenerations of both cells. The present study can provide morphological clues for the identification of degenerating primordial follicles.

Key words : degeneration, mouse, primordial follicle, radiation

요약 - 본 연구는 감마선 조사 후 원시난포의 퇴화과정에서 나타나는 형태학적인 변화를 알아보기 위하여 시행되었다. ICR 계통의 생후 3 주된 미성숙 생쥐에 LD₈₀₍₃₀₎의 선량인 8.3 Gy를 2 시간 동안 전신조사하였다. 방사선 조사 후 0 시간, 3 시간, 6 시간, 그리고 12 시간에 난소를 적출하여 조직절편을 제작한 후 가장 큰 절편을 관찰하였다. 정상 대 퇴화 난포의 비율은 조사 후 6 시간에 유의하게 감소하였다. 6 시간에 퇴화된 원시난포의 수가 증가하였으며, germinal vesicle이 관찰되지 않거나, 지질방울이 증가하였으며, 난막이 사라진 것을 알 수 있었다. 과립세포의 모양은 둥글게 변하였으며, 세포자연사하는 세포가 관찰되었다. 대조군의 경우 정상 대 퇴화 원시난포의 비율이 62.50 %이었으나, 이 비율은 0 시간, 3 시간, 6 시간, 12 시간에 각각 51.61 %, 48.97 %, 11.11 %, 7.14 %로 감소하였다. 결론적으로, 방사선에 의해서 원시난포에 퇴화가 유발되는 데 그 양상은 세 가지 유형을 나타내었다. 과립세포의 모양은 정상적이나 난자의 세포자연사, 난자의 형태는 정상적이나 한 개 혹은 그 이상의 과립세포가 세포자연사하는 경우, 혹은 난자와 과립세포 모두가 세포자연사 과정을 겪는 경우를 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 원시난포 퇴화를 형태학적으로 규명할 수 있는 단서가 제시되었다.

중심어 : 방사선, 생쥐, 원시난포, 퇴화

서론

원시난포 (primordial follicle)는 한 개의 난자와 이를 둘러싼 한 층의 편평한 체세포로 구성된 난소 내에서 가장 작은 난포로서 [1], 설치류의 경우 출생직후에 형성된다 [2]. 원시난포는 현재까지 알려지지 않은 기전에 의해 일차난포로 성장을 개시하며, 그 결과 이차난포가 형성되고 이 후 강소형성난포로 발달한다. 원시난포의 대부분은 휴지상태로서 성장이 중지된 난포 집단을 형성하는데, 암컷의 생식가능 전 기간에 걸쳐 점차적으로 고갈된다.

원시난포는 난자가 소실되거나 혹은 성장이 개시되기 때문에 점차적으로 그 수가 감소된다 [3]. 포유류의 난소 내 대부분의 난포는 atresia라는 퇴화과정을 통해 소멸되지만 [4] 이러한 난포 퇴화의 정확한 기전은 밝혀지지 않았다. 퇴화난포의 형태학적인 특징으로는 과립세포 핵의 응축, 과립세포 증식률의 감소, 그리고 기저막의 붕괴 등이 있다 [5, 6]. 그러나, 전술한 바와 같은 퇴화난포의 특징은 이미 성장을 개시한 난포가 퇴화하는 형태학적인 특징이다. 포유류의 난소에서 나타나는 난포 퇴화에는 두 종류가 있는데, 하나는 attrition이라는 생식세포의 퇴화로서 이 과정을 통해 특히 출생 전의 난자가 소멸되는 것이며 [7] 다른 하나는 atresia라는 과정으로서 특히 출생 후에 발생하는 난포의 퇴화이다 [8].

