

## 한우 난소의 중심강이 있는 황체의 출현과 기능에 관한 연구

성환후 · 오성종 · 양보석 · 백광수 ·곽수동\* · 정진관  
축산기술연구소

### Studies on the Appearance and Function of the Central Cavity of Corpus Luteum in the Ovaries of the Korean Native Cattle

Seong, H. H., S. J. Oh, B. S. Yang, K. S. Baek, S. D. Kwak\* and J. K. Jung  
National Animal Research Institute

#### SUMMARY

The appearance and function of corpora lutea(CL) with a central cavity in the ovaries of Korean Native Cattle (KNC) were investigated endocrinologically and histochemically. The CL were enucleated from KNC ovaries within 2~3 hrs local slaughter house and classified with central cavity CL or not. Enzymatically dispersed luteal cell ( $1 \times 10^6$  live cell/ml of Dulbecco's Modified Eagle Media) with or without cavity of CL were cultured at 37°C in a humidified incubation (5% CO<sub>2</sub> : 95% air) for 72hr. A central cavity in the CL of KNC was found in 58.8% of CL-1, 34.9% of CL-2, 39.1 % of CL-3, and 11.1% of CL-4, respectively. There were no significant difference between protein content of CL with and without a central cavity. Mean progesterone secretion after 36hr of *in vitro* luteal cell culture were significantly ( $p < 0.05$ ) higher in CL with central cavity than without cavity. However, the luteal cavitic wall was composed of the connective tissue band of the reticular and collagen fibers and then these connective tissue band extended into the CL with cavity. These results suggest that the central cavity of CL may be caused infertility in KNC.

(Key words : central cavity, CL, KNC, progesterone, infertility)

#### I. 서 론

소에 있어서 배란후 황체가 형성되는 과정에서 황체의 중앙부분에 액체로 충만된 중심강을 종종 확인할 수 있다. 이것은 성숙난포가 배란되어 황체로 형성되는 과정에서 황체중앙부분에 액체로 충만되어 황체강이 형성된 황체를 "난종성 황체"라 부른다(Okuda 등, 1988).

소의 난종성 황체는 황체가 형성되는 초기에 약 42.1%의 출현율이 확인되었으며 이것은 황체일령이 진행

될수록 그 출현율이 감소되며 퇴행황체에는 거의 검출이 되지 않는다고 보고하였다(Okuda 등, 1988). Kaneda와 Matsuda(1970)의 보고에 의하면 난종성 황체는 소에 있어서 불임의 원인이 된다고 보고하였으며, Kaneda 등(1980)도 난종성 황체는 초기 수정란의 사망과 깊은 관련이 있는 것으로 보고하였으나, 난종성 황체와 불임과는 유의적인 관련이 없는 것으로 주장하였다(Kito 등, 1986). 즉, 황체의 중심강이 존재하는 황체를 가진 개체와 정상황체를 가진 소에 있어서 혈중 progesterone 농도는 유의적인 차이가 없었다고 하였으나 이때의 혈중 progesterone 농도는

\* 경상대학교(Gyeongsang National University)

인공수정후 10일째에만 나타난 결과로서 정상황체와의 차이를 판단하기에는 다소 미흡하다고 사료된다. 이러한 보고들을 종합하면 황체강이 존재하는 황체는 반드시 낭종성 황체로 판단하기에는 확실한 이론적인 연구 결과가 없는 실정이며 또한, 낭종성 황체로 판단하기에는 그 출현비율이 너무 높으며 불분명한 결과들이 많은 실정이다. 일반적으로 황체기능을 유지하는 것은 뇌하수체의 성선자극호르몬과 태반성 단백질(Shiota 등, 1993) 외에 황체 자체가 기능을 제어하는 인자를 합성하고 있음이 rat 등을 포함한 설치류에서 보고되고 있어(Seong 등, 1992) 체외배양을 통해 낭종성 황체세포의 내분비적 제어기능과 조직화학적으로 황체의 특성을 검토할 필요가 있는 것으로 사료된다.

