

생쥐 난포의 radiation apoptosis에 미치는 FSH의 영향

김진규, 이창주, 이영근, 장화형, 김원득

한국원자력연구소

요 약

난포성숙호르몬(FSH)은 난소내 난포의 성장인자로 작용한다. 본 실험은 방사선 조사된 미성숙 생쥐의 난포 폐쇄가 FSH에 의해 억제되는지를 확인하는 한편 방사선방어제 개발을 위한 실험모델로서의 가능성을 평가하기 위해 수행되었다. PCNA에 의한 염색의 정도는 FSH군의 경우, 1일에 최저, 12시간과 8일에 가장 많이 염색되었으며, 방사선을 조사한 후 FSH를 주사한 경우, PCNA에 의한 염색율은 6시간 경과시에 제일 낮게 나타났고 이후 증가하는 경향성을 보였다. 즉, FSH는 방사선에 피폭된 난소내 난포의 apoptosis를 지연시키는 효과를 갖고 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 결과, 특정물질의 방사선방어효능 평가를 위한 실험모델로서 난소내 난포를 활용할 수 있으며 특히 FSH가 나타내는 난포폐쇄 억제효과도 방사선방어제 개발을 위한 실험연구에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

서 론

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, LH 수용체의 수를 증가시키며, inhibin 등의 여러 다양한 성장인자를 지정하는 유전자의 발현을 유도한다[1]. 또한, 미성숙개체에 FSH를 투여하게 되면 난포의 성장이 촉진되며, 강소형성난포의 경우 폐쇄되는 비율이 감소된다[2].

난포의 성장단계에 따라 방사능에 대한 영향이 달라질 수 있는데, 이는 이온화방사선에 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 [3, 4]. 본 연구는 방사선에 피폭됨으로써 유발된 난포의 폐쇄가 뇌하수체호르몬인 난포성숙호르몬에 의해 억제 혹은 지연될 수 있는지를 확인하는 한편 방사선

방어제 개발을 위한 실험모델로서의 활용가능성을 평가하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

생후 3주된 ICR 품종의 생쥐 암컷에 한국원자력연구소의 대단위조사시설을 이용하여 LD₅₀₍₃₀₎이 되는 8.3Gy의 감마선을 조사하였다. 방사선조사군(R)과 방사선 조사 후 FSH 처리군(RF)으로 구분한 후 각각 0시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 4일, 8일 군으로 나누어 에테르 마취하에, 난소를 적출 4% paraformaldehyde에 고정하였다. 고정된 난소는 탈수과정을 거쳐 xylene으로 투명화 시킨 후 파라핀으로 포매하였으며 박편절단기를 사용, 6 μ m로 박절하였다. 모든 난소의 절편은 가장 큰 절편(largest cross sectionate, LCS)을 이용하였다. 일부 절편은 대조를 위해 hematoxylin-eosin으로 일반적인 염색을 실시하였으며 동시에 Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) 면역조직화학 염색도 실시하였다.

난소내 전체 DNA를 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol로 추출 후, 동량의 chloroform:isoamyl alcohol로 재추출하였다. 상층액을 모아서 DNA를 침전시키고 원심분리후 Speed-Vac concentrator (Savant Instrument, NY)로 15분간 진공하에서 건조시켰다. 압축결정물을 25 μ l의 증류수에 녹이고, 260nm의 흡광도에서 DNA의 양을 측정된 다음 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 이렇게 추출된 DNA를 lane당 5 μ g의 농도로 2% agarose gel에 loading하고, running buffer로는 TBE용액을 사용하였으며, 50V에서 3시간 동안 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 Transilluminator로 확인하였다.

결 과

방사선조사에 따른 생쥐의 반치사량(a half lethal dose, LD₅₀₍₃₀₎)을 결정하기 위하여 15마리 씩의 생쥐를 0.5Gy/min의 선량율로 0, 2.5, 5.0, 7.5 그리고 10.0Gy를 조사한 후 30일 간의 생존율을 조사하였다. 각 선량별 생존율을 조사한 결과의 생존곡선식은 (1)식과 같으며 반치사선량인 LD₅₀₍₃₀₎은 7.29Gy로 나타났다.