최근 난포의 퇴화는 내분비학적으로 조절되는 세포자연사 (apoptosis)의 과정으로서 퇴화되는 난포는 협동적인 양상으로서 난소에서 소멸된다고 보고되었으며 [9], 과립세포의 핵 응축현상은 세포자연사의 한 과정인 것으로 알려져 있다 [10~12]. 세포자연사는 조직 내 정상적인 세포의 항상성 (homeostasis) 유지를 위해 면역학적 반응이 유발되지 않는 [13] 생리학적 과정이다 [8]. 정상적인 조직 혹은 종양세포에 있어 세포자연사는 우연히 발생할 뿐 만 아니라 이온화방사선의 조사에 의해서도 발생하는 것으로 보고되고 있다 [14]. 이온화방사선은 세포의 자연사를 유발할 뿐 아니라 난소의 생리학적인 활성화에도 영향을 미친다 [15]. 흰쥐의 난소에 있어 원시난포는 성장 중인 난포에 비해 방사선에 보다 더 민감한 것으로 보고되고 있다 [16]. 그러나 현재까지 이온화방사선에 의해 유발되는 원시난포의 형태학적 특징 변화에 관한 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서, 본 연구는 고선량의 이온화방사선을 전신조사한 생쥐 원시난포의 변화를 규명하기 위한 조직학적 근거를 마련하

고자 시행되었다.

재료 및 방법

생식주기에 따른 교란요인을 없애기 위해 생후 3주된 미성숙 생쥐 (ICR 계통)를 본 실험에 사용하였다. 생쥐는 한국화학연구소에서 구입하였으며 감마선을 전신조사하였다. 감마선의 조사는 기보 고된 방법 [17]에 따라 한국원자력연구소의 감마선 발생장치 (Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)를 이용하여 시행하였다. 또한 조사선량은 김 등 (1998) [18]에 의하여 설정된 선량-반응식을 기준으로 단기간 내에 생식세포에 변화를 유발하기에 충분한 선량을 택하였다. ^{60}Co 선원의 강도는 약 1.5×10^{14} Bq, 선량률은 6.9cGy/min 이었으며 조사시간은 총 2 시간으로 실험동물이 받은 방사선량은 조사된 개체의 80%가 30 일 내에 사망하는 선량인 8.3 Gy였다.

감마선의 조사 이후에, 각 군의 생쥐들은 23 °C로 조절된 동물사육실 내에 보관하였다. 이 기간 동안 물과 사료는 충분히 공급하였다. 조사 2 시간 전, 조사 후 0 시간, 3 시간, 6 시간, 그리고 12 시간에 각각의 실험군 및 대조군 내 생쥐 (실험군 당 5마리)를 경추파괴로 도살하였다. 난소를 적출한 후 원시난포의 구조적 변화를 관찰하기 위하여 고정하였다.

퇴화에 따른 원시 난포세포의 미세구조적 변화를 관찰하기 위하여 이온화방사선 조사 후 시간에 따라 적출한 좌측 난소의 전고정 (2.5% glutaraldehyde / 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3)을 실시하였다. 전고정이 끝난 시료는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3)로 10 분씩 3 회 세척한 후, 후고정액인 osmium tetroxide (OsO_4)에 옮겨 4 °C에 2 시간 동안 고정하고 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 이 조직편을 저농도 (50%)에서 단계적으로 고농도 (100%) alcohol 과정을 거쳐 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 epon 혼합액 [Poly/Bed 812 resin (Epon 812) : Dodecylsuccinic Anhydride : Nadic Methyl Anhydride : 2, 4, 6-Tri(dimethylaminomethyl) phenol (DMP-30) = 19.3 : 12.3 : 9.4 : 0.6ml, Polysciences Inc.]에 포매하여 60 °C에서 72 시간 동안 열중합시켰다.

각 시료는 초박절편편기를 사용하여 1 μm 두께의 semi-thin 절편을 만들었다. 1% borax 수용액 내 1% toluidine blue O로 염색한 후 광학현미경 (Zeiss)으로 확인하여 선택하였다. 가장 큰 절편을 선택하여 광학현미경하에서, 정상과 퇴화 난포의

수를 측정된 후 그 비율을 구하였다. 정상적인 과립세포가 건강한 난자를 둘러싸고 있는 원시난포를 정상난포로 구분하였다. 난자의 모양이 주름이 잡혀 있거나, 핵이 응축된 하나이상 과립세포가 존재하거나, 혹은 난자가 세포자연사하는 경우 이를

퇴화 난포로 판정하였다 (Table 1). 정상 대 퇴화 원시난포의 비율은 평균±표준오차로 나타내었다. 통계적 검증은 Student's *t* test를 통하여 실시하였으며 p값이 0.05 보다 작은 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

