韓國家畜繁殖學會誌 16(2) : 165~173(1992)
Korean J. Animal Reprod.

생쥐, 쥐 및 돼지의 卵巢내 卵胞의 閉鎖에 關한 組織化學的 硏究

金鍾鳳・金聖仁*・尹用達・金文奎
漢陽大學校 自然科學大學 生物學科

Histochemical Study of the Atresia of Ovarian Follicles in Mouse, Rat, and Pig

Kim, J.H., S.I. Kim*, Y.D. Yoon and M.K. Kim
Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University

SUMMARY

In order to study the mechanism of follicle growth and maturation, and also to supplement the criteria identifying the follicle state of normal and atretic, the histochemical investigation on the ovarian follicles according to the ovarian cycle of mouse, rat and pig has been done. The intercellular space of granulosa cells, especially Call-Exner body, and follicular fluid in the antrum showed positive to PAS, and blue stain by trichrome dye. The results suggest that the mucous polysaccharide was synthesized by the granulosa cells, and secreted into the antrum through Call-Exner body so as to be the components of the follicular fluid as the follicles proceeded to growth and maturation. The further the follicles proceeded to atresia the more densely their theca externa were stained blue by trichrome dye, and the more densely the granulosa cells were stained red by oil red 0 dye. Therefore, these stainning methods can be applied to the criteria identifying the follicle atresia.

Ⅰ. 緖 論

哺乳類의 卵胞는 卵子形成의 組織學 및 生理的 單位로서 卵巢의 皮質內에 原始卵胞狀態로 存在하다가 性的 成熟期에 이르러 腦下垂體의 生殖巢刺戟호르몬(gonadotropin, GTH)들의 影響에 의해 原始卵胞들이 成長하여 腔所卵胞(antral follicle)로 된다.

그러나 成長을 始作한 卵胞들 중 극히 一部만이 排卵되고 大部分은 排卵되지 못하고 退化하게 되는데 이런 卵胞들을 閉鎖卵胞(atretic follicle)라 하였다(Ingram, 1962). 卵胞의 閉鎖過程이 進行되면 여러가지 構成物質과 形態에 連鎖的인 變化가 나타난다. 지금까지의 여러 硏究結果들에 의하면 閉鎖卵胞의 細胞-組織學的 特徵은, 顆粒細胞(granulosa cell, GC)들의 核凝縮(pyknosis)과 卵胞液內로의 浮游, 卵子의 萎縮과 透明帶의 不規則한 形態, 卵子-卵丘複合體(oocyte-cumulus complex, OCC)의 卵胞液內 浮游와 退化, 卵胞膜層(theca layer)의 異常肥大와 纖維質化 등이라고 하였다(Byskov, 1974; Hay, et al., 1976; Ryan, 1981; Kim, et al., 1986).

또한 哺乳類 閉鎖卵胞의 顆粒細胞內에 好수단성 脂質(sudanophilic lipid)이 蓄積된다는 報告가 있으며(Byskov, 1978; Guraya, 1985), 생쥐 卵巢에서 初期閉鎖 段階에 脂質의 蓄積은 基底層(basal lamina)에 가까운 顆粒細胞層에서 처음 보인다는 報告가 있다(Byskov, 1978).

본 연구는 1991년도 교육부 기초과학육성연구비 지원에 의한 것임.
*漢陽大學病院 組織病理學室(Pathology Laboratory, Hanyang University Hospital)

Centola(1982)는 여러가지 染色法으로 透明帶의 染色 程度를 觀察하여 初期段階의 退化를 알 수 있다고 報告했고, 또한 卵子 微細絨毛(microvilli)의 數가 減少하고 細胞質內 液胞가 많아진다고 하였다(Gondos, 1982).

