

Rat 황체세포 배양에 있어서 Prolactin에 의한 황체퇴행 및 Fas Ligand의 발현

장규태 · 박미령 · 손동수* · 윤창현
경상대학교 축산학부

Cell Surface Interaction with Expression of Fas Ligand Mediates Prolactin-Induced Apoptosis in Rat Luteal Cell Culture

K. T. Chang, M. R. Park, D. S. Son* and C. H. Yun

Faculty of Animal Science, Gyeongsang National University

SUMMARY

Prolactin (PRL) surge in cycling rats at proestrous afternoon has previously been reported as an inducer of apoptotic cell death of luteal cells. This death-inducing action of PRL seems unusual, because PRL can be categorized as a cell-survival factor, if other known physiological functions of PRL are taken into account. In this study, the apoptotic action of PRL was assessed in cultured cells prepared from rat luteal tissue and underlying molecular /cellular mechanism of PRL-induced luteolysis was analyzed. The latest crop of corpora lutea (CLs) were enucleated from rat ovaries at 18:00 h on the proestrous day before the next ovulation. Donor rats were pretreated with CB154, a dopamine agonist, in order to be exempted from the endogenous PRL surge. The harvested CLs were dispersed and cultured with or without PRL (2 μ g/ml) for 24 or 48 h. An addition of PRL to the culture medium changed the parameters indicative of cell death via apoptosis; a decrease in cell viability (MTT) and an increase in chromatin condensation.

Most of the DNA breakdown in nuclei induced by PRL occurred in steroidogenic cells which were identified by 3 β -HSD activity staining, and the number of 3 β -HSD-positive cells were significantly decreased. Interestingly, most of the cells with an apoptotic nucleus adhered to one or more intact and seemingly non-steroidogenic cells.

Because the expression of Fas has been shown to be abundant in murine ovary, and Fas is known to have an exact physiological role in occurrence of apoptotic cell death, the membrane form-Fas ligand (mFasL) was quantified in the cell lysate. An addition of PRL increased expression of mFasL. Moreover, an addition of concanavalin A (ConA), a T-cell specific activator, in place of PRL, enhanced the apoptotic parameters. Cumulatively, the apoptotic PRL action was addressed to cells unknown than steroidogenic luteal cells. The most probable candidate for the direct target cells is T-cells in the luteal tissue that can express mFasL in response to PRL.

(Key words: CLs, PRL, apoptosis, mFasL)

* 농촌진흥청 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, Rural Development Administration)

서 론

정상적인 발정주기를 유지하기 위해서는 기능적으로 황체퇴행이 일어난 뒤 일정한 시기에 구조적으로 황체퇴행이 일어난다고 보고되고 있다(Malven, 1969; Tilly, 1996). 이와 같은 현상은 발정전기 오후에 분비되는 PRL의 surge에 의하여 유도되는 것으로 알려져 있다. PRL의 surge로 인하여 황체의 무게는 물론, 크기 및 스테로이드성 기능을 잃게 되고, 그러한 결과로 짧은 시간내에 조직적이고 체계적 퇴화가 일어난다(Malven과 Sawyer, 1966; Wuttke와 Meites, 1971; Takahashi 등, 1978; Endo 등, 1993). 구조적으로 황체퇴행이 일어나기 위해서는 세포외막에 있는 기질의 퇴화와 ascorbic acid의 소실이 필수 조건이다(Endo 등, 1993). 또한 MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)의 발현도 PRL에 의해 유도된 황체퇴행과 관련이 있다고 보고되고 있으며(Bowen 등, 1996), PRL의 황체퇴행작용은 프로스타그란딘 억제제와 glucocorticoid의 면역억제의 수준에 의하여 저지될 수도 있고, 이와 같은 사실은 일부 면역세포들이 구조적으로 황체퇴행이 일어나는 동안에 없어서는 안될 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 1993; Sanchez 등, 1987).

