

## 생식소 자극 호르몬과 Nitric Oxide에 의한 난소 과립세포의 Apoptosis 조절에 대한 연구

이석자 · 김외리 · 강한승 · 이채관 · 이병주\* · 강해묵\*\* · 강성구

인제대학교 자연과학대학 생물학과

\*울산대학교 자연과학대학 생물학과

\*\*청주대학교 유전공학과

## Studies on the Regulation of Ovarian Granulosa Cell Apoptosis by Gonadotropins and Nitric Oxide

Seok-Ja Lee, Wae-Lee Kim, Han-Seung Kang, Chae-Kwan Lee,  
Byung-Ju Lee\*, Hae-Mook Kang\*\* and Sung-Goo Kang

Department of Biology, College of Natural Sciences, Inje University, Kimhae 621-749

\*Department of Biology, College of Natural Sciences, Ulsan University, Ulsan 680-190

\*\*Department of Genetic Engineering, Chongju University, Chongju 360-764, Korea

### ABSTRACT

To study the regulation of porcine follicular cell apoptosis by gonadotropin, steroid, and nitric oxide, we analyzed DNA fragmentation, the hallmark of apoptosis, and nitrite production of porcine granulosa cells. Dissected individual follicles from ovary were separated in size (small, 2~3 mm; medium, 5~6 mm; large, 7~8 mm) and isolated granulosa cells were classified morphologically as atretic or nonatretic. Nitrite concentration was measured by mixing follicular fluids with an equal volume of Griess reagent. Follicular nitric oxide (NO) concentration of healthy follicles was higher than that of atretic follicles. Apoptotic DNA fragmentation was suppressed in non-apoptotic granulosa cells. Follicular apoptosis was induced by androgen but prevented by gonadotropin *in vitro*. Apoptosis was confined to the granulosa cells. But it was not clear whether apoptosis of granulosa cell was regulated by NO and gonadotropin *in vitro*. And so non-apoptotic granulosa cells were isolated, incubated with or without gonadotropin, androgen and sodium nitroprusside (SNP), respectively at 37°C for 24 hrs. Cultured granulosa cells were used to extract genomic DNA and culture media was assayed for nitrite concentration. Nitrite production of culture media was increased, while apoptotic DNA fragmentation was suppressed in PMSG, hCG, testosterone+SNP and SNP treated groups. Nitrite concentration in culture media was decreased, but apoptotic DNA fragmentation was induced in testosterone treated group. These data suggest that NO production and apoptosis may be involved of granulosa cell differentiation and ovarian follicular atresia by gonadotropin. Moreover, NO can overcome the granulosa cell apoptosis induced by testosterone.

Key words : Apoptosis, Nitric oxide, Granulosa cells.

## 서 론

Nitric oxide (NO)는 처음 세포내 기생동물에 대한 방어기작에 관여한다고 알려졌으며 무척추동물과 척추동물의 모든 조직에서 생성된다 (Nathan, 1992). 포유류의 세포에서 생성되는 NO는 혈관확장 (Furchgott & Zawadzki, 1980; Bolotina *et al.*, 1994), 신경전달 (Garthwaite *et al.*, 1989; Gopolkrishna *et al.*, 1993), 항균·항암 기능 (Nathan & Hibbs, 1991) 면역 (Lander *et al.*, 1993; Peunova & Enikolopov, 1993), 여러 생리 또는 병리생리학적 작용을 조절하며 (Moncada *et al.*, 1991), 생리과정의 여러 단계를 활성화시켜 생식소 자극 호르몬 분비를 조절한다 (Schmidt & Walter, 1994). NO는 nitric oxide synthase (NOS) 효소에 의해서 L-arginine에서 유도되며 constitutive NOS (cNOS)와 inducible NOS (iNOS)로 구분된다 (Lancaster & Hibbs, 1990; Lorsbach *et al.*, 1993). 또한 NO apoptosis를 억제하며 (Mannick *et al.*, 1994), 자궁수축 (Goetz *et al.*, 1994) 그리고 배란 (Shukovski & Tsafri, 1994)에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 한편 cNOS의 활성이 17  $\beta$ -estradiol에 의해 조절되어지는 것이 내피세포 배양과정에서 보고되었다 (Schray-Utz *et al.*, 1993).