閉鎖에 따른 卵胞膜層의 變化는 卵胞膜內層(theca interna)과 顆粒細胞를 둘러싸고 있는 間充組織內의 特徵的인 變化와 密接하게 聯關되어 있다. 腺細胞의 異常肥大는 動物에 따라 差異가 있으나 多樣한 크기와 構成을 갖는 脂質顆粒, 그리고 스테로이드 生合成에 關聯된 多樣한 酵素들의 活性 등을 誘發시키는 것으로 報告되었다(Wallach and Noriega, 1970; Ryan, 1981; Tsafriri and Braw, 1984; Guraya, 1985).

그리고 卵胞閉鎖가 始作되는 段階에서 卵胞膜層에 分布하는 神經과 血管이 갖는 役割은 잘 알려져 있지는 않지만 血管의 不完全한 發達이 卵胞의 退化를 誘導한다는 意見이 있다. O'Shea 등(1978)은 卵胞의 成長과 閉鎖에 있어서 卵胞의 크기와 血管分布 사이에 密接한 關係가 있다고 報告하였다. 그러나 哺乳類의 卵巢週期에 따른 炭水化物과 脂質 및 纖維素의 分布에 관한 組織化學的 硏究는 거의 修行되지 않은 狀態이다.

따라서 本 硏究는 炭水化物 染色에 대한 periodic acid-Schiff(PAS)反應, 纖維素 染色에 대한 trichrome染色과 脂肪質에 대한 oil red O染色을 하여 組織內 이 物質들의 分布를 觀察함으로써 閉鎖卵胞의 判定基準 定立과, 卵胞의 成長 成熟기작을 究明하고자 이 實驗을 行하였다.

II. 材料 및 方法

1. 卵巢의 採取

實驗動物은 漢陽大學校 生物學科에서 飼育한 生後 3週된 未成熟 생쥐(ICR, 體重 10±1g)와 5週된 未成熟 쥐(Wistar, 체중 100±8g)를 사용하였다. 생쥐와 쥐의 卵巢週期를 誘導하기 위하여 腹腔에 각각 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG) 3IU, 20IU를 注射한 후 24시간과, 48시간 만에 屠殺하고 卵巢를 摘出하여, 實驗群 P-24, P-48로 設定하였다. 또한 PMSG 注射하고 48시간 후에 각각 human chorionic gonadotropin(hCG) 3IU, 20IU를 注射한 後 12시간과 24시간 만에 屠殺하고 卵巢를 摘出하여 實驗群 PH-12, PH-24군으로 設定하였다. 對照群은 生殖巢刺戟호르몬 대신 生理食鹽水를 注射한 것으로 하였다.

한편 돼지의 卵巢는 屠殺場(서울 馬場洞, 우성농역(주))에서 屠殺 直後 얻어 얼음상자(4℃)에 넣어 實驗室로 運搬하였다. 卵巢내에 黃體의 有無에 따라 黃體가 없는 卵巢를 卵胞期(follicular phase)로, 黃體가 있는 卵巢를 黃體期(luteal phase)로 區分하여 實驗에 사용하였다. 각 時期에 따라 卵巢내 卵胞를 낱개로 摘出하여 急冷凍(−70℃)시킨 후 一部를 冷凍切片機(Histostat AO, Model 855)로 8μm의 두께로 잘랐다. 이것중 一部 切片은 hematoxylin-eosin으로 染色하여 顆粒細胞의 核凝縮 정도, 卵胞膜層의 纖維化와 肥大化 등으로 正常卵胞와 閉鎖卵胞를 判定하였고, 切片의 一部는 組織化學的 觀察을 위하여 사용하였다.

2. 組織化學的 觀察 方法

1) 組織 슬라이드의 準備

위와 같이 採取한 생쥐와 쥐의 卵巢中 左側은 固定脫水하고 파라핀으로 포매하여 6μm로 切片하였고, 右側은 oil red O 染色을 위하여 deep freezer(−70℃)에 急冷凍시킨 後 8μm의 切片하였다. 또한 돼지 卵巢도 一部는 파라핀에 포매하여 6μm로 切片하였고, 一部는 oil red O 染色을 위하여 液體窒素(−196℃)에 急冷凍시킨 후 8μm로 切片하였다.