배란기에 있어 세포소멸 현상으로서 rat에 있어서는 발정주기동안 단단계적으로 구조적 황체퇴행으로부터 세포소멸로 이어진다고 한다(Matsuyama 등, 1996). DNA 무사분열은 PRL에 의해 유도되며 발정전기 PRL surge는 CB154에 의해 억제시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Matsuyama 등, 1996; Kanuka 등, 1997). 현재까지 알려져 있는 PRL의 생리적 기능 및 특성을 살펴보면 PRL은 세포소멸을 억제하는 “생존요인(survival factors)”으로서 작용하는 중요한 성장요인의 하나로 분류되어지며, 또한 위임신 rat의 황체로부터 분리하여 배양된 황체세포의 생존율을 증가시킨다는 보고가 있다(Kanuka 등, 1997). 이러한 이유로 PRL의 황체퇴행작용은 다소 특이한 것으로 알려져 있다. Fas는 FasL나 agonistic anti-Fas항체와 결합하므로 세포소멸 유도 signal을 매개체로 하는 세포 표면에

존재하는 receptor로서 보고되고 있다(Nagata와 Golstein, 1995). 최근 연구보고에 의하면 Fas와 Fas Ligand의 시스템은 생식기조직의 재구성에 영향을 미친다고 하였다(Guo 등, 1994; Quirk 등, 1995; Hakuno 등, 1996; Sakamaki와 Yonehara, 1996; Myoumoto 등, 1997; Sakamaki 등, 1997). 그리고 Fas의 상당량이 생식기관내에서 발현되었으며(Watanabe 등, 1992; Guo 등, 1994; Quirk 등, 1995; Sakamaki와 Yonehara, 1996; Sakamaki 등, 1997), anti-Fas 항체는 *in vitro*에서 사람이나 생쥐의 황체퇴행에 있어서 활성적이었고(Quirk 등, 1995), *in vivo*에서는 구조적 황체퇴행과 난포폐쇄를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Sakamaki와 Yonehara, 1996; Myoumoto 등, 1997; Sakamaki 등, 1997). 이러한 이유로 Fas와 FasL 시스템은 Fas ligand인 FasL의 발현을 통하여 황체에서는 확인되지 않았지만 발정주기동안 구조적 황체퇴행의 주요인의 하나로 취급되어 진다.

본 연구에서는 PRL의 황체퇴행에 미치는 영향을 *in vitro*에서 정상주기 rat의 황체조직으로부터 황체세포를 분리하여 배양하였고, 구조적 황체퇴행 유도를 위한 세포소멸 유도인자인 FasL의 발현 여부를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

8주령의 암컷 Wistar Immamichi rat로부터 1~2개월 동안 14L : 10D의 일반적인 관행법에 의하여 사육 관리하였다. 발정주기는 매일 오후 4시경에 관찰한 후 지속적으로 4일 주기의 정상적인 발정주기를 나타내는 개체만을 공시하였다. 황체는 다음 배란이 일어나기전 발정전기 당일 오후 6시에 8~14주령된 rat의 난소로부터 적출하였다. 난소로부터 황체를 적출하기전 발정전기 당일 오전 10시~12시 사이에 PRL surge를 억제시키기 위하여 0.3% tartaric acid에 도파민 작용물질(dopamine agonist)인 CB154를 용해하여 2mg/ml/kgBw을 Matsuyama 등(1996)의 방법에 준하여 투여하였다.

2. 공시 시약

본 시험에 사용된 시약은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium; 430-1600 ED, Gibco BRL), FBS(Fetal Bovine Serum; 200-6140 AJ, Gibco BRL), Collagenase(collagenase type 2; 45-0041-76, Worthington Biochemical Co.), DNase I(Deoxyribonuclease I; D4527, Sigma Chemical Co.), ConA(concanavalin A; C-5275, Sigma Chemical Co.), Progesterone(P-0130, Sigma Chemical Co.), 20 α -OHP(4-pregnen-20 α -ol-3-one; P-6288, Sigma Chemical Co.) 및 Ovine PRL(L-7135, Sigma Chemical Co.) 등 이었다.

