

포유류 생식소내 세포의 분화와 사멸

The Gonadal Cell Differentiation and Death in Mammal

동아대학교 의과대학 해부학교실

김 종 민

1. 생식소 세포의 퇴행 분화

사람을 포함한 포유류의 남녀 생식소 (정소와 난소)는 성체에 이르게 되면, 각각 정자형성과정 (spermatogenesis) 및 난자형성과정 (oogenesis)을 완전하게 수행할 수 있게 됨으로써 수정능 (fertilization capacity)을 가지는 정자 (sperm)와 난자 (oocytes)를 생산한다. 이 과정은 몇 차례의 세포분열과 분화의 과정을 통해서 완성되며, 시상하부에서 분비된 생식소자극호르몬 방출호르몬 (gonadotropin releasing hormone)의 자극에 반응하여 뇌하수체에서 생산된 생식소자극호르몬 (gonadotropins; GTH)에 의해서 섬세하게 조절된다. 그러나, 증식 분화하는 모든 생식세포 (germ cells)들이 고분화 상태의 성숙한 정자나 난자에 이르는 것은 아니다. 일부 [정소의 경우 (Huckins, 1978; Callard 등, 1995)] 또는 대다수 [난소의 경우 (Byskov, 1974; Hirshfield, 1991; Hughes와 Gorospe, 1991)]의 생식세포들은 선택되어 퇴행 분화한다. 이에 관하여 GTH와 성 스테로이드 호르몬 (sex steroid hormones)의 생체내 수준변화가 이의 주요 원인으로 작용하는 것은 명백하나, 이와 관련된 정확한 분자 및 세포생물학적 기작은 밝혀져 있지 않은 상태이다.

포유류 성체 난소의 경우, 난포 (follicles)의 성장 성숙 분화중 퇴행 분화의 세포학적 특징을 나타내는 것은 과립세포 (granulosa cells)와 난자이며, 이는 난포의 폐쇄 (follicular atresia)시에 발생한다. 폐쇄가 진행중인 난포의 헤파세포 (theca cells)와 주변의 간질세포 (interstitial cells)에서는 세포 사멸 (cell death; apoptosis; 枯死)의 세포 및 생화학적 증거가 거의 발견되지 않는다. 한편, 황체화가 진행된 황체세포 (luteinized cells)에서도 세포사멸이 일어나는 것으로 알려져 있다 (Juengel 등, 1993; Al-Zi'abi 등, 2002). 그러나, 이에 대해서는 보다 섬세한 연구 및 확인이 요구된다고 생각된다. 성체의 정소는 정자형성과정이 일어나는 정세관 (seminiferous tubules)내에 각종 단계의 생식세포들과 더불어 서톨리세포 (Sertoli cells)가 체세포로서 존재하며, 정세관 사이에는 라이디히세포 (Leydig cells)가 분포한다. 정상적인 생리적 상태에서 정소내 체세포인 서톨리세포와 라이디히세포의 사멸현상은 거의 관찰되지 않는다. 그러나, 생식세포중에서는 정원세포 (spermatogonia)와 정모세포 (spermatocytes)가 부분적으로 세포사멸의 세포학적 증거 (DNA의 저분자로의 분절화)를 나타낸다.

II. 난포의 폐쇄중 과립세포의 사멸

FSH는 LH와 함께 난소에서 일차적으로 가장 중요한 생리 조절인자라고 할 수 있다. 특히, FSH는 난포의 성숙 분화를 주도하는 것으로 잘 알려져 있는데, 강소형성전 난포 (preantral follicles)에서 초기 강소형성 난포 (early antral follicles)로의 전환에 있어 매우 결정적인 역할을 한다. 그러므로, 이 시기에 FSH의 수준이 비정상적으로 감소하게 되면 난포 성장에 지장이 초래되어 난포의 폐쇄 (follicular atresia)가 유발될 수 있다. 난포의 폐쇄중에는 과립세포와 난자의 퇴화 (degeneration)가 일어나며 이는 아포토시스에 의한 사멸과정을 거친다. 그러나 그 빈도는 초기 분화단계에 있는 난포의 세포들에서 더 강하게 나타난다. GTH의 수준변화가 난포 폐쇄의 원인을 제공하는 것은 확실하나, 직접적으로 과립세포나 난자의 사멸에 영향을 미치는 것은 아니다. 최소한 과립세포의 사멸유도 및 억제과정에는 GTH에 영향을 받아 난소에서 국부적으로 생산된 물질이 관여하는 것이 사실이다. 이에 사이토카인 (cytokines) (Chun 등 1995; Kaipia 등, 1996), 성장인자 (growth factors) (Tilly 등, 1992; Luciano 등, 1994), 프로스타글란딘 (prostaglandins) (Manchanda 등, 2001) 등을 들 수 있다. 난포 폐쇄의 유발에 있어, 과립세포의 사멸을 이끄는 난자의 선도적 역할의 가능성도 무시할 수는 없지만 (Vanderhyden, 1992; Hakuno 등, 1996), 현재까지는 그 증거가 충분하지 못한 상태이다.