최근, 본 연구실에서는 한우에 있어서 내분비 제어에 관한 연구의 일환으로 황체세포의 배양실험에서 도축장에서 도축되는 한우 암소의 난소내의 황체를 조사한 결과, 이외로 중심강이 존재하는 황체의 출현율이 높게 나타났다. 그리고 이러한 황체가 낭종성 황체로서 불임의 원인이 되는지에 대해 구체적으로 검토할 필요성이 대두되고 있다. 따라서, 본 연구는 한우에 있어서 중심강이 존재하는 황체의 출현과 그 생리적인 기능에 대해 내분비적 혹은 조직화학적인 방법으로 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 한우의 난소로부터 황체세포의 분리

도축장에서 도축되는 한우중 임신우를 제외한 약 200두의 한우 115개의 황체를 채취하였다. 채취된 황체는 Ireland(1980) 등의 방법으로 배란후 황체일령을 4단계(CL-1, CL-2, CL-3, CL-4)로 구분하여 실험에 공시하였다. 분리된 황체로부터 중심강이 존재하는 낭종성 황체와 정상적인 황체를 분리하여 그 비율을 조사하였다.

### 2. 황체세포의 배양

황체세포의 배양을 위해서 중심강이 있는 중기 황체와 정상적인 중기황체를 각각 5개씩 선택하여 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액으로 2회 세척하여 안과용 가위로 직경 약 2 mm 가 되도록 절개한 다음, 황체조

직으로부터 황체세포만을 분리하기 위해 0.25% collagenase 용액(5 mM EDTA, 5 mM dithroitol, 0.2% BSA 및 0.05% DNase를 포함)에 침적하여 37°C의 진탕수조에서 60분간 배양하였다. 배양후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 2회 실시하여 신선 배양액 D-MEM(Dulbecco's-modified Eagle's Medium; 10% FCS, antibiotics 첨가)에 세척하였다. 세척된 시료는 pore size가 70  $\mu$ m인 여과기로 여과하여 분해되지 않는 황체조직을 제거하였다. 각 황체세포는 D-MEM 용액에 1회 세척하여 Haemocytometer를 통하여 0.2% trypan blue 용액으로 황체세포의 생사 감별을 실시한 결과 약 95%의 생존율을 확인하였으며 D-MEM 용액 1 ml당 생존된 황체세포를  $1 \times 10^6$ 으로 조절하여 24 well culture plate(Nune., USA)에 1 ml씩 분주하여 12시간 CO<sub>2</sub> 배양기(O<sub>2</sub> : 95%, CO<sub>2</sub> : 5%)에 전배양을 실시하고 24시간 간격으로 배양액을 교환하여 3일간 배양하였다. 배양이 끝난 배양액은 RIA 측정시까지 -20°C에 보존하였다.

### 3. RIA 에 의한 배양액중의 progesterone 농도 측정

배양액중의 progesterone 분석은 Takahashi 등(1978)의 방법을 수정한 방사선 동위원소 측정법(radioimmunoassay : RIA)을 이용하였다. 배양액내의 steroid hormone은 99% diethyl ether로 추출하였으며 anti-rabbit-progesterone은 동경대학 수의생리학 교실에서 제공받았으며 <sup>3</sup>H-progesterone(Amersham Life Science, USA)은 구입하여 사용하였다. Standard로서 50pg부터 3,200pg의 progesterone까지 7단계로 이용하여 분석하였다.

### 4. 단백질정량

각 황체세포내의 단백질정량은 Bradford (1976)의 방법으로 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Standard로서 bovine serum albumin(BSA)를 이용하였다.

### 5. 황체의 조직화학적 검색

정상황체와 중심강이 존재하는 황체를 각각 난소로부터 분리하여 10% formalin 용액에 보존하여 조직

포말용액(compound : UK)에 포말하여 동결시킨 후, 냉동조직절편기(cryostat, USA)로 두께 10  $\mu$ m 로 연속 절편하여 슬라이드에 도말시켜 건조시켰으며 염색은 고모리의 도염색법(Gomori's silver impregnation)으로 염색시켜 황체의 형태학적 특성에 대해 검사하였다.