3. 황체세포의 준비 및 배양

황체세포의 분리는 Matsuyama 등(1996)의 방법에 준하였으며, 적출된 황체는 0.4% collagenase를 함유하고 있는 HEPES buffer(137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 25mM HEPES)로 37°C에서 분산시켰다. 분리후 세포를 2회 세정하고 세포수를 계산하였다. 이때의 생존율은 trypan blue염색으로 살펴본 결과 91.1 \pm 6.0%로 나타났다. 세포는 각 well당 0.25ml의 배양액에 약 32,000개로 96 well plates(0.28cm²; Cell Culture Cluster Dish, Costar)에 접종하여 medium A(DMEM containing 10% FBS, 20mM HEPES, 50U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin)에서 배양하였다. 배양액은 24시간마다 교환하였으며, 스테로이드성 호르몬 측정을 위해 사용하였다. PRL의 첨가량은 Nequin 등(1979)의 방법에 준하였다.

4. 세포 생존율 검사

배양된 세포의 생존율 검사는 세포내 mitochondria가 활발하게 살아있는 세포에 형태학적으로 세포 수축현상을 일으키는 yellow tetrazolium salt 물질로 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium/Br)의 일종인 WST-1(Dojindo Co.)이 들어있는 Dojindo cell counting kit를 사용하여 실시하였다. 배지로부터 aspirator로 배양액을 제거하고 phenol red를 뺀 medium A 100 μ l를 넣은 후 testing solution 10 μ l(0.01% WST-1, 0.2mM 1-methoxy PMS in 20mM HEPES, pH 7.4)를 각 well에 첨가하여 4시간동안 37°C

에서 배양하였다.

흡광도(OD)는 600nm의 파장을 기준으로 405nm로 산출하였으며, MTT 분석은 준비된 신선한 rat 황체세포를 이용하여 측정하였다. 생존하여 있는 세포를 6,000에서 30,000개까지의 수치를 대조적 형태로서 기준치를 설정하여 MTT분석치를 환산한 비율로서 산출하였다.

5. Steroidogenic 세포와 apoptotic 핵의 퇴화 및 세포응집 검사

3 β -HSD(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) activity염색으로 steroidogenic 세포를 검토했기 위하여 분산되어진 세포는 0.5ml의 medium A가 들어있는 8개의 chamber slides(Nunc Inc.)에 각 Chamber당 1.25 \times 10⁵개의 농도로 24시간 동안 배양을 실시하였다. 배양후 PBS로 세정하고 PBS 반응용액(1.16mM nicotinamide, 0.18 mM NBT, 0.72mM β NADP, 6.25% propylene glycol, 1.25 mM EDTA, 86.7 μ M dehydroepiandrosterone, 0.1% BSA)을 실온에서 10분 동안 다시 배양을 실시하였다. Steroidogenic 세포의 빈도수는 각기 200개의 세포수를 세어 푸른색으로 염색된 수로 측정하였고, 세포소멸단계에 있는 세포는 apoptotic 핵을 관찰하여 확인하였다. 대부분의 경우 3 β -HSD activity가 염색된 세포만을 사용하였고, 그 중 일부는 3 β -HSD가 염색되지 않은 세포를 사용하였다. 전자의 경우 염색반응을 중단시키기 위하여 PBS로 세정한 후 4°C에서 30분동안 4% PFA로 고정 또는 무고정하여 Hoechst 33258로 염색하였다. 분산된 이질성 염색질을 가진 핵은 정상적인 것으로 판단하였고, 이때 apoptotic 핵은 수축되었거나 핵의 무사분열현상으로 나타났다. Apoptotic 핵의 수가 100개에서 200개 정도 지닌 세포군을 응집비율을 계산에 포함시켜 산출하였다.