Table 1. Criteria for the identification of normal and atretic primordial follicles used in the present experiment

| Objects | Normal | Atretic |
|----------------------|----------------|-----------------------|
| Granulosa cell shape | Flattened | Irregular, apoptotic |
| Germinal vesicle | Round | Irregular, absent |
| Ooplasmic membrane | Clear, regular | Unclear, irregular |
| Ooplasm | Even, clear | Uneven, unclear, dark |
| Basement membrane | Clear, regular | Unclear, irregular |
| Nucleolus | Clear | Unclear |

결과 및 고찰

이온화방사선에 의해 유발된 원시난포의 퇴화현상을 형태학적으로 규명하기 위해 수행된 실험연구

의 결과는 다음과 같다. 정상적인 상태의 원시난포는 Fig. 1의 A에서 보는 바와 같이 편평한 과립세포에 의해 둘러싸인 난자를 갖고 있으며, 난자의 세포질 내에 미토콘드리아가 균일하게 분포되어

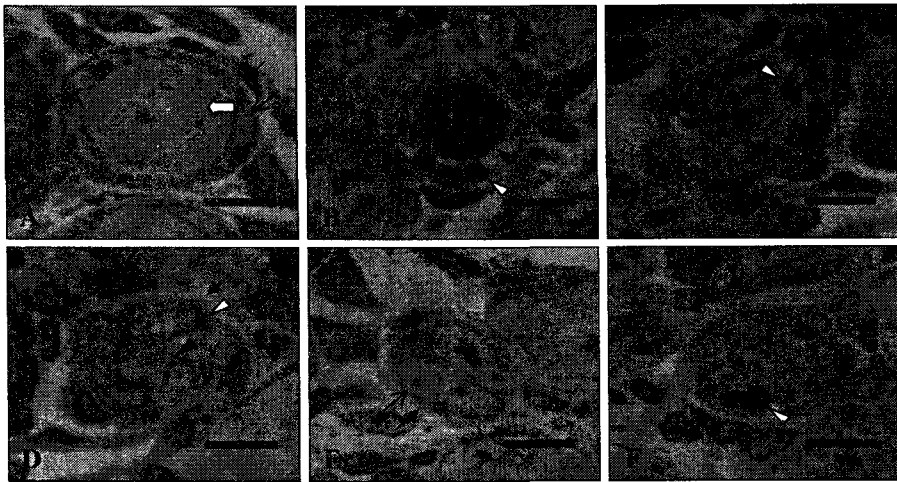


Fig. 1. Microphotographs of primordial follicles in the irradiated or the control immature mouse ovary. The largest cross sections of the whole ovarian slices were observed in the present study. A, Normal primordial follicle in the control mouse; B, primordial follicle with the pyknotic or apoptotic oocyte and granulosa cells at 6h post irradiation; C, primordial follicle with a damaged but relatively normal oocyte and a pyknotic or apoptotic granulosa cell at 6h post irradiation; D, primordial follicle with remnant of oocyte, and filled with granulosa-like cells at 6h post irradiation; E, primordial follicle with only two granulosa cells in the control mouse ovary; and F, primordial follicle without oocyte and two pyknotic or apoptotic granulosa cells at 6h post irradiation. Arrows, basement membrane; white block arrow, oocyte nuclear membrane; thin arrows, granulosa cells; white arrow heads, apoptotic or pyknotic granulosa cells; arrow heads, apoptotic or pyknotic oocyte nucleus. Bars, 10µm.

있음을 알 수 있었다. 방사선조사 후 시간경과에 따른 생쥐 난소 내 정상 원시난포에 대한 퇴화 원시난포의 비율을 보면 방사선 조사 6 시간에 유의하게 감소하였다. 대조군의 경우, 원시난포의 퇴화는 비교적 시간을 요하는 생리적 과정으로서 다양한 상태에 있는 원시난포들을 관찰할 수 있었으나, 방사선 조사를 받은 군에서는 원시난포의 퇴화가 급성으로 진행되었다. 정상적인 원시난포는 2 내지 3 개의 과립세포, 둥근 형태의 난막, 선명한 핵막, 그리고 한 개 혹은 그 이상의 인을 갖고 있었다. 또한 난질 내에 미토콘드리아가 균일하게 분포한 것을 알 수 있었다.