2) 組織化學的 染色

前述한 바와 같이 準備한 파라핀切片은 McManus의 方法(1948)에 따라 炭水化物의 染色을 위하여 periodic solution에 反應시키고 basic fuchsin과 anhydrous sodium bisulfate를 溶解시키고 暗冷所에 保管한 Schiff reagent에 反應(PAS 反應)시킨 後 hematoxylin으로 後 染色한 다음 脫水, 封入한 후 현미경(Olympus, Model BHA 413)하에서 觀察하였다.

前述한 바와 같이 準備한 파라핀 切片은 trichrome 染色을 위하여 Masson의 方法(1929)에 따라, hematoxylin으로 核染色한 다음 Biebrich scarlet 90ml에 acid fuchsin 10ml 그리고 氷醋酸 1ml를 添加한 Biebrich scarlet-acid fuchsin solution에 反應시키고 洗滌한 후 phosphomolybdic acid-phospho-tungstic acid에 反應시켰다. 溶液을 除去하고

aniline blue에 10분간 再染色시키고 물로 洗滌한 다음 위와 같은 方法으로 脫水, 封入하여 현미경 하에서 觀察하였다.

Oil red O 염색은 위와 같이 準備한 冷凍切片을 無水 propylene glycol 溶液에 2분간 헹군 다음 같은 溶液에 oil red O를 溶解시킨 染色液에 1시간 染色하고 85% propylene glycol 溶液에 1분간 鑑別시키고 물로 洗滌하였다. 그 다음 hematoxylin으로 核染色한 후 glycerin jelly로 封入하여 현미경하에서 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

成體의 發情週期에서 복잡한 調節要因들의 影響을 排除하기 위하여 未成熟 생쥐와 쥐에 PMSG와 hCG를 注射하여 人爲的으로 生殖週期를 誘導하였고, 돼지는 卵胞期와 黃體期로 나누어 卵巢週期에 따라 實驗하였다. 哺乳類의 卵胞液내 炭水化物은 glucose가 가장 많으며 fructose도 少量 存在하며(McNatty, et al., 1979; Guraya, 1985), lactic acid, sialic acid, citric acid, cholesterol, fucose 그리고 protein-bound hexose 역시 卵胞液內에 包含되어 있다고 報告되었다(Edwards, 1974; Ax and Ryan, 1979; Guraya, 1985).

本 實驗에서 生殖週期에 따라 생쥐와 쥐의 卵胞液內 PAS의 染色 程度가 對照群, P-24群, 그리고 P-48群으로 卵胞가 成長함에 따라 점점 强하여졌는데(생쥐; Plate I. Figs. 1 and 2, 쥐; Figs. 3 and 4) 이는 卵胞內 glucose는 estrous時期에 最大의 濃度를 維持하며, 卵巢週期에 따라 濃度가 變化한다(Guraya, 1985)는 報告와 一致함을 알 수 있었다.

또한 돼지 卵胞의 顆粒細胞層에서 腔所와 接하여 있는 Call-Exner body는 PAS染色과 trichrome染色에 强한 陽性反應을 볼 수 있었으며(Plate II, Figs. 3 and 4), 반면 腔所내 卵胞液에는 훨씬 弱한 陽性反應을 나타내었다. 이로 보아 卵胞의 成長과 腔所 形成은 顆粒細胞에서 合成된 糖蛋白質 成分이 Call-Exner body를 통하여 腔所內로 分泌되고 卵胞膜層의 phosphatase 活性에 의한 能動輸送作用으로 體液이 누적되는 것이라 추측된다.

卵胞가 閉鎖됨에 따라 顆粒細胞는 steroidogenic 한 微細構造를 갖는데(Schwall and Erickson, 1981; Kim, et al., 1987), 卵巢내 黃體가 存在하는 경우에는 이러한 現狀이 觀察되지 않아 卵巢內 黃體의 有無에 의해서도 卵胞의 閉鎖機作이 相異할 것으로 報告된 바 있다(Kim, et al., 1987). 한편 卵胞의 狀態와 週期와의 關係는 PMSG를 注射하여 卵胞의 成熟을 誘導한 P-24군에서 對照群과는 달리 閉鎖卵胞가 많이 나타남을 觀察하였다. 따라서 이 호르몬에 대한 收容體 濃度에 따라 正常과 閉鎖現狀이 뚜렷해지는 것으로 추측된다(Richards and Midgley, 1976; Uilenbroek and Richards, 1979; Uilenbroek, et al., 1980; Chang, et al., 1986).