## 6. 통계분석

통계분석은 Duncan의 다중검정법과 Student T-test법으로 분석하였다.

## III. 결 과

### 1. 발정주기중인 한우에 있어서 중심강이 있는 황체의 출현율

Table 1은 발정주기를 배란후 형성된 황체일령에 따라 구분하여 각 시기별 중심강이 존재하는 황체의 출현율을 조사하였다. 초기황체(CL-1)는 황체가 존재하는 17개의 난소중 10개의 황체에서 황체강이 존재하여 58.8%의 높은 출현율을 나타내었으며 중기와 말기의 황체에서는 약 35%정도로 다소 감소하다가 퇴행기의 황체(CL-4)는 급격히 감소하여 11.1%로 나타내었으며 전구간에서 난종성 황체의 평균 출현율은 약 36%로서 높은 출현율을 나타내었다. 이와 같이, 황체 내의 중심강이 존재하는 황체의 출현율은 황체가 형성 후 시간 경과에 따라 그 출현율이 감소되는 현상이 나타났다.

### 2. 발정주기중인 한우에 있어서 중심강이 있는 황체

### 와 정상황체의 황체세포질내의 단백질 함량

황체의 각 단계별 및 중심강이 있는 황체조직의 단백질함량은 Table 2와 같다. 정상황체에서는 황체일령이 진행됨에 따라 퇴행기의 황체까지 감소되었다. 이에 반해, 중심강이 있는 황체조직의 단백질함량은 CL-3까지 일령이 진행됨에 따라 큰 변화가 없이 정상황체에 비해 다소 높은 단백질함량을 나타내었으며 퇴행기의 황체에서 다소 감소되는 경향이 나타났다.

### 3. 중심강이 있는 황체세포와 정상황체세포의 체외 배양시 progesterone 분비능력에 대한 반응

Fig. 1은 배란후 약 10일된 중기황체를 각각 공시하여 배양액 1 ml 당  $1 \times 10^6$ 의 황체세포를 분리, 배양하여 배양액내의 progesterone 분비량을 나타내었다. 배양 12, 36 시간 및 72시간에서 정상황체세포는 각각 694.8 ng, 364.17 ng 및 218.86 ng 으로 배양시간이 경과할수록 progesterone 분비량은 점차 감소되었다. 또한, 중심강이 있는 황체세포의 배양에서도 시간경과에 따라 감소되었으나 12시간 및 36시간 배양에서 정상황체세포보다 오히려 progesterone 분비량이 유의적으로 높게 나타났다.

### 4. 조직화학적 방법으로 난종성 황체와 정상황체의 검토

정상적인 황체와 난종성 황체의 조직화학적 방법으로 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 난종성 황체는 정상적인 황체와는 달리 섬유성 결합조직대(band)로 둘러 싸여 있었으며 이들 결합조직대는 황체 기질 안쪽으로도 넓게 분포되어 황체세포의 분화와 증식을 억제

**Table 1. Appearance of the cavity in corpora lutea(CL) during various stages of estrous cycle in Korean Native Cattle(KNC)**

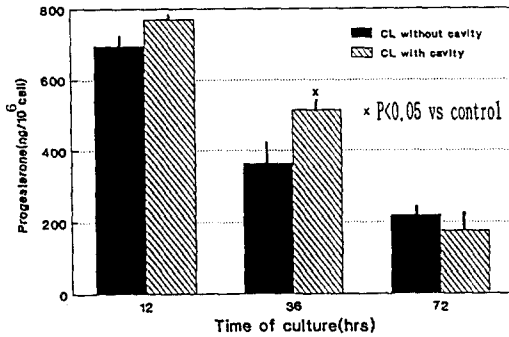
Luteal phase*	No. of CL	Corpus luteum(CL)		Appearance rate(%)
		Normal	with cavity	
CL-1	17	7	10	58.8
CL-2	43	28	15	34.9
CL-3	46	28	18	39.1
CL-4	9	8	1	11.1
Total	115	71	44	35.98

\* CL-1 : day 1~5, CL-2 : day 6~10, CL-3 : day 11~15, CL-4 : day 16~20 of the estrous cycle in KNC.