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

여기서, S : 생존율, D : 방사선량(Gy)이다.

방사선 조사후 시간에 따른 체중의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 대조군에 비해 방사선조사군 및 방사선조사후 FSH투여군 모두 8일째 체중이 감소함으로써 방사선 조사에 따른 신체적 손상의 영향을 뚜렷하게 나타내었다.

최대조직절편내 PCNA에 의해 염색된 난포를 HE에 염색된 전체 난포로 나눈 값(PCNA/Total follicle No. x 100)을 Fig. 2로 나타내었다. PCNA에 의한 염색의 정

도는 FSH를 처리한 F군의 경우, 1일에 최저, 12시간과 8일에 가장 많이 염색되었으며, 방사선을 조사받은 후 FSH를 주사한 RF군에서 PCNA에 의한 염색은 6시간에 최저 이후 증가하는 경향성을 보였다. 또한, R 및 RF군의 4일군에서 소말단계에 이른 난포가 관찰되었다. R군은 RF군에 비해 apoptosis에 이른 난포의 수가 12시간군에서 더 많이 관찰되었다. RF군의 경우에는 0일 군에 비해 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나, 2일군에서 높은 값을 나타내었다.

고 찰

본 실험에서 FSH를 주사함으로써 방사선에 의한 난포폐쇄가 억제 혹은 지연되는 효과를 관찰할 수 있었다. 이는 방사선 조사 후 즉시 주입된 FSH가 난소내 FSH 수용체에 결합함으로써 그 영향을 나타낸 때문인 것으로 생각된다. PCNA면역조직화학 염색법은 세포주기중 G1, S, G2, M시기에 검출되므로 분열하는 세포에만 특이적으로 염색되는 면역조직화학적 방법이다.

원위에서 방사선조사에 의해 뇌하수체호르몬 분비세포에 손상을 입은 결과 FSH와 LH의 혈청내 농도가 감소하고 [5], 방사선조사를 받은 양의 경우, tertiary follicle이 폐쇄되며, 또 뇌하수체의 GTH 분비세포도 감소한다는 보고 [6]에 비추어 볼 때 RF군에서 apoptosis의 지연 혹은 방어 효과는 주입된 FSH의 영향이라 할 수 있다. 인간의 경우, 방사선조사에 의해 small follicle에 손상이 일어나며 [7], FSH는 초기강소난포의 apoptosis를 억제하는 성장요인이라 보고되었다 [8]. 본 실험의 결과, 방사선을 조사한 후 FSH를 처리한 군에서는 폐쇄난포의 빈도가 12시간부터 나타나 1일 이후에 감소하였다. 이는 방사선 조사로 인한 난포의 폐쇄가 FSH에 의해 지연된 결과라 할 수 있다. 또한, 과립세포가 apoptosis 됨으로서 폐쇄가 진행된다는 것을 보여주는 185bp 및 370bp의 DNA 분절이 방사선조사군의 경우 6시간, 방사선조사후 FSH를 투여한 군의 경우 12시간에 증가됨(Fig. 3)을 관찰함으로써, 방사선에 의한 난포의 폐쇄 역시 apoptosis를 매개로 하여 일어남을 알 수 있었고, FSH에 의해 apoptosis가 지연됨을 관찰할 수 있었다.

결 론

생식소는 방사선에 대한 민감도가 높은 조직으로 특히 난소내 난포는 혈막, 과립세포, 난자 등 다양한 세포로 이뤄져 있기 때문에 방사선에 의한 영향이 난포폐쇄로 이어지게 된다. 난포의 폐쇄는 방사선에 의해 유발된 과립세포의 apoptosis를 매개로 일어나는 것이 확인된 만큼 난포계를 특정물질의 방사선방어효능 검증에 위한 실험모델로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 한편 방사선에 피폭된 난소내 난포의 폐쇄를 지연시키는 FSH의 효과는 방사선방어제 개발을 위한 실험연구에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다. 앞으로 방사선에 노출되어 폐쇄되는 생식세포에 관한 체계적인 연구가 필요하며 난포의 성장과 폐쇄를 유발하는 두가지 상반

된 신호가 체외로부터 유입되는 경우 난포의 반응에 관한 분자생물학적 연구가 진행되어야 한다고 사료된다.