6. 호르몬 측정

배양액 중의 progesterone(P₄+20 α -dihydroprogesterone 및 20 α OHP)농도는 RIA(radioimmunoassay)법에 의해 측정하였다. Medium은 1ml의 Milli-Q로 희석하고 2ml diethyl ether로 2회 추출한 후, 그 추출물은 P₄나 20 α -OHP에 대한 특이 항

체를 사용하여 chromatography 없이 RIA를 실시하였다. 이들 특이항체에 대한 steroid의 반응 정도는 Naito 등(1986)의 방법에 준하였으며, linearity 범위는 50pg에서 1,600pg이었다.

7. Immunoprecipitation and Western blotting

배양된 세포에서 rat FasL의 발현 정도는 immunoprecipitation에 의하여 결정하였으며, Tanaka 등(1995)에 의해 보고된 rat FasL에 대한 특이 항체를 사용하여 Western blot을 실시하였다. 황체로부터 분리해 낸 세포는 각 well당 7.5ml medium A (DMEM containing 10% FBS; 20mM HEPES, 50 μ /ml penicillin 및 0.1mg/ml streptomycin)에 9.5×10^5 개의 농도로 6-well plates (Cell Culture Cluster Dish, Costar)에 분주하여 24시간 동안 배양한 후 원심분리하여 사멸된 세포는 제거하였다. Cell lysate는 RIPA buffer (20mM Tris, 1% SDS, 1% Triton-X100, 1mM PMSF, 50mg/ml leupeptin) 1ml에 용해하여 원심분리하고 얻어진 상층액은 immunoprecipitation에 사용하였다. 배양된 배지의 40 μ l 혹은 200 μ l의 cell lysate는 비특이 결합 활성을 제거하기 위하여 4 $^{\circ}$ C에서 10 μ l protein A-sepharose 4B (Pharmacia Biotech.)와 함께 하룻밤 배양시켰으며, 또한 rat FasL의 세포외막 domain에 결합시키기 위하여 10 μ g anti-rat FasL antibody (C-20, sc-1790; Toyobo Inc.)와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 그 beads는 0.1% NP-40을 함유하고 있는 TBS로 5회 세정하여 20 μ l loading buffer에 부유시켰다. 15% polyacrylamide gel에 전기영동시킨 다음 단백질을 실온에서 1시간 동안 30v로 PVDF membranes (Millipore)으로 옮겼다. 4 $^{\circ}$ C에서 4% Block Ace (Dainihon Seiyaku)로 하룻밤 blocking 후 membrane을 실온에서 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C Block Ace와 0.5% BSA를 포함하고 있는 PBS에 anti-rat FasL을 2000배로 희석하여 배양하였다. 0.1% Tween 20이 들어있는 PBS에 30분 동안 3회 soaking한 후 membrane을 1,000배로 희석된 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 함께 실온에서 30분 동안 배양하였다. Membrane은 0.1% Tween 20이 들어있는 PBS에 30분 동안 3회 soaking 실시한 후, 항체에 의해 인식된 단백질은

ECL system kit (Clone Tech.)를 사용하여 관찰하였다.

8. 통계분석

Data 통계 처리는 t-test의 ANOVA 방법으로 유의 수준 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 로 검증하였다.

결 과

1. 황체로부터 분리한 전 세포 배양시 PRL 첨가가 세포에 미치는 영향

발정전기상에 있는 개체에 CB154를 투여한 후 당일 오후 6시에 적절한 황체로부터 분리한 전 세포의 배양액 중에 PRL을 첨가하여 24시간 배양한 결과, 세포의 생존율은 PRL의 첨가 시기 및 양에 따라 유의적 ($P < 0.05$)으로 감소하는 경향으로 나타났다 (Fig. 1b). 황체퇴행에 의해 사멸세포의 핵염색체 수축 현상이 PRL이 첨가된 배지의 세포에서 특히 많이 발견되어졌다. 황체로부터 분리된 세포는 섬유아세포, 내피세포와 같은 비올로서 steroidogenic 세포와 steroidogenic 황체세포로 구성되어 있는 Pate(1995)의 보고와 거의 유사하게 나타났다. 이러한 세포가 oligonucleosome 형성과 세포수명 단축에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 배양된 세포에 steroidogenic 세포를 식별할 수 있는 3 β -HSD activity 염색을 실시하였다. Table 1에 나타난 것처럼 PRL의 첨가로 apoptosis 세포의 증가는 attached 세포(65%의 control)의 감소로서, 그리고 progestin(P4 + 20 α OHP)의 감소와 함께 3 β -HSD 양성 세포 및 steroidogenic 세포도 감소 현상을 가져왔다. 염색체 수축은 steroidogenic 세포에서 특히 많이 나타났는데, 이와 같은 결과는 황체퇴행 과정에 있는 대부분의 세포들은 steroidogenic 세포로 판단되었다.