본 실험의 결과, 원시난포들은 난자와 과립세포의 핵응축 혹은 세포자연사하는 경우 (Fig. 1의 B), 상대적으로 정상형태의 과립세포가 있으며, 퇴화되는 난자를 갖는 경우 (Fig. 1의 C), 난자는 소실되었고 과립세포의 핵응축이 일어나며 혼탁적인 난자를 갖는 경우 (Fig. 1의 D), 자연상태의 퇴화과정으로서 난자는 완전히 소실되었고, 기저막 내에 과립세포만이 존재하는 경우 (Fig. 1. E), 그리고 난자가 완전히 소실되었으며 기저막 내에 여러 개의 과립세포를 갖으나 그 중 몇 개가 핵 응축 혹은 세포자연사하는 경우를 확인할 수 있었다.

이온화방사선 조사 후 12시간에 퇴화된 원시난포의 수가 더욱 증가하였다. 이때의 퇴화 원시난포의 특징은 난자의 핵막이 소실되며, 퇴화중인 난자가 존재하는 경우 세포질 내 지질방울이 증가하였다. 또한 세포자연사하는 난자와 과립세포들이 관찰되었다 (Fig. 2). 대조군의 경우 정상 대 퇴화 원시난포의 비율은 62.50 %이었으며, 이 비율은 방사선 조사 후 0 시간, 3 시간, 6 시간, 그리고 12 시간에 각각 51.61 %, 48.97 %, 11.11 %, 그리고 7.14 %로 급속히 감소하였다 (Fig. 2).

이온화방사선이 포유류 난포에 해로운 영향을 미친다는 것은 널리 알려진 사실이나 방사선에 의해 영향을 받은 원시난포의 형태적 특성 변화에 대하여 연구한 보고들은 거의 없는 실정이다. 그러므로 본 연구는 방사선에 의해 유발된 원시난포의 형태적 특성을 확인할 수 있는 시각적 단서를 제공하는 의미를 가지고 있다

방사선은 난소의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있는데 [19] 특히, 난포 내 과립세포의 세포자연사를 유발시키며 [14], 난자 내 염색체의 손상을 일으켜 난소의 기능저하를 초래한다 [15].

Erickson (1966) [3]은 원시난포가 난소에서 수적으로 감소하는 것은 난자가 소멸되거나 혹은 성장을 개시하기 때문인 것으로 보고하였다. 본 연구

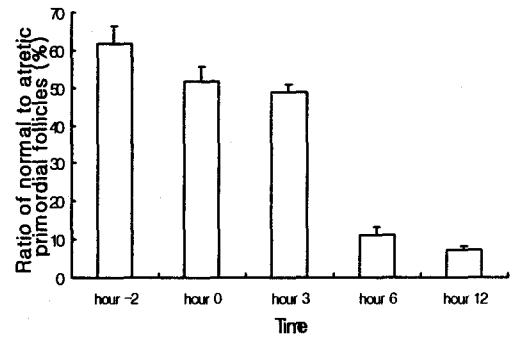


Fig. 2. Changes in the percentage of normal to atretic primordial follicles in the control and irradiated mouse ovaries. The experimental animals were irradiated for 2 hours. Hour 0 means the starting point of sacrifice of the animals right after irradiation. The number of animals was 5 in a group.

의 결과 감마선에 의한 난자의 소멸 뿐 아니라 과립세포의 세포자연사가 관찰되었다. 방사선에 의해 유발되는 원시난포의 퇴화는 급성으로 진행되는 것이 확인되었으며 양상별로 구분하면 1) 사멸하는 난자가 존재하는 상태에서 비교적 정상적인 과립세포를 갖는 원시난포, 2) 상대적으로 정상형태를 갖는 난자와 한 개 혹은 그 이상의 과립세포가 세포자연사하는 경우, 혹은 3) 난자 및 과립세포 모두가 세포자연사하는 원시난포들이 관찰되었다. 세포자연사하는 과립세포와 손상된 난자는 진하게 염색되므로 쉽게 구별할 수 있었으며 퇴화가 일어난 원시난포는 난자가 없고 형태적으로 비정상적인 두 개 혹은 그 이상의 과립세포-유사 세포들이 관찰되는 특성을 보였다. 이러한 기형의 세포들은 기저막 내에 존재하였다.