성체의 난소는 황체를 포함한 매우 다양한 성숙 분화단계의 난포들로 이루어져 있을 뿐만 아니라 개체마다 각각 다른 난소주기를 나타내고 있기 때문에 난포 폐쇄의 연구에 용이하지 않다. 그러므로, 난포의 발달이 없는 미성숙한 동물에 FSH 유사체 (예: PMSG)로 난포의 성장을 인위적으로 유도하는 모델이 난포의 폐쇄연구에 적합하다. FSH의 수용체는 과립세포에 있으므로, 생체 내 FSH의 수준 역시 인위적으로 급격히 감소시키면, 이에 일차적으로 영향을 받는 세포들은 과립세포들이고, 같은 난포내 난자는 이차적인 영향을 받아 퇴화하게 된다. 이 과정에서 일어나는 과립세포들의 퇴화 역시 아포토시스의 과정을 거쳐서 일어나는 것이 증명되었다. 특히, 난포의 폐쇄에 동반하는 과립세포의 사멸은 초기 강소형성 난포에서 가장 많이 일어나는 것도 밝혀졌다 (Chun 등, 1996; Kim 등 1998). 또한, 혈액내 FSH 수준 격감으로 인한 과립세포의 아포토시스는 TNF 및 NGF 계열의 Fas/FasL system과 직관되어 있으며 (Kim 등 1998), p53 단백질도 일부 이 과정에 관여함이 보고되었다 (Kim 등 1999). 최근에는 caspase-3의 저해 단백질인 inhibitors of apoptosis proteins (IAPs)가 난포의 성장 분화 중 FSH에 의해 상향 조절된다는 것이 밝혀짐으로써 (Li 등, 1998), 과립세포의 사멸이 caspase에 관련 있다는 사실이 더욱 분명하여 졌다.

III. 정자형성과정중 생식세포의 사멸

사람을 포함한 포유류의 정자형성과정은 시상하부에서 분비된 생식소자극호르몬 방출호르몬 (GnRH)의 영향하에 뇌하수체에서 합성분비되는 FSH와 LH에 의해서 조절된다. LH의 라이디히 세포 자극으로 인한 testosterone의 합성분비가 성체의 정자형성과정과 그 유지 (maintenance)에 매우 결정적이다 (Zirkin 등, 1989). 반면, FSH는 미성숙 개체의 정소에서 일어나는 예비적 정자형성과정에 있어 중요한 역할을 하며, 성체에서도 질적인 면에서의 정자형성과정에 관여하는 것

으로 사려된다 (Zirkin, 1998). 그러므로, 시상하부-뇌하수체-정소의 축 (axis)을 이루는 어느 한 성분에서라도 이상이 생기면 정자의 형성과정은 치명적인 영향을 받을 수 있다. 현재까지도 정자형성과정에 있어서의 LH와 FSH의 역할 그리고 그 각각의 기여도에 대해서는 연구자에 따라 의견과 해석의 수준이 다른 상태이다 (Meachem 등, 1998). 그러나, 여러 가지의 동물모델들을 통한 실험들을 종합해 볼 때 LH 작용으로 인한 testosterone의 합성분비가 정자형성과정에 있어서 필수적임에는 의심의 여지가 없다 (Awoniyi, 1989). 특히, 정소내 (intratesticular) testosterone의 일정 수준유지가 정자형성과정 그 유지에 매우 중요하다. 정소내의 testosterone의 수준은 *in vivo* 상에서 여러 가지 방법을 통하여 조작이 가능하다. 음성피먹이 기작의 원리를 이용하여 testosterone과 estradiol의 일정 조합을 사용하면 LH의 수준만을 특이적으로 격감시킴으로써 순차적 정소내 testosterone의 농도저하를 유도할 수 있으며, ethane dimethanesulfonate (EDS)를 주사하여 라이디히세포를 제거함으로써 그것이 가능하다. 정소내의 testosterone의 농도가 정상이하의 낮은 수준을 계속 유지하게 되면, 정소는 결국에 위축 (atrophy)하게 되는데, 이는 다수 생식세포의 사멸에서 기인한다.