2. PRL의 첨가에 의한 황체퇴행

염색체가 농축된 apoptotic 세포의 수가 대조군 (8.75 ± 0.75 cells/mm²)에 비하여 PRL이 첨가된 배지 (11.33 ± 0.33 cells/mm²)에서 유의적 ($P < 0.05$)으로 높은 수치로 나타났다. Apoptotic 세포는 세포용집과 구성비 정도에 따라 비apoptotic 세포

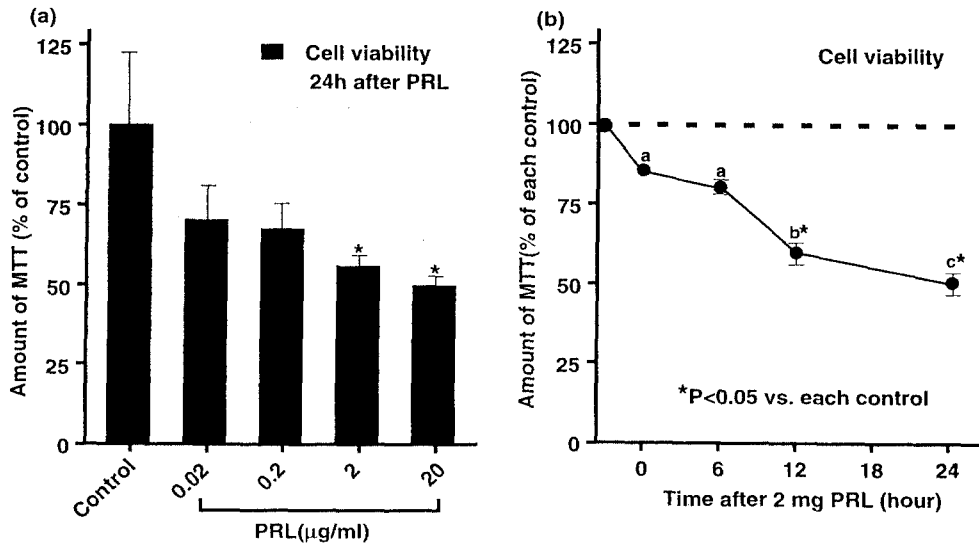


Fig. 1. (a): Dose-dependent effect of PRL on the viability of cultured cells collect from CLs at proestrus 18:00 h. The animals had been pretreated with CB154 before the PRL surge. The cells were cultured for 24 h in the presence of different concentrations of PRL. Cell viability was measured by MTT assay. The results are expressed as percentages of average viability in control cells cultured with a vehicle (mean \pm SE, n=4, *P<0.05 vs control). (b): Time dependent effect of PRL on viability of cultured cells. The cells from CLs were cultured for 24 h in the presence of 2µg/ml PRL. The results are expressed as percentages of average viability in control cells cultured with a vehicle (mean \pm SE, n=4,*P<0.05 vs control).