최근에는 난소에서 일어나는 여포의 퇴화 기작이 apoptosis로 설명되고 있으며 apoptosis의 특징은 핵막 주위의 염색질의 응축, 막 수포형성 그리고 세포로부터 apoptosis body의 방출 등을 들 수 있다. 더욱이 두드러진 특징은  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -dependent endonuclease의 활성으로 인해 게놈 DNA가 nucleosomal unit 185~200 bp 길이의 DNA 단편으로 절편되는 것이다. NO가 여러 조직에서 특이한 생리적 특징을 나타내는 연구 결과가 보고되었지만 여포 과립세포에서의 역할은 확실하지 않다. 따라서 NO가 과립세포의 apoptosis를 억제하는지의 여부를 성숙 여포와 퇴화중인 여포의 여포액 내 nitrite 농도를 측정하여 알아보았고, 과립세포의 제

놈 DNA를 분리하여 apoptosis양상 (DNA fragmentation)을 알아보았다. 또한 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 생식소 자극 호르몬을 처리하여 과립세포를 배양한 후 nitrite 농도와 DNA 절편화를 비교 분석하였다. 또한 NO 공여체인 SNP와 apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 testosterone를 처리하여 난소 과립세포의 apoptosis 과정에서의 NO의 역할을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 과립세포와 여포액 추출

돼지의 난소는 김해시 소재 도살장에서 도살직 후 10분 이내에 난소를 적출하여 멸균된 ice-cold phosphate buffered saline (PBS)가 든 병에 담에 실험실로 운반하였다. 난소의 주변조직을 제거한 후 ice-cold PBS가 담긴 배양접시에서 크기별 (직경 2~3 mm, 5~6 mm, 7~8 mm 이상)로 여포를 적출하였다. 각각의 여포 1개씩을 시계접시에 올려놓고 여포액을 채취한 후 쌍안현미경 (Olympus BHC)으로 관찰하여 형태학적인 근거로 건강한 또는 퇴화중인 과립세포로 분류하였다 (Guthrie *et al.*, 1994). 각각의 여포 추출액을 4℃, 12000g에서 10분간 원심 분리한 후 과립세포는 -70℃로 옮겨 게놈 DNA 추출시에 이용하였으며, 여포액은 -20℃에 보관하였다가 nitrite assay에 이용하였다.

### 2. 과립세포 배양

중간크기 (직경 5~6 mm) 여포에서 건강한 과립세포만 모은 후 modified minimum essential medium Eagle (Sigma, M4144)으로 3회 세척한 후 배양액을 1 ml씩 넣은 배양접시 (4-well multidish, Nunc Co.)에  $1 \times 10^6$ 개씩의 과립세포들을 넣고 5%  $CO_2$ , 37℃, 95%의 습도가 유지되는 배양기 (Queue; cell culture incubator)에서 24 시간 동안 배양하였다. PMSG (3  $\mu$ g/ml), hCG (3  $\mu$ g/ml), testosterone (0.03, 0.3, 3  $\mu$ g/ml) 및 sodium nitroprusside (SNP, 100  $\mu$ M)들을

농도별로 처리하였다. 배양이 끝난 후 과립세포와 배양액은 4°C, 1200g에서 10분간 원심 분리하여 과립세포는 -70°C에 보관하였다가 DNA추출에 사용하였다. 배양액은 따로 분리하여 -20°C에 보관하였다가 nitrite 농도를 측정하였다.

모든 실험은 3회 이상 반복하여 수행하였다.

### 3. DNA fragmentation

Tilly 와 Hsueh (1993)의 방법을 변형하여 계놈 DNA를 추출하였다. 과립세포에 0.2 ml 완충액 (0.1 M sodium chloride, 0.01 M EDTA, pH 8.0, 0.3 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 M sucrose)를 첨가하였다. 균질액에 10% SDS 12.5  $\mu$ l를 섞어준 뒤 65°C에서 30분간 처리한 후 8 M potassium acetate 35  $\mu$ l를 첨가하였다. 4°C, 12000g에서 10분간 원심 분리한 후 상층액에 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1, V:V:V)을 첨가하였다. 100% 에탄올을 첨가한 후 원심분리하여 침전된 DNA를 50  $\mu$ l의 Tris-EDTA 완충액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹였다. 1  $\mu$ l의 DNase free RNase (500  $\mu$ g/ml)를 첨가하여 37°C에서 60 분간 반응시켰다. 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1, V:V:V)를 첨가한 후 상층액에 0.1 배의 3 M sodium acetate와 2.5 배의 냉각된 100% 에탄올을 가하여 -70°C에서 DNA를 재추출하였다. 4°C, 12000g에서 45분간 원심분리한 후 DNA를 회수하여 70% 에탄올로 세척한 후 건조시켜 25  $\mu$ l의 증류수에 녹였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석을 한 후 -20°C에 보관하였다. DNA 시료 (3  $\mu$ g)를 2% 한천 겔에서 60 V로 90 분간 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하였다.