本 實驗에서 돼지卵胞의 正常群에서 Call-Exner body를 觀察하였는데, 소의 경우 閉鎖卵胞에서 Call-Exner body가 나타난다는 報告(Marion, et al., 1968)와는 다른 樣相으로 이는 種特異性에 基因하는 것으로 추측된다.

閉鎖卵胞의 卵胞膜層에는 血管의 分布가 적으므로 正常卵胞에 비해 血管을 통한(Plate I, Fig. 6) 物質의 流通이 減少하는 것으로 추측된다(O'Shea, et al., 1978). 卵胞液內에 粘性多糖類(mucopolysaccharide)인 chondroitin-sulfate의 濃度가 높은 卵胞는 閉鎖卵胞라는 報告가 있는데(Bellin and Ax, 1984), 本 實驗에서 閉鎖卵胞의 卵胞液이 trichrome染色에 强한 푸른색을 나타낸 것으로 보아 粘性多糖類가 存在함을 확인할 수 있었다(Plate I, Fig. 6).

卵胞가 成長함에 따라 卵胞膜層에 trichrome染色反應이 점점 强하게 나타나고 黃體의 주위에서도 강하게 나타났는데(Plate I, Fig. 5), 이는 平滑筋과 같은 纖維가 점점 발달하여 排卵에 관여한다는 報告(O'Shea, 1970, 1971; Burden, 1972)를 考慮할 때 纖維素의 收縮作用이 排卵을 돕는 것으로 사료된다.

한편 卵胞의 閉鎖段階가 進展됨에 따라 卵胞膜層은 점점 纖維化하는데(Plate I, Fig. 6) 이도 染色의 정도가 다르므로 閉鎖判定이 利用 可能性을 暗示해 준다. 또한 卵胞중 囊種群(cystic follicle)의 卵胞膜層에서는 陽性의 trichrome 反應을 나타내는 콜라겐 섬유를 많이 갖는 樣相을 보였는데 이는 卵胞의 結體組織化에 關與하는 것이라 추측된다(Motta and Familiari, 1981).

한편 脂質에 대한 oil red O 染色은 역시 卵胞와 卵胞사이의 間充組織에서 붉게 陽性反應으로 나타났으며 腔所로 浮游된 閉鎖卵胞의 內部에서 陽性反應을 보여 (Plate II, Figs. 5 and 6) 卵胞가 閉鎖함에 따라 核凝縮된 顆粒細胞내에 脂質顆粒이 蓄積된다는 報告 (Hay, et al., 1976; Kim, et al., 1987)와 一致하였다.

한편 正常卵胞나 閉鎖卵胞에서 卵胞膜層에 alkaline phosphatase(ALPase)와 adenosine triphosphatase(ATPase)의 活性度가 强하게 나타난다는 (Adams, et al., 1966; Weir and Rowlands, 1977; Kim and Kim, 1983)것으로 보아, 이는 血液과 卵胞液 사이에서 無機이온 및 有機物質과 體液에 대한 卵胞膜層의 能動輸送 作用으로 平衡을 이루고 있는 것으로 思料된다.

本 實驗에 使用한 組織化學的 方法은 正常卵胞와 閉鎖卵胞에 대한 染色의 程度가 다르므로 閉鎖卵胞의 判別方法으로 利用될 수 있으며 이 方法으로 正常卵胞와 閉鎖卵胞를 判別하여 正常卵子를 얻음으로써 體外受精率 增進에 寄與할 것으로 思料된다.