**Table 2. Mean of protein content in the cytosol of corpora lutea with and without a cavity**

Luteal phase	Protein content (mg. BSA/ml)*	
	normal CL	CL with cavity
CL-1	4.22±0.47	5.33±0.72
CL-2	4.35±0.36	5.72±0.51
CL-3	3.88±0.52	5.65±0.49
CL-4	2.82±0.30	3.92±1.38

\* The protein content of the luteal cytosol was determined by dye-binding assay using the Bio-Rad protein assay kit of modified Bradford method (1976).

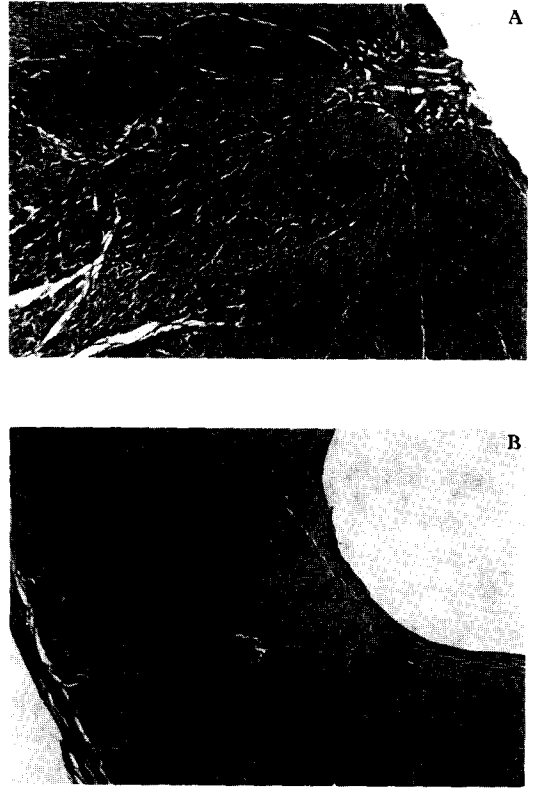


**Fig. 1. Secretion of progesterone by Korean Native Cattle(KNC) luteal cells with and without cavity cultured in Dulbecco's-Modified Eagle Medium containing 10% fetal calf serum. Values means ± S.E. (n=6-8).**

하고 있었다.

#### IV. 고 찰

소에 있어서 황체는 약 25%가 대형황체세포와 소형 황체세포이며 나머지 75%는 macrophage, fibroblast 및 간질세포 등의 비황체세포로서 구성되며 progesterone의 분비가 왕성한 시기일수록 황체세포의 비중이 증가되며 퇴행기의 황체에서는 macrop-



**Fig. 2. Histochemical localization of normal (A : × 60) and the central cavity of CL(B : × 40) from the middle stage of the estrous cycle. Section is stained with Gomori's silver impregnation stain. The cystic wall was composed of the connective tissue band of the reticular and collagen fibers(B) and then these connective tissue band extended into the CL.**

hage등의 비황체세포의 비율이 유의적으로 증가된다 (Lei 등, 1991). 난중성 황체는 배란후 황체가 형성될 때 황체중앙부분에 중심강이 형성되어 액체로 충전되어 있는 상태의 황체이며, 난포가 배란을 하지 않은 채로 황체화가 된 황체낭종과는 구분된다(Okuda 등, 1988). 또한, 황체의 중심강의 크기에 따라 정상황체와 구분지을 수 있는데 대개 직경 1.0 cm 이상의 황체강이 존재하는 황체를 낭종성 황체라 부른다(Okuda 등, 1988; Kito 등, 1986).