### 4. Nitrite Assay

Ding 등 (1988)에 의한 colorimetric assay에 근거하였다. 실험직전에 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride와 1% sulphanilamide /5% concentrated H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 동량으로 섞어 Griess reagent (Gr-

een *et al.*, 1992)를 만들었다. 시료를 동량의 여포액이나 배양액과 반응시켜 실온에서 10분간 방치한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 농도는 sodium nitrite standard 곡선을 이용하여 계산하였다.

### 5. 통계검증

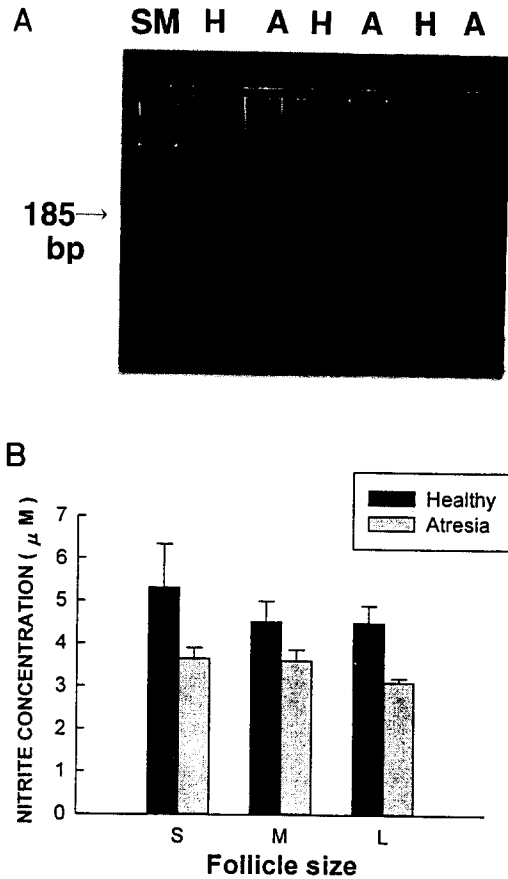
각 실험군 간의 통계적 유의성은 Student's t-test를 실시하였으며, P값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판단하였다.

## 결 과

### 1. 형태에 따라 분리한 건강한 여포와 퇴화중인 여포에서의 계놈 DNA 절편화 및 nitrite 농도 측정

형태에 따라 분리된 건강한 또는 퇴화중인 돼지 여포대, 중, 소 각각에서 분리한 과립세포에서 계놈 DNA를 추출하여 한천 겔에서 전기 영동으로 전개시키고 ethidium bromide로 염색하고 UV 위에서 관찰하였다. 퇴화 중인 과립세포에서 apoptosis의 특징 중 하나인 DNA 단편이 확인되었다 (Fig. 1A). 여포의 크기에 관계없이 퇴화중인 여포에서 분리된 과립세포에서 apoptotic DNA 절편이 확인되었으며, 건강한 여포의 과립세포에서는 고부자량의 계놈 DNA (>20 kb) 절편만 확인되었다. 돼지 여포를 크기별로 적출한 후 각각의 여포액과 Griess reagent를 반응시켜 nitrite 농도를 측정 한 결과, 건강한 작은 여포 (직경 2~3 mm)의 여포액 내 nitrite 농도는 5.21  $\mu$ M이었고, 퇴화중인 작은 여포에서는 3.67  $\mu$ M이었다. 건강한 중간 여포의 여포액 내 nitrite 농도는 4.60  $\mu$ M이었고 퇴화중인 중간 여포에서는 3.70  $\mu$ M 이었다. 건강한 큰 여포의 nitrite 농도는 4.60  $\mu$ M이었으며 퇴화중인 큰 여포에서는 3.10  $\mu$ M이었다. 크기에 관계없이 건강한 여포의 여포액내 nitrite 농도는 높았다 (P<0.05)(Fig. 1B).