IV. 摘 要

卵胞의 成長과 成熟機作을 硏究하고 正常과 閉鎖卵胞의 判定 基準을 補充하기 위하여 卵巢週期에 따라 생쥐, 쥐 그리고 돼지의 卵胞를 組織化學的 方法으로 觀察하였다.

顆粒細胞 間隔, 특히 Call-Exner body 그리고 腔所內 卵胞液은 PAS에 陽性反應을 나타내었고 trichrome에 靑色으로 染色되었다. 이 觀察 結果 卵胞가 점점 成熟함에 따라 卵胞液내 構成成分인 粘性多糖類는 顆粒細胞에서 合成되어 Call-Exner body를 거쳐서 腔所로 分泌된다는 것으로 推測된다. 또한 卵胞의 閉鎖가 進展됨에 따라 閉鎖卵胞內 theca層은 trichrome에 靑色反應을 나타내었고, 閉鎖卵胞內 顆粒細胞는 oil red O에 赤色反應을 나타내었다. 이 染色方法은 閉鎖卵胞를 判別하는 데 좋은 基準으로 活用할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 引用文獻

1. Adams, E.C., A. T. Hertig, and S. Foster. 1966. Studies on guinea pig oocytes. II. Histochemical observations on some phosphatases and lipid in developing and in atretic oocytes and follicles. Am. J. Anat., 119: 303-339.
2. Ax, R. and R.J. Ryan. 1979. The porcine ovarian follicle. IV. Mucopolysaccharides at different stages of development. Biol. Reprod., 20: 1123-1132.
3. Bellin, M.E. and R.L. Ax. 1984. Chondroitin sulfate: An indicator of atresia in bovine follicles. Endocrinology, 114: 428-434.
4. Burden, H.W. 1972. Ultrastructural observations on ovarian perifollicular smooth muscle in the cat, guinea pig, and rabbit. Am. J. Anat., 133: 125-142.
5. Byskov, A.G.S. 1974. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. J. Reprod. Fert., 37: 277-285.
6. Byskov, A.G.S. 1978. Follicular atresia. In: The Vertebrate Ovary (Jones, R.F., ed.). Plenum Press, New York. pp. 533-562.
7. Centola, G.M. 1982. Light microscopic observation of alteration in staining of the zona pellucida of porcine follicular oocyte: Possible early indication of atresia. Gamete Res., 6: 293-304.
8. Chang, C.S., C.J. Lee, Y-D. Yoon, and M.K. Kim. 1986. Changes of hCG binding capacity on the granulosa cells of porcine ovary during follicular atresia. Kor. J. Fertil. Steril., 13: 29-38.
9. Edwards, R.G. 1974. Follicular fluid. J. Reprod. Fert., 37: 189-219.