난포의 퇴화는 난포의 성숙 및 발달의 어느 시기나 발생되며, 이러한 난포의 퇴화를 유발하는 요인은 내재적이거나 외적인 해로운 자극에 기인하는 것으로 알려져 있다 [20]. Ratts 등 (1995) [21]은 *bcl2*가 결여된 생쥐 난소에서 많은 원시난포-유사 구조를 관찰하였다. 본 연구에서, 방사선 조사 후 6 시간에는 세포자연사하는 과립세포 및 난자를 관찰할 수 있었으며 조사 12 시간의 생쥐 난소에는 난자가 결여된 많은 수의 원시난포들을 관찰할 수 있었다. 고선량의 감마선 조사에 따른 원시난포의 퇴화는 진행과정이 빠른 것이 특징이며 방사선 조사 후 12 시간 경과 후에는 거의 모든 원시난포들이 퇴화하였다. 난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사에 의해 매개되는 것으로 알려

져 있다 [9, 22, 23]. 방사선에 의해 난포의 퇴화가 유발되며 [9], 이러한 방사선에 의한 난포의 퇴화는 급성으로 진행된다고 사실은 Kim 등 (1999) [17]에 의해 이미 보고된 바 있다. 본 연구에서 감마선에 의한 원시난포의 퇴화 역시 과립세포의 세포자연사에 의해 유발되며 이외에도 난자 자신의 세포자연사, 혹은 이들 두 종류의 세포 모두의 세포자연사에 의해 유발됨을 알 수 있었으나 이러한 결과가 고선량 방사선에 의해 유발되는 원시난포의 퇴화 기전을 직접적으로 규명하는 근거로서의 역할은 하지 못하였다. 방사선에 의한 원시난포의 퇴화 역시 방사선이 세포에 직접적으로 작용하거나, Haimovitz-Friedman 등 (1994) [24]과 Quintans 등 (1994) [25]이 보고한 바와 같이 protein kinase C를 억제하고 세포질 내 ceramide의 농도를 증가시켜 세포자연사를 유발하는 때문인 것으로 생각된다.

원시난포의 퇴화 현상을 규정할 수 있는 형태학적인 표지자가 없는 것으로 알려져 있으나 [26] 감마선에 의한 유발되는 원시난포의 퇴화현상을 형태학적으로 관찰한 본 연구에서는 조사 후 시간에 따라 세포자연사하는 과립세포, 혹은 퇴화하는 난자, 혹은 이들 두 가지 모두에 의해 쉽게 구별되는 형태적 변화를 규명할 수 있었다. 난포세포들의 세포자연사적인 퇴화가 급성으로 진행되었는데 이는 방사선의 조사선량이 LD₈₀₍₃₀₎의 고선량인 때문인 것으로 판단된다. 본 연구의 생물학적인 의의는 퇴화하는 원시난포의 변화과정을 형태학적으로 규명할 수 있는 시각적 단서를 제공한데 중요한 의의가 있다.

결론

본 연구의 결과, 퇴화된 원시난포의 경우, 난자는 완전히 소실되지만 비교적 정상적인 형태를 갖는 과립세포가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 이온화방사선을 조사한 경우 원시난포에서 나타나는 형태학적인 변화는 원시난포가 이온화방사선에 매우 민감하기 때문인 것으로 사료된다. 그러나, 본 연구에서 사용한 이온화방사선의 선량이 LD₈₀₍₃₀₎의 고선량인 점을 감안할 때 본 연구의 결과로부터 원시난포의 이온화방사선 작용의 세포학적 기전을 확인하기 위해서는 후속연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

본 실험의 결과로부터 이온화방사선이 원시난포의 퇴화를 급성으로 진행시키며 이러한 퇴화는 1) 정상적인 난포세포가 존재하나 난자가 세포자연사하는 원시난포, 2) 정상형태의 난자와 한 개 혹은