### 2. 배양된 건강한 과립 세포의 계놈 DNA 절편화 및 배양액내 nitrite 농도 측정



**Fig. 1.** DNA fragmentation analysis of healthy and atretic granulosa cells (A), and nitrite concentration of healthy and atretic follicular fluid (B).

Small, medium and large follicles were removed from the porcine ovaries and then estimated healthy or atretic follicle by the morphology of granulosa cell. Granulosa cell DNA was extracted and fractionated through 2% agarose gels. NO was measured with Griess reagent as indicated in methods. Experiments were repeated more than 3 times. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. SM, size marker; H, healthy follicle; A, atresia; lane 1·2, small follicle; lane 3·4, medium follicle; lane 5·6, large follicle.

### 1) 시간별 SNP의 효과

돼지 여포 (직경 5~6 mm) 각각에서 형태적으로 분리된 건강한 과립세포만 모아서 대조군과 SNP (100

$\mu$ M) 처리군으로 나누어 6시간 간격으로 배양한 후, 과립세포에서 genomic DNA를 추출하였고, 동시에 배양액의 nitrite 농도를 측정하였다. SNP 처리군이 대조군에 비하여 apoptotic DNA 절편화가 억제되었는데, 배양하지 않은 대조군 (0 시간)과 DNA 절편화 경향이 유사하였다 (Fig. 2A).

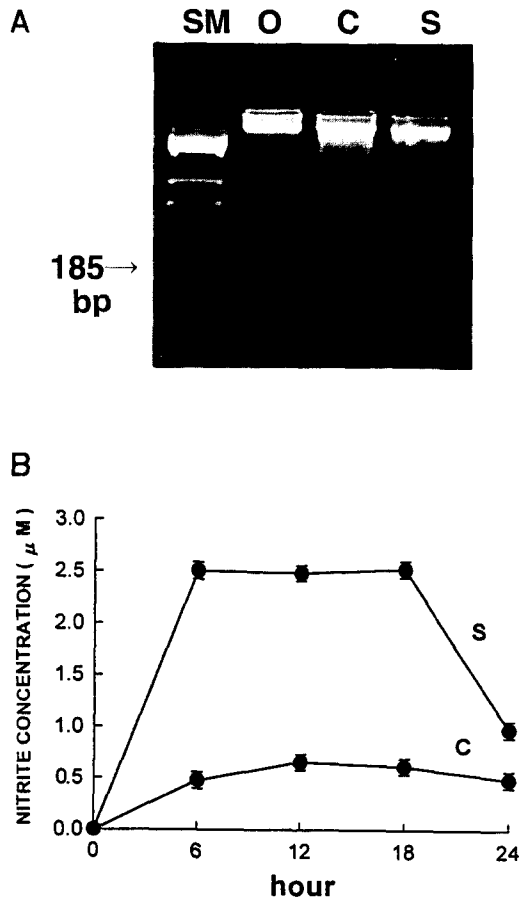
시간에 따른 SNP 처리군에서 배양액 내 nitrite 농도는 6 시간 때 2.48  $\mu$ M이었으며, 18 시간까지는 큰 변화가 없다가 24시간 때에는 0.95  $\mu$ M으로 감소되었나, SNP 처리군이 대조군에 비해 nitrite 생성이 통계적으로 유의하게 증가하였다 (Fig. 2B).

### 2) 생식소 자극 호르몬의 효과

돼지 여포 (직경 5~6 mm)에서 건강한 과립세포를 추출하여 생식소 자극 호르몬을 처리했을 경우, PMSG (3  $\mu$ g/ml) 처리군 그리고 hCG (3  $\mu$ g/ml) 처리군의 과립세포에서는 apoptotic genomic DNA 절편 (<20 kb)이 나타나지 않았고 대조군과 비교하면 apoptotic DNA 절편화가 억제되었다 (Fig. 3A). 배양액 내 nitrite 생성은 PMSG 처리군에서는 0.74  $\mu$ M이었고 hCG 처리군에서는 0.79  $\mu$ M이었으며 대조군 (0.58  $\mu$ M)에 비해 다소 증가하였다 (Fig. 3B).