10. Gondos, B. 1982. Ultrastructure of follicular atresia in the rat. Gamete Res., 5 : 199-206.
11. Guraya, S.S. 1985. Follicular atresia. In : Biology of Ovarian Follicles in Mammals, Springer-Verlag Press, Berlin. pp.227-275.
12. Hay, M.F., D.G. Cran, and R.M. Moor. 1976. Structural changes occuring during atresia in sheep ovarian follicles. Cell Tissue Res., 169 : 515-529.
13. Ingram, D.L. 1962. Atresia. In : The Ovary (Zuckerman, L. and B.J. Weir, eds.). Vol. I, Academic Press, New York. pp.247-273.
14. Kim, J.H., Y-D. Yoon, and M.K. Kim. 1986. A study on the pattern of proteins on electrophoresis in the porcine follicular fluid during atresia. Kor. J. Fertil. Steril., 13 : 39-51.
15. Kim, M.K. and H.T. Kim. 1983. Effect of PMSG on ATPase activity in the immature mouse ovary. J. Basic Sci. Hanyang Univ. 2 : 155-161.
16. Kim, M.K., Y.H. Lee, J.H. Kim and Y-D. Yoon. 1987. A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia. Korean J. Zool., 30 : 351-370.
17. Marion, G.B., H.T. Gier, and J.B. Choudary. 1968. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. J. Anim. Sci., 27 : 451-465.
18. Masson, P. 1929. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. J. Tech. Methods 12 : 75-90.
19. McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid-Schiff. Stain Technol., 23 : 99-108.
20. McNatty, K.P., A. Makris, C. DeGrazia, R. Osathanondh, and K.J. Ray. 1979. The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries *in vitro*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 49 : 687-699.
21. Motta, P.M. and G. Familiari. 1981. Occurrence of acontractile tissue in the theca externa of atretic follicles in the mouse ovary. Acta Anat., 109 : 103-114.
22. O'Shea, J.D. 1970. An ultrastructural study of smooth muscle-like cells in the theca externa of ovarian follicles in the rat. Anat. Rec., 167 : 127-140.
23. O'Shea, J.D. 1971. Smooth muscle-like cells in the theca externa of ovarian follicles in the sheep. J. Reprod. Fert., 24 : 283-285.
24. O'Shea, J.D., M.F. Hay and D.G. Cran. 1978. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in the sheep. J. Reprod. Fert., 54 : 183-187.
25. Richards, J.S. and A.R. Midgley, Jr. 1976. Protein hormone action : A key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. Biol. Reprod., 14 : 82-94.
26. Ryan, R.J., 1981. Follicular atresia : Some speculation of biochemical markers and mechanisms. In : Dynanics of Ovarian Function (Schwartz, N.B. and M.H. Dunn, eds.). Raven Press Inc., New York, pp. 1-11.
27. Schwall, R. and G.F. Erickson. 1981. Functional and Morphological changes in rat theca cells during atresia. In : Dynamics of Ovarian Function (Schwartz, N.B. and M.H. Dunn, eds). Raven Press Inc., New York, pp.29-34.
28. Tsafriri, A. and R.H. Braw. 1984. Experimental approaches to atresia in mammals. Oxford Rev. Reprod. Biol. 6 :

226-265.
29. Uilenbroek, J. Th. J. and J.S. Richards. 1979. Ovarian follicular development during the rat estrous cycle : Gonadotropin receptors and follicular responsiveness. Biol. Reprod., 20 : 1159-1165.
30. Uilenbroek, J. Th. J., P.J.A. Woutersen, and P. van der Schoot. 1980. Atresia of preovulatory follicles : Gonadotropin binding and steroidogenic activity. Biol. Reprod., 23 : 219-229.
31. Wallach, E.E. and C. Noriega. 1970. Effect of local steroids on follicular development and atresia in the rabbit. Fertil. Steril., 21 : 253-267.
32. Weir, B.J. and W. Rowlands. 1977. Ovulation and atresia. In : The Ovary (Zuckerman, L. and B.J. Weir, eds.). Vol. 1, pp.265-301.

Plate I. Microphotographs of the granulosa cells and the theca layers of the ovarian follicles and corpus luteum in mouse and rat

1. The antral forming follicles of mouse ovary 24 hours after PMSG injection. PAS stain(×160).
2. A normal antral follicle in mouse ovary 24 hours after PMSG injection. Trichrome stain(×400).
3. A normal Graafian follicle in rat ovary 48 hours after PMSG injection. PAS stain(×400).
4. A preantral follicle in rat ovary 24 hours after PMSG injection, showing no fibrous theca layer. Trichrome stain(×800).
5. The corpus lutea(C) in rat ovary, showing the fibrous theca layer. Trichrome stain(×800).
6. An atretic follicle in rat ovary, showing the fibrous basal layer of granulosa cells and theca layer. Trichrome stain(×800).

Plate II. Microphotographs of the oocyte-cumulus cell complex, the granulosa cells and the theca layers in porcine ovarian follicles

1. The oocyte-cumulus complex stained PAS stain. Note zona pellucida with PAS positive reaction(×800)
2. The same oocyte-cumulus complex as the left(1). Note zona pellucida with trichrome blue reaction. Trichrome stain(×800)
3. A normal Graafian follicle, showing Call-Exner body(arrow). PAS stain(×800).
4. The same Graafian follicle as the left(3). arrow : Call-Exner body. Trichrome stain(×800).
5. A normal follicle, showing the basal layer of granulosa cells positively stained with oil red O (×800).
6. An atretic follicle, showing the floating granulosa cells in the antrum positively stained with oil red O(×800).