Table 1. The effect of PRL on the number of total or steroidogenic cells culcured

	Total cells /mm ²	Progesterin (ng/ml)	3βHSD-positive cells/mm ²	3βHSD/total cells(%)
Control	113.5±5.2	165.1±1.6	44.3±2.3	39.2±1.8
PRL	74.3±6.2	132.3±6.8	19.5±2.6	26.3±3.0
No.	n=6	n=4	n=6	n=6
P value	P<0.001	P<0.01	P<0.001	P<0.01

The cells were collected from CL at proestrous 18:00 h. The donors had been pretreated with CB154 before the occurrence of PRL surge. The cells were cultured for 24 h in the presence of PRL (2µg/ml) in chamber-slides. Supernatants were collected for RIA of progestins (progesterone plus 20α-dihydroprogesterone). Luteal cells were fixed and stained with 3β-HSD activity staining and counted for calculation. The values were expressed by mean \pm SE.

와 구분하였다. PRL을 첨가하지 않은 대조구에서는 무사분열이 일어난 염색질이 single segregated 세포에서 가장 높았고 부착된 세포수에 따라 응집된 세포수가 감소하는 경향으로 나타났으나, 반면 PRL첨가로 인한 황체퇴행의 3/4이상이 2개 혹은

그 이상의 세포와 응집하여 있는 것으로 나타났다.

3. PRL첨가에 의한 Fas ligand의 발현

FasL은 배지와 Western blot에 의해 immunoprecipitation에 의해 배양된 세포 lysates에서 검

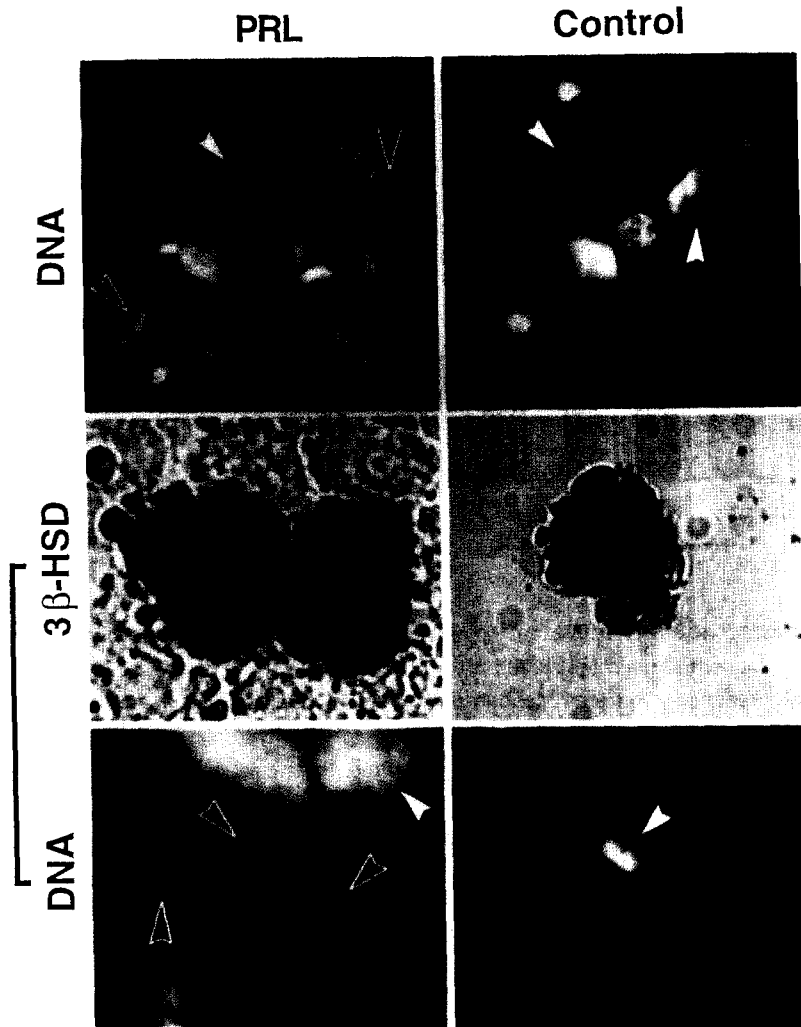


Fig. 2. Hoechst 33528 staining of cultured luteal cells (bar=10 μ m). The cells from CLs (see the legend for Fig. 1 for details) were cultured for 24 h in the presence of PRL or the control vehicle. At the end of incubation, the cultured cells were fixed and nuclei were stained with Hoechst 33528. (a): PRL (2 μ g/ml), (b): control. Solid arrow indicates the apoptotic nuclei with chromatin condensation.