### 3) Testosterone의 효과

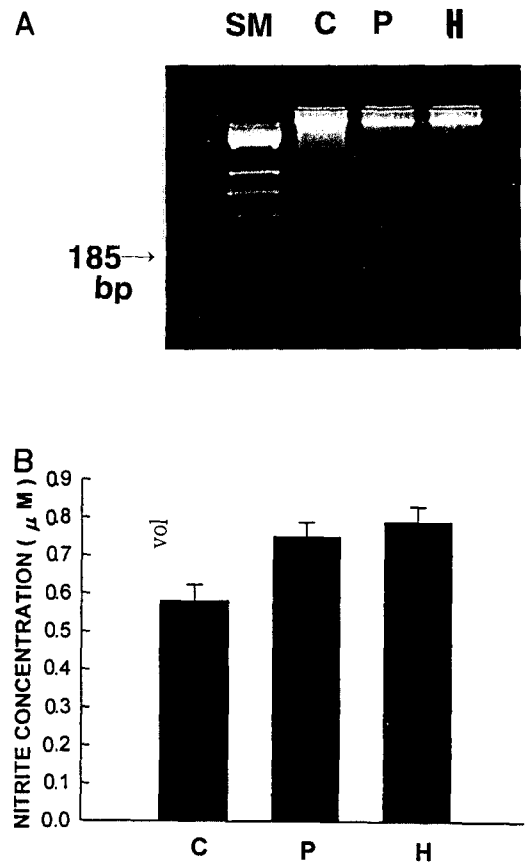
돼지 여포 (직경 5~6 mm)에서 과립세포를 대조군과 농도별 testosterone (0.03, 0.3, 3  $\mu$ g/ml) 처리군, testosterone (3  $\mu$ g/ml)+SNP (100  $\mu$ M) 처리군으로 나누어 각각 배양하였다. 24 시간 배양 후, 각 처리군의 과립세포에서 게놈 DNA를 추출하여 DNA 절편을 조사하였다. 대조군에 비해 testosterone (3  $\mu$ g/ml) 처리군에서 apoptotic DNA 절편화가 가속화되었다. 그러나 NO 공여체인 SNP+testosterone (3  $\mu$ g/ml) 처리군에서는 apoptotic DNA 절편화 억제되었다 (Fig. 4A). 대조군과 각 처리군의 과립세포 배양액 내 nitrite 생성을 비교해 본 결과 3종류의 저농도 testosterone 처리군은 대조군과 큰 차이가 없었으나 testos-



**Fig. 2. Time-dependent effect of SNP on suppressive apoptotic DNA fragmentation and profile of nitrite production in cultured granulosa cells.**

(A) Electrophoretic analysis showing fragmentation of DNA isolated from granulosa cells from medium follicles. (B) Concentration of nitrite in culture media. Granulosa cells and culture media were obtained after 24 hrs incubation with or without 100  $\mu\text{M}$  SNP and genomic DNA was extracted, fractionated through 2% agarose gels. NO was assayed with Griess reagent in culture media. Experiments were repeated three times and individual values are expressed as mean  $\pm$  SEM. SM, size marker; O, uncultured granulosa cell; C, control; S, SNP.

terone (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )+SNP (100  $\mu\text{M}$ ) 처리군에서는 nitrite 농도가 1.12  $\mu\text{M}$ 으로 현저히 증가하였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4B).