지난 수년간 성체의 정소내 testosterone의 (인위적) 농도저하는 생식세포의 아포토시스를 야기한다는 사실이 증명되었다 (Henriksen 등, 1995; Woolveridge 등, 1998; Nandi 등, 1999). 그러나 모든 생식세포들이 아포토시스에 의해 사멸되는 것은 아니다. 정소내 testosterone의 농도가 낮은 수준을 일정기간 계속 유지하게 되면 가장 민감하게 반응하여 아포토시스에 의해 사멸되는 주된 생식세포는 정모세포 (spermatocytes)이다. 특히, 태사기 (太絲期, pachytene)의 정모세포들이 더욱 그러하다. 반면에 정(자)세포 (spermatids)들 중에는 원형 정세포 (round spermatids)가 아포토시스에 의해 사멸되는 경우를 보이며, 정자 (sperm)를 포함하여 확장형 정세포 (elongated spermatids)에서는 아포토시스의 증거가 보이지 않는다. 정원세포 (spermatogonia)는 testosterone의 수준변화에 거의 영향을 받지 않는 것으로 보이며, 오직 정원세포의 증식 (proliferation) 과정상에서 일부의 세포가 세포수의 조절이라는 측면에서 자연적 (spontaneous)으로 아포토시스를 일으키는 것으로 생각된다. 정소내 testosterone 농도의 저하에 반응하여 시간적으로 가장 신속하게 그 수적 감소를 보이는 생식세포는 정세포이다. 사실상 이들 중 아포토시스가 관찰되기도 하는 원형 정세포 모두가 아포토시스에 의해서 소멸되는 것은 아니다. 이때 원형 정세포의 일부는 아포토시스에 의해서도 사멸되기도 하지만, 대부분은 서톨리 세포로부터의 탈착 (sloughing)에 의해서 제거된다는 사실이 입증되었다. 이 탈착과정에는 세포부착 단백질 (cell adhesion proteins) 중에서 N-cadherin의 발현저하가 관련되어 있는 것이 보고되었다 (Byers, 1994). 즉, testosterone은 N-cadherin 발현의 상향조절과도 연관이 있다는 사실을 의미한다.

그러면, 정소내 testosterone의 농도저하에 기인한 정모세포의 아포토시스는 어떠한 세포학적 기작에 의해서 수행되는 것인가? p53 단백질은 정소내에서 testosterone의 농도에 반응하여 발생하는 정모세포의 아포토시스와는 직접적인 관계가 없는 것으로 판단된다. 그러나 p53는 방사선 (radiation)의 처리에 의한 정소내 정원세포의 사멸과는 직접적인 관계가 있는 것으로 보이는데, 이는 아마도 증식성이 강한 정원세포의 세포주기 정지 (arrest)를 방사선 조사가 야기함으로써 발생하는 것으로 생각된다 (Beumer 등, 2000). 최근 연구에 의하면, 환경의 정소내 testosterone 농도의 지속적 저하로 야기된 정모세포의 아포토시스는 caspase-3에 의존적으로 일어나는 것이 확인되었다 (Kim 등, 2001). 조직학적으로는 활성형의 caspase-3 단백질이 아포토시스를 수행하고 있는 정모

세포에 분포하였으며, caspase-3의 활성화에 연속하여 활성화되는 endonuclease인 caspase-activated DNase의 존재도 아포토시스를 수행하는 세포의 핵에서 확인하였다. 정소에서 효소처리 등의 방법으로 순수 분리해 낸 생식세포를 이용하여 caspase-3 단백질의 발현과 활성을 조사하였을 때, 정소 내에 testosterone의 농도저하가 유도된 군에서 caspase-3의 발현과 그 활성이 대조군에 비해 각각 유의하게 증가하거나 높았다. 특히, caspase-3 활성이 핵추출 단백질에서 높은 것이 주목할 만한데, 이는 아포토시스에 있어 활성형 caspase-3 단백질의 핵내 이동이 요구됨을 의미하기도 한다.