그 이상의 과립세포가 세포자연사하는 경우, 그리고 3) 난자 및 과립세포 모두가 세포자연사하는 원시난포의 형태학적인 특성을 나타낸다는 것을 알 수 있다. 또한 원시난포 내 난자는 과립세포에 비해 이온화방사선에 더 민감하며 난자의 퇴화 역시 세포자연사에 의해 매개된다는 결론을 얻었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. S. Meredith and D. Doolin, "Timing of activation of primordial follicles in mature rats is only slightly affected by fetal stage at meiotic arrest", *Biol. Reprod.*, 57, 63-67(1997).
2. A.N. Hirshfield, "Development of follicles in the mammalian ovary", *Int. Rev. Cytol.*, 124, 43-101(1991).
3. B.H. Erickson, "Development and radio-response of the prenatal bovine ovary", *J. Reprod. Fertil.* 11, 97-105(1966).
4. A.G. Byskov, "Follicular atresia", in: *The Vertebrate Ovary*, R. Jones, ed., pp. 533-562, Plenum Press, New York(1978).
5. A.N. Hirshfield and A.R. Midgley, "Morphometric analysis of follicular development in the rat", *Biol. Reprod.*, 19, 606-611(1978).
6. R.H. Braw, and A. Tsafirri, "Follicles explants from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia", *J. Reprod. Fertil.*, 59, 259-265(1980).
7. H.M. Beaumont, and A.M. Mandl, "A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the fetal and neonatal rat", *Proc. R. Soc. London Ser. B*, vol. 155, pp. 557-579(1962).
8. A. Kaipia and A.J. Hsueh, "Regulation of ovarian follicle atresia", *Ann. Rev. Physiol.*, 59, 349-363(1997).
9. A.J. Hsueh, H. Billig and A. Tsafirri, "Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process", *Endocr. Rev.*, 15, 707-724(1994).
10. H. Billig, I. Furuta, and A.J. Hsueh, "Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis", *Endocrinology*, 133, 2204-2212(1993).

11. A. Hurwitz and E.Y. Adashi, "Ovarian follicular atresia as an apoptotic process", in: *The Ovary*, E.Y. Adashi and P.C.K. Leung, eds. pp. 473-485, Raven Press, Ltd., New York(1993).
12. A. Gougeon, "Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses", *Endocr. Rev.*, 17, 121-155(1996).
13. J.F. Kerr, C.M. Winterford and B.V. Harmon, "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy", *Cancer*, 73, 2013-2026(1994).
14. 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).
15. R.M. Chapman, "Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function", *Semin. Oncol.*, 9, 84-94(1982).
16. K. Ataya, E. Pydyn, R. Ataya, and C.G. Orton, "Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists?: Preliminary observations", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, 790-795(1995).
17. J.K. Kim, C.J. Lee, K.W. Song, B.R. Do and Y.D. Yoon, " γ -Radiation accelerates ovarian follicular atresia in immature mice", *In Vivo*, 13, 21-24(1999).
18. J.K. Kim, C.J. Lee, Y.K. Lee, K.W. Song, Y.D. Yoon, "Effects of follicle stimulating hormone on γ -ray irradiated immature mouse ovarian follicles", *J. Korean Asso. Radiat. Prot.*, 23, 89-96(1998).
19. J. Jarrell, E.V. YoungLai, R. Barr, G. O'Connell, L. Belbeck and A. McMahon, "An analysis of the effects of increasing doses of ionizing radiation to the exteriorized rat ovary of follicular development, atresia, and serum gonadotropin levels", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154, 306-309(1986).
20. A.E. Taylor, A.L. Schneyer, P.M. Sluss and W.F. Crowley Jr., "Ovarian failure, resistance, and activation", in: *The Ovary*, E.Y. Adashi and P.C.K. Leung, eds., pp. 629-661, Raven Press, Ltd, New York(1993).
21. V.S. Ratts, J.A. Flaws, R. Kolp, C.M. Sorenson and J.L. Tilly, "Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad", *Endocrinology*, 136, 3665-3668(1995).
22. 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).
23. 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).
24. 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).
25. 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).
26. R.G. Edwards, R.E. Fowler, R.E. Gore-Langton, R.G. Gosden, E.C. Jones, C. Readhead and P.C. Steptoe, "Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat, and human ovaries", *J. Reprod. Fertil.*, 51, 237-263(1977).