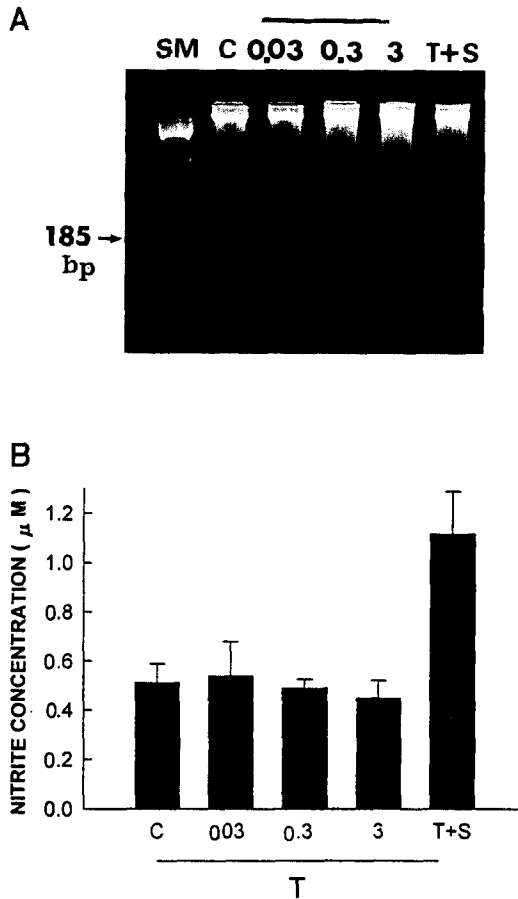


**Fig. 3. Effects of hCG and PMSG on suppressive apoptotic DNA fragmentation and increased nitrite synthesis in cultured granulosa cells.**

(A) Electrophoretic analysis showing fragmentation of DNA isolated from granulosa cells. (B) Nitrite assay with culture media. Granulosa cells and culture media were obtained 24 hours after treatment with or without gonadotropins. Granulosa cell DNA was extracted, fractionated through 2% agarose gels. NO was assayed with Griess reagent in culture media. Experiments were repeated three times and individual values are expressed as mean  $\pm$  SEM. SM, size marker; C, control; P, PMSG (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); H, hCG (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 고 찰

여포의 퇴화 기작에 nitric oxide (NO)가 미치는 영



**Fig. 4. Reversal effect of SNP on testosterone induced apoptotic DNA fragmentation (A) and suppression production of nitrite in cultured granulosa cells (B).**

Granulosa cells were incubated for 24 hrs with or without testosterone (0.03~3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and SNP (100  $\mu\text{M}$ ). After incubation, granulosa cell DNA was extracted for electrophoretic analysis and culture media were used for NO assay. Experiments were repeated three times and individual values are expressed as mean  $\pm$  SEM. SM, size marker; C, control; T, testosterone (0.03, 0.3, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); T+S, testosterone (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )+SNP (100  $\mu\text{M}$ ).

항을 알아보기 위하여 과립세포를 선택하여 실험하였다. 형태학적 분류에 근거하여 크기에 따른 각각의 여포를 건강한 여포와 퇴화중인 여포로 분리한 후, 여포액에

서 nitrite 농도를 측정하였고 과립세포에서 게놈 DNA를 추출하여 apoptotic DNA 절편화를 비교, 분석하였다. 크기에 관계없이 건강한 여포 각각의 여포액 내 nitrite 생성 정도가 퇴화중인 여포의 여포액에서 보다 높았다 (Fig. 1B). 아울러 퇴화중인 여포의 과립세포에서만 apoptotic 게놈 DNA 절편 (<20 kb)이 확인되었으며, 건강한 여포의 과립세포에서는 고분자량의 DNA 절편 (>20 kb)만 확인되었다 (Fig. 1A). 다른 연구에서도 퇴화중인 과립세포에서 게놈 DNA 절편이 확인됨으로서 apoptosis에 의해 세포가 소멸되는 것이 보고되었다. (Hughes & Gorospe, 1991; Tilly *et al.*, 1991). 이러한 게놈 DNA 절편현상은 apoptosis의 대표적인 특징으로 apoptosis body와 핵의 응축과 같은 세포 죽음의 형태학적인 특징에 선행하여 나타나는 현상이다. 본 실험에서 여포의 크기에 관계없이 퇴화중인 여포에서는 DNA 절편현상이 일어났으며, 동시에 NO 농도는 낮았다. 이러한 현상을 이용하여 돼지여포의 퇴화여부를 DNA 절편 또는 NO 농도로 판정할 수 있는 모델로 응용이 가능할 것이다. Nitrite 생성이 퇴화중인 여포보다 건강한 여포에서 많이 생성되며 게놈 DNA 절편화 현상이 나타나지 않으므로 NO가 여포 atresia 기작에 관여하는 것으로 생각된다. 따라서 NO의 공여체로 알려진 SNP를 여포에 처리하여 nitrite 생성과 게놈 DNA 절편을 비교하였다. 실험의 결과 SNP 처리군이 대조군에 비하여 게놈 DNA 절편을 비교하였다. 실험의 결과 SNP 처리군이 대조군에 비하여 게놈 DNA 절편화가 억제되었고, nitrite 생성은 현저히 증가함을 보였다 (Fig. 2). 따라서 NO는 여포 atresia를 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 NO가 어떤 경로를 통하여 여포 퇴화를 억제시키는가는 연구 더 필요하다.