출하였다. sFasL의 크기와 일치하는 26kD의 signal이 배지뿐만 아니라 세포 lysate에서도 발견되었고, preparation medium에서 26kD의 발현에 큰 차이는 보이지 않았지만 PRL이 lysate세포에 영향을 다소 미치는 것으로 나타났다. mFasL의 크기와 상응하는 40kD도 lysate 세포에서도 검출되었다. 또한 이러한 두개의 signal은 PRL을 첨가한 배양된 세포에서도 증가되는 것으로 나타났다.

4. ConA가 세포생존율 및 Fas ligand의 발현에 미치는 영향

ConA는 특히 T-cell 활성화인자 뿐만 아니라 FasL 유도물질로서 잘 알려져 있으며 본 실험에서는 황체로부터 적출된 세포배양을 위하여 배지에 PRL을 첨가하였다. ConA 0.5 μ g/ml 또는 5 μ g/ml의 첨가는 PRL의 작용만큼 세포의 생존율을 감소시켰으나 50 μ g의 ConA의 양을 첨가하면 오히려 세포의 생존율 감소에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

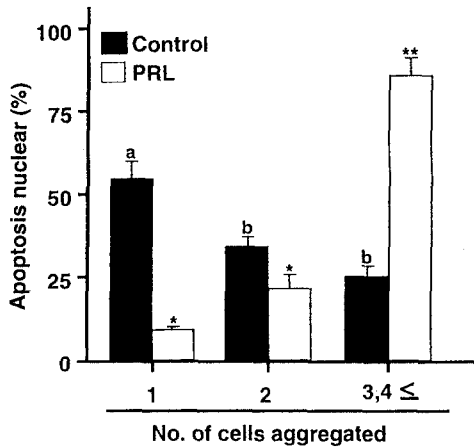


Fig. 3. The effect of cell aggregation on the percentage of luteal cells undergoing apoptosis. After 24 h of culture with PRL (2 μ g/ml) or the control vehicle, apoptotic cells were identified by the presence of apoptotic nuclei. The results are expressed as percentages of the total number of apoptotic cells (mean \pm SE, n=4). Different letters or symbols (a vs b, *vs**) indicate significant differences (P<0.01).

이는 cell preparation 과정에 있어서 ConA의 T-cell의 mitogenic활성 때문인 것으로 생각되어진다. ConA 5 μ g/ml이 첨가된 배양 세포에 있어서는 40kD의 mFasL과 26sFasL의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다.

고찰

본 실험에서 PRL의 첨가는 내분비 PRL surge를 억제시키기 위하여 CB154를 투여한 발정전기 rat의 황체로부터 적출하여 배양된 세포들중 세포소멸의 수를 증가시켰으며, 황체로부터 적출하여 배양한 세포에 있어 PRL 첨가로 인한 세포소멸이 일어나는 것으로 나타났다. PRL은 세포재생 요인 혹은 T-cell, splenocyte, Nb2 lymphoma cell에서 나타난 것처럼 mitogenic 활성요인으로 볼 수 있는 Shiu 등(1983)의 보고와 거의 일치하는 경향이였다. PRL은 위임신 중기상태의 rat로부터 추출한 황체세포의 생존률을 증가시킬 뿐만 아니라(Kanuka 등, 1997), PRL의 luteotropic 기능으로부터 luteolytic 기능을 식별할 수 있는 어떤 메카니즘이 존재하는 것으로 사료된다. 비록 황체조직에 있는 대부분의 세포가 steroidogenic 세포이지만, 대체로 생