참고문헌

1. Arendarcik J., Tokos M., Praslicka M., and Balun J. The effect of graduated radiation doses on the follicular apparatus of the ovaries and the adenohypophysis in sheep. *Vet. Med. (Praha)* 1983. 28: 597-604.
2. Chun S. Y., Eisenhauer K. M., Minami S., Billig H., Perlas E., and Hsueh A. J. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996. 137: 1447-1456.
3. Haimovitz-Friedman A., Kan C. C., Ehleiter D., Persaud R. S., McLoughlin M., Fuks Z., and Kolesnick R. N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* 1994. 180: 525-535.
4. Harman, S. M., Louvet J. P., and Ross G. T. Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia. *Endocrinology* 1975. 96:1145-1152.
5. Jarrell J., YoungLai E. V., McMahan A., Barr R., O'Connell G., and Belbeck L. Effects of ionizing radiation and pretreatment with [D-Leu6,des-Gly10] luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on developing rat ovarian follicles. *Cancer Res.* 1987b. 47: 5005-5008.
6. Peters H., Byskov A. G., and Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1978. 7: 469-85.
7. Quintans J., Kilkus J., McShan C. L., Gottschalk A. R., and Dawson G. Ceramide mediates the apoptotic response of WEHI 231 cells to anti-immunoglobulin, corticosteroids and irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. 202: 710-714.
8. Schelle F. and Schoemaker J. 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.* 1996. 10: 55-66.

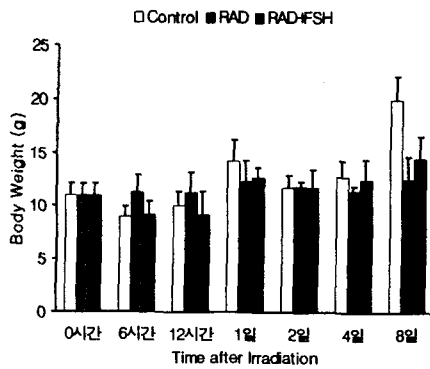


Fig. 1. Changes of body weight (g) of the irradiated mouse. h, hour; d, day. Bars represent standard deviation. Experimental repeats are 5 individuals.

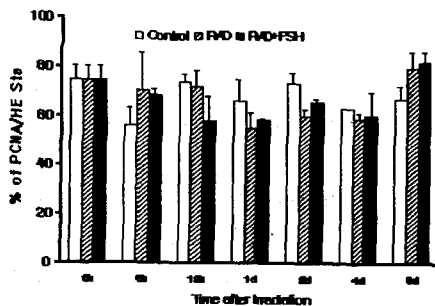


Fig. 2. Percent (%) of PCNA/HE Stb of irradiated mouse ovaries. h, hour; d, day. Bar represents standard error of the mean. Experimental repeats are 3 to 5 individuals.

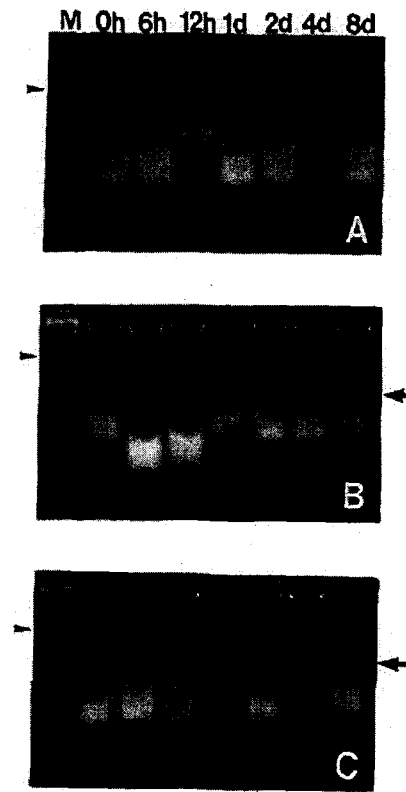


Fig.3. DNA fragmentation analysis. A; control, B; R group(irradiated) and C; RF group (irradiated+FSH injected). Arrow heads and arrows mean 500bp and 185bp fragment respectively.