건강한 과립세포만 선택하여 여포의 퇴화를 유도 또는 억제하는 것으로 알려진 PMSG, hCG, testosterone과 testosterone + SNP를 함께 처리하여 실제로 여포퇴화와 NO가 관련이 있는지 확인해 보았다. 실험 결과 여포성숙 유도물질로 알려진 PMSG와 hCG 처리군에서는 nitrite 생성이 증감함과 동시에 게놈 DNA 절

변화 현상은 억제되었다 (Fig. 3). 반대로 testosterone 처리군에서는 농도증가에 따라 nitrite 생성은 점차 감소되는 현상을 보였으며, 여기에 SNP를 동시에 처리했을 경우 nitrite 생성이 현저히 증가하며, 동시에 DNA 절편화가 억제되는 양상을 나타내었다 (Fig. 4). 이러한 현상은 testosterone이 난소 과립세포의 apoptosis를 가속화시킨다는 Billig 등 (1993)의 결과와 일치하며, 여포성숙 과정에는 NO가 관련됨을 증명하는 것이다. 또한 생식소 자극 호르몬과 스테로이드 호르몬이 여포성숙 과정에서 NO 합성효소인 nitric oxide synthase (NOS)에 간접적으로 작용하여 nitrite 생성을 조절하는 것으로 추측된다.

이상의 결과에서 여포의 성숙에는 생식소 자극 호르몬이 필수적이며, 생식소 자극 호르몬은 스테로이드 호르몬 합성뿐만 아니라 간접적으로 NO 생성에도 관여할 것으로 추측된다. 생성된 NO는 아마도 oxidant stress를 해소시키는 작용을 할 것으로 추측된다 (Kanner *et al.*, 1992; Hockenbery *et al.*, 1993; Sandstrom *et al.*, 1994). 추후에 여포 성숙 기작에서의 NO 역할에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW (1993): Estrogen inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133: 2204-2212.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pangano PJ, Conen RA (1994): Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850-853.
- Ding AH, Nathan CJ, Stuehr DJ (1988): Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 145:940.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess Williams R (1988): Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.
- Gillespie JS, Liu X, Martin W (1989): The effects of L-arginine and N<sup>G</sup>-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 98:1028-1082.
- Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, Holtz J (1994): Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Comm* 205:905-910.
- Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda, U (1993): Nitric Oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J Biol chem* 268:27108-27185.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982): Analysis of nitrate and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- Guthrie HD, Weich GR, Cooper BS, Zakaria AD, Johnson LA (1994): Flow cytometric determination of degraded deoxyribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory maturation of the pig. *Biol Reprod* 50:1303-1311.

- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993): Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.
- Hughes Jr FM, Gorospe WC (1991): Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129: 2415-2422.
- Kanner J, Harel S, Granit R (1992): Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. *Lipids* 27:46-49.
- Lancaster JR, Hibbs J (1990): EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1223-1227.
- Lander HM, Sehajpal PK, Novogrodsky A (1993): A nitric oxide signaling: A possible role for G proteins. *J Immunol* 151: 7182-7187.
- Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW (1993): expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. *J Biol Chem* 268: 1908-1913.
- Mannick JB, Koichiro A, Kenneth I (1994): Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79: 1137-1146.
- Moncada S, Paimer RM, Higgs EA (1991): Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Nathan CF, Hibbs J (1991): Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70.
- Nathan C (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- Peunova N, Enikolopov G (1993): Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 364: 450-453.
- Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM (1994): Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukocyte Biol* 55: 221-226.
- Schmidt HW, Walter U (1994): No at work. *cell* 78: 919-925.
- Schray-Utz B, Zeiher AM, Busse R (1993): Expression of constitutive NO synthase in cultured endothelial cells is enhanced by 17- $\beta$  estradiol. *Circulation* 88: (Abst. 0416) I-80.
- Shukovski L, Tsafirri A (1994): The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *endocrinology* 185:2287-2290.
- Tilly JL, Hsueh AJW (1993): Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptosis DNA fragmentation. *Cell Physiol* 154: 519-526.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW (1991): Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129: 2779-2801.