본 연구는 도축장에서 도축되는 한우의 난소로부터 황체를 분리하여 황체일령을 구분(Ireland 등, 1980)하여 각 시기별 난종성 황체의 출현에 대해 검토한 결과, 초기황체에서 58.8%로 가장 높았으며 시간경과에 따라 감소되었다. 각 시기에 있는 난종성 황체의 크기는 정상황체와 거의 비슷하기 때문에 절개하여 확인하기 전에는 판단하기가 곤란하였으나 촉감으로는 정상황체에 비해 부드럽고 무른편이기 때문에 직장검사에서 확인될 수 있는 것으로 사료된다(Kaneda 등, 1980; Kaneda와 Matsuda, 1970). Okuda 등(1988)의 보고에서 난종성 황체의 출현비율은 본 시험결과와 유사하였으며 적어도 중심강의 직경이 1 cm이하인 것은 황체가 발달되면서 중심강이 흡수되어 소실되는 것으로 사료되나 소실되는 시기는 개체에 따라 다른 것으로 사료된다. 그러나, 퇴행기의 난종성 황체(11.1%)는 황체퇴행이 정상황체에 비해 지연되어 정상적인 발정 주기의 반복이 어려울 것으로 사료된다.

각 단계에 있는 황체내의 총단백질함량은 정상황체에 비해 난종성 황체가 오히려 높은 경향을 나타내었으며(Table 2), 각 황체조직으로부터 황체세포를 분리하여 황체세포의 체외배양을 통해 그 기능을 검토한 결과, 배양시간에 따라 배양액내의 progesterone 분비량은 배양 36시간에서 정상황체세포에 비하여 난종성 황체세포가 오히려 높은 분비를 나타내었다(Fig. 1).

이와 같이, 난종성 황체세포는 progesterone을 합성하고 분비하는 기능에는 이상이 없는 것으로 사료된다. 이와 관련된 결과로서 난종성 황체조직내의 progesterone 농도는 정상황체에 비해 오히려 높은 것으로 나타났다(Okuda 등, 1988). 최근, 한우 황체세포의 체외배양에 있어서 PGF<sub>2α</sub> 단독처리는 progesterone 분비를 오히려 촉진시켰으나 LH와 PGF<sub>2α</sub>의 복합적 처리는 LH처리에 의한 증가분을 유의적으로 억제하여 황체기능을 조절하는 것으로 보고되었는데(Kawakami 등, 1980; 성 등, 1995) 난종성 황체의 퇴행에 관하여는 PGF<sub>2α</sub> 처리에 의한 반응을 정상황체와 비교할 필요가 있는 것으로 사료된다.

Kaneda와 Matsuda(1970)의 보고에 의하면 인공수정후 직장검사로써 확인된 난종성 황체우를 지압 혹은 주사기로 난종성 황체의 중심액을 제거한 후에는 정상적인 황체조직으로 형성되어 수태율이 향상되었

다고 보고하여 난종성 황체는 불임의 장애요인이 되는 것으로 추측되며 황체 중심강의 액체의 제거는 치료효과가 있다고 하여 중심강의 액체내에 황체세포의 기능을 억제하는 물질이 존재할 가능성이 높은 것으로 사료되어 황체중심강의 액체성분을 검토해 볼 필요가 있는 것으로 사료된다.

조직화학적 방법으로 난종성 황체를 검토해 본 결과, 난종성 황체는 두터운 섬유성 결합조직대(band)로 둘러 싸여 있으며 황체 기질 안쪽으로도 넓게 분포되어 황체세포의 분화와 증식을 억제하고 있었다. 이러한 섬유성 결합조직은 도은 염색(Gomori's silver impregnation)과 trichrome 염색에서 세망섬유(reticular fibers)와 교원섬유(collagen fibers)로 구성되었음을 알 수 있었다. 또한 난종성 황체강(cystic antrum)내에서 유주세포(free cells)와 황체세포가 없는 것으로 보아 황체 형성후 퇴행과정이 아니고 황체형성이 진행되는 과정에서 중심강내 액체의 팽압으로 황체세포의 증식이 정지되거나 변성되면서 황체조직내에 있던 결합조직세포가 증식하여 and (또는 capsule)을 형성한 것으로 추측된다. 또한, WBC 등 유주세포의 침윤이 없어 형태적으로 큰 변화없이 장기간 지속되는 것으로 사료되며 난종성 황체는 적어도 정상적인 발정주기가 반복되기는 어려울 것으로 사료된다.