IV. 결 론

포유동물의 생식소내 생식세포 및 관련 체세포의 정상적 성숙 분화는 일정 수준의 GTH 및 성 스테로이드 호르몬의 농도유지와 직관되어 있으며, 이들 호르몬의 합성 생산이나 분비상의 이상은 남녀 불임 (male & female infertility) 등과 같은 심각한 생식관련 질병을 초래할 수 있다. 한편, 생식세포의 사멸과 호르몬들간의 연관관계가 분자내분비 및 세포 수준에서 잘 연구되면, 생식소 호르몬 대체요법 (gonadal hormone replacement therapy) 및 남녀 피임제 (contraceptive drug) 등의 응용 발전에도 일조할 수 있을 것이라 믿어지며, 나아가서는 생식소 관련 암세포 (cancer cells)의 효과적인 사멸유도법 개발에 기여할 가능성이 높다고 사려된다.

참 고 문 헌

1. Al-Zi'abi MO, Fraser HM, Watson ED. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction* 2002; 123: 67-77.
2. Awoniyi CA, Santulli R, Sprando RL, Ewing LL, Zirkin BR. Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology* 1989; 124: 1217-23.
3. Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Lock TM, Kal HB, De Rooij DG. Apoptosis regulation in the testis: involvement of Bcl-2 family members. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 353-9.
4. Byers SW, Sujarit S, Jegou B, Butz S, Hoschutsky H, Herrenknecht K, et al. Cadherins and cadherin-associated molecules in the developing and maturing rat testis. *Endocrinology* 1994; 134: 630-9.
5. Byskov AG. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1974; 37: 277-85.
6. Callard GV, Jorgensen JC, Redding JM. Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis in vivo and in vitro. *Dev Genet* 1995; 16: 140-7.
7. Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJ. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology* 1995; 136: 3120-7.
8. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996; 137: 1447-56.
9. 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.
10. Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 1995; 136: 3285-91.
 11. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
 12. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978; 190: 905-26.
 13. Hughes FM Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991; 129: 2415-22.
 14. Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 1993; 132: 249-54.
 15. Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 1996; 137: 4864-70.
 16. Kim JM, Boone DL, Auyeung A, Tsang BK. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary. *Biol Reprod* 1998; 58: 1170-6.
 17. Kim JM, Ghosh SR, Weil AC, Zirkin BR. Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 2001; 142: 3809-16.
 18. Kim JM, Luo L, Zirkin BR. Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology* 2000; 141: 1846-53.
 19. Kim JM, Yoon YD, Tsang BK. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology* 1999; 140: 2307-17.
 20. Li J, Kim JM, Liston P, Li M, Miyazaki T, Mackenzie AE, et al. Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology* 1998; 139: 1321-8.
 21. Luciano AM, Pappalardo A, Ray C, Peluso JJ. Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free calcium. *Biol Reprod* 1994; 51: 646-54.
 22. Manchanda R, Kim JM, Tsang BK. Role of prostaglandins in the suppression of apoptosis in hen granulosa cells by transforming growth factor alpha. *Reproduction* 2001; 122: 91-101.
 23. Meachem SJ, Wreford NG, Stanton PG, Robertson DM, McLachlan RI. Follicle-stimulating hormone is required for the initial phase of spermatogenic restoration in adult rats following gonadotropin suppression. *J Androl* 1998; 19: 725-35.
 24. Nandi S, Banerjee PP, Zirkin BR. Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biol Reprod* 1999; 61: 70-5.

25. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJ. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1942-50.
26. Vanderhyden BC, Telfer EE, Eppig JJ. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod* 1992; 46: 1196-204.
27. Woolveridge I, Bryden AA, Taylor MF, George NJ, Wu FC, Morris ID. Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 701-7.
28. Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology* 1989; 124: 3043-9.
29. Zirkin BR. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 417-21.