Plate I

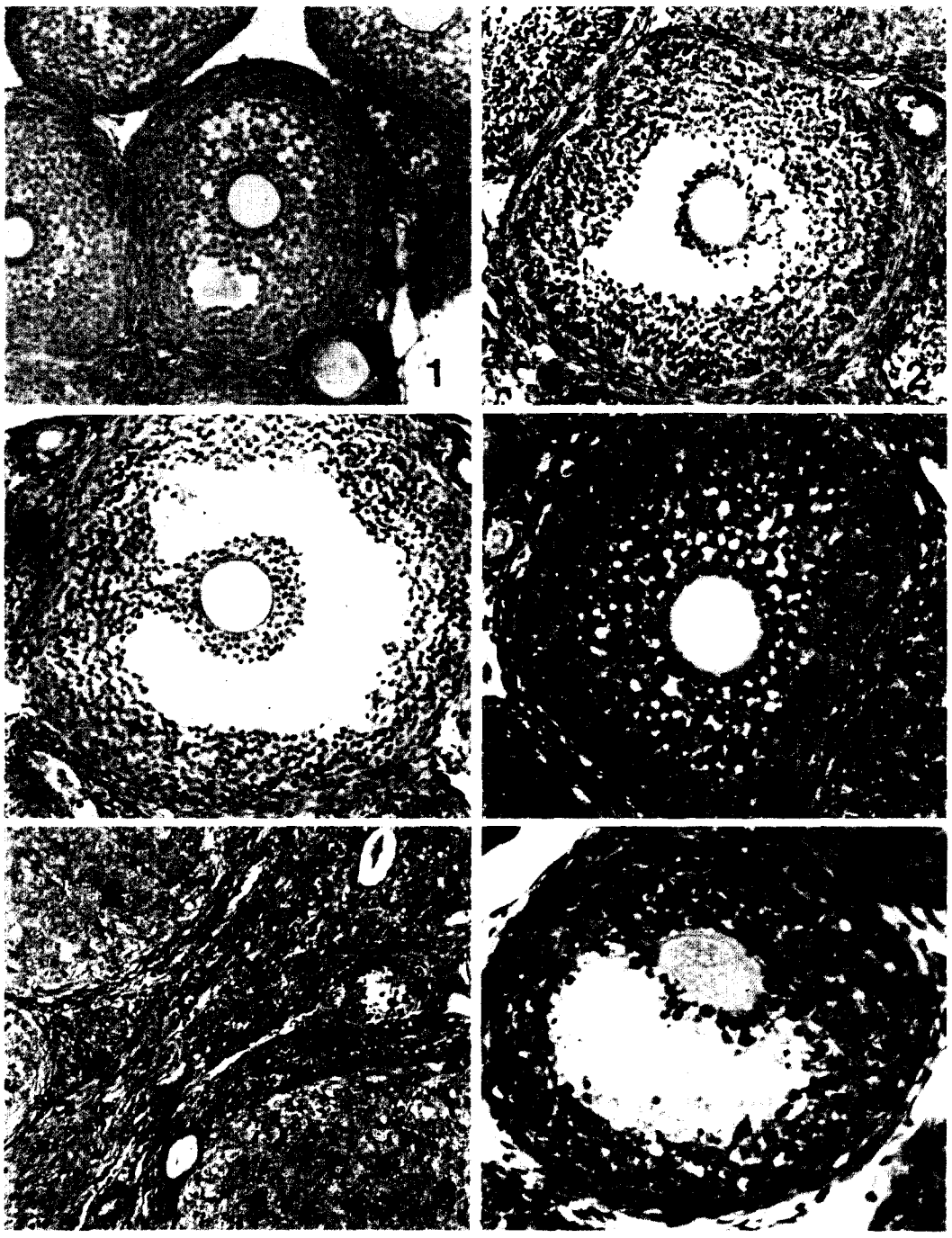