## V. 적 요

도축장에서 도축되는 한우의 난소로부터 황체를 일령별로 분리하여 중심강이 있는 황체와 정상황체를 구분하여 그 출현율과 생리적인 기능에 대해 내분비적 혹은 조직화학적인 방법으로 검토할 목적으로 정상황체와 중심강이 존재하는 황체를 효소처리하여 분리된 황체세포( $1 \times 10^6$  live cell/ml)를 72시간 배양하였으며 배양 12시간, 36시간 및 72시간에 배양액을 회수하여 progesterone을 측정하였다. 한우의 난소에서 중심강이 존재하는 황체의 출현율은 CL-1에서 58.8%, CL-2에서 34.9%, CL-3에서 39.1%, 그리고 CL-4에서 11.1%로 각각 나타났다. 각 시기별 정상황체와 중심강이 존재하는 황체세포질의 단백질함량은 유의적인 차이가 없었다. 또한 황체세포의 체외배양에서 progesterone 분비능력은 배양 36시간에서 정상황체세포에 비하여 중심강이 존재하는 황체세포가 유의

적으로( $p < 0.05$ ) 높게 나타났다. 이에 반해, 조직화학적 방법으로 검토한 결과, 중심강이 있는 황체는 두터운 섬유성 결합조직대로 둘러 싸여 있으며 황체기질 안쪽으로 넓게 분포되어 황체세포의 분화와 증식을 억제하고 있었다. 이러한 결과로, 중심강이 존재하는 황체는 불임의 원인이 될 가능성이 높은 것으로 사료된다.

## VI. 인용문헌

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Ireland, J.J., R.L. Murphee, and P.B. Coulson. 1980. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy Sci.*, 63:155-160.
- Kaneda, Y. and K. Matsuda. 1970. Treatment for the cystic corpus luteum and its influence on fertility in the dairy cow. *Jap. J. Animal Reprod.*, 15:134-139.
- Kaneda, Y., I. Domeki and T. Nakahara. 1980. Effects of removal of cystic fluid from cystic corpus luteum on luteinization and conception rate in dairy heifers. *Japan J. Anim. Reprod.*, 26:37-42.
- Kawakami, S., O. Takaharu, and S. Masao. 1980. Effects of FSH, LH and PGF<sub>2α</sub> on the cell number and steroid secretion by bovine granulosa and luteal cells *in vitro*. *Japan J. Anim. Reprod.*, 26:30-36.
- Kito, S., K. Okuta, K. Miyazawa, and K. Sato. 1986. Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. *Theriogenology*, 25: 325-332.
- Lei, Z.M., N. Chegini, and C.V. Rao. 1991. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biology Reproduction*, 44:1148-1156.
- Okuda, K., S. Kito, N. Sumi, and K. Sato. 1988. A study of the central cavity in the bovine corpus luteum. *Veterinary Record*, 123:180-183.
- Seong, H.H., K. Shiota, K. Noda, A. Ogura, T. Asano, and M. Takahashi. 1992. Expression of activities of two 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in rat corpora lutea. *J. Reprod. Fert.* 96:573-580.
- Shiota, K., H.H. Seong, K. Noda, Hattori, A. Ikeda, A. Ogura, S.I. Itagaki, M. Takahashi, and T. Ogawa. 1993. 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat placenta. *Endocrine Journal*, 40:637-681.
- Takahashi, M., K. Shiota, and Y. Suzuki. 1978. Preprogramming mechanism of luteinizing hormone in the determination of the lifespan of the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 102:494-498.
- 성환후, 오성종, 양보석, 이명식, 백광수, 정진관, 조병대. 1995. 한우난소 황체세포의 체외배양에 있어서 progesterone 분비에 미치는 영향. *한축지. 발행증*.