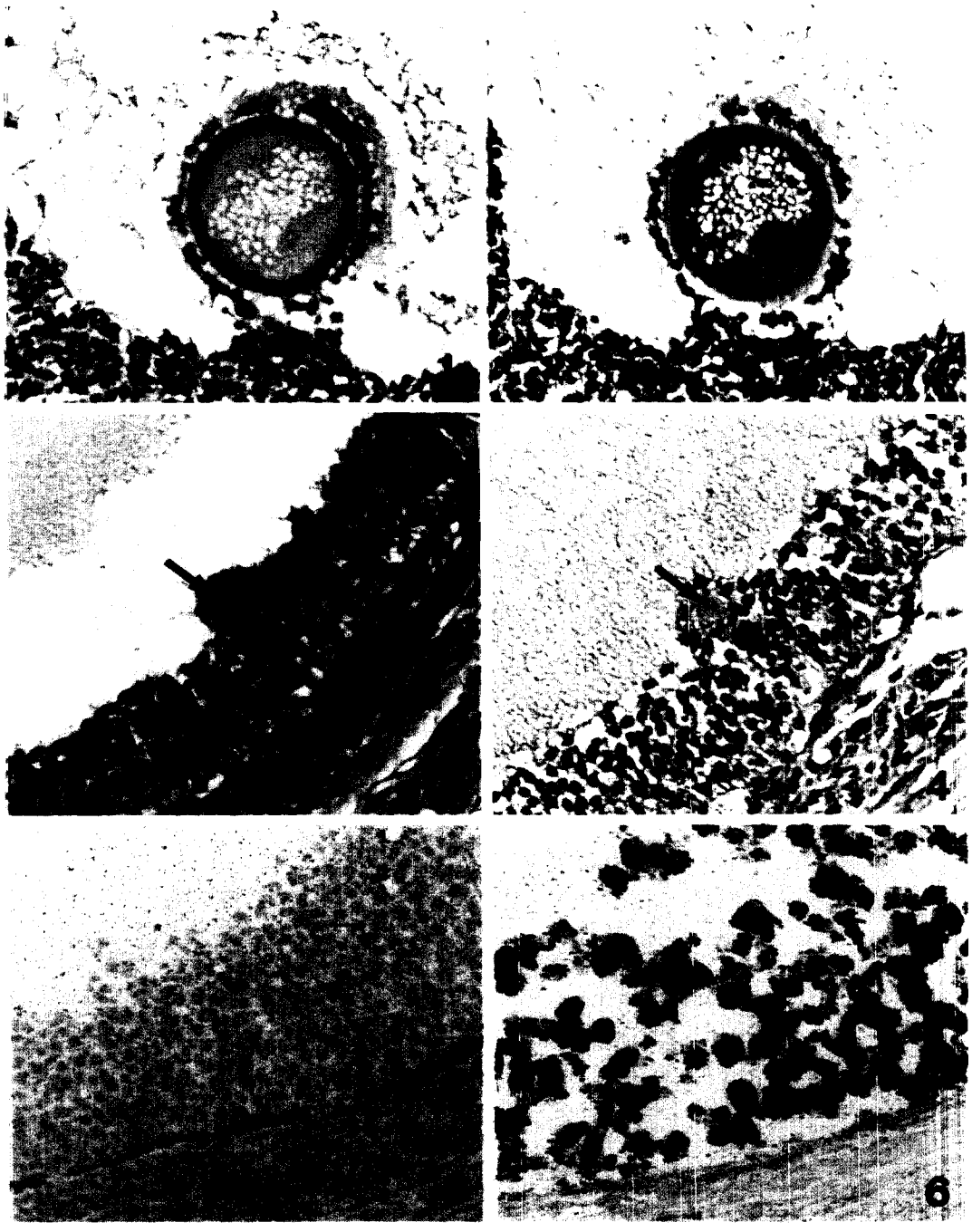
Plate II