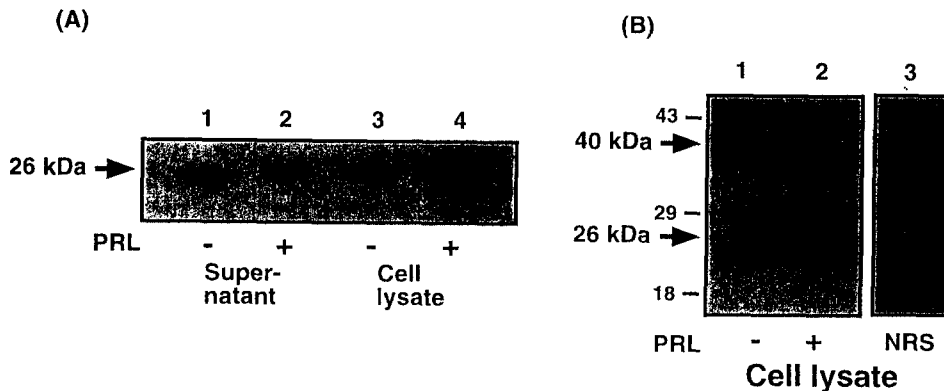


Fig. 4. Western blot analysis of Fas ligand in the cultured cells from CLs (see the legend for Fig. 1 for details). (A): The cell lysate (left 2 lanes: PRL + or -) and the medium (right 2 lanes: PRL + or -) preparations were analyzed by immunoblotting with anti-Fas ligand antibody to detect a soluble form Fas ligand (sFasL). (B): The cell lysate preparations from the cultured cells with or without PRL (PRL + or -) were analyzed by immunoblotting with anti-Fas ligand antibody to detect soluble form (sFasL) and the membrane form of Fas ligand (mFasL). The first antibody was replaced with normal rabbit serum (NRS; right lane) for detecting non-specifically bound proteins.

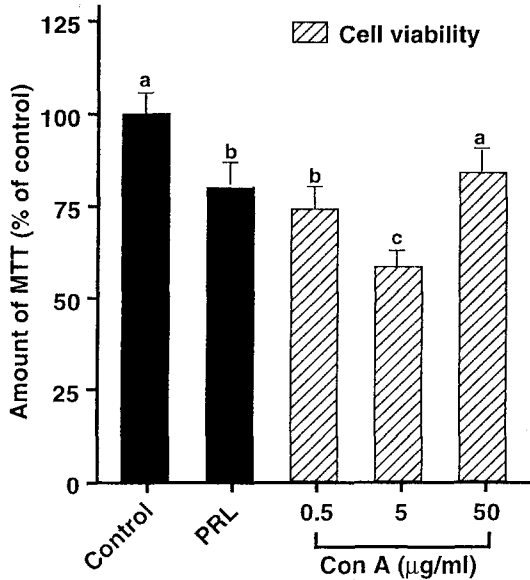


Fig. 5. The apoptotic effect of PRL and concanavalin A (conA) on the viability of cultured luteal cells collected from CLs (see the legend for Fig. 1 for details). The cells were cultured for 24 h in the presence of PRL (2µg/ml) or different concentrations of ConA. The cell viability was measured by MTT assay. The results are expressed as percentages of average viability in control cells cultured with a vehicle (mean ± SE, n=8, *P<0.05 vs control). Different letters indicate significant differences.

식기조직과 관련된 생식세포 활성의 조절과 관련있는 이질성 세포군으로 이루어져 있으며 (Plate, 1995), steroidogenic 세포의 기능은 세포와 세포간의 접촉 혹은 성장요인의 분비를 통해 내피세포와 섬유아세포에 의해 전환되는 것으로 생각되어진다. 황체세포의 macrophages로부터 분비되는 TGF-β는 황체기능을 정상적으로 유지시키기 위한 전구물질로서 보고 (Matsuyama 등, 1990; Matsuyama와 Takahashi, 1995)된 내용과 같이 PRL의 luteotropic 기능의 상반성은 황체조직에서 비관련 세포군집의 기능조절로 생각되어진다. 발정주기동안 황체퇴행은 새롭게 형성된 황체로부터 progesterone 분비 활성의 기능이 상실되고, 다음 배란을 유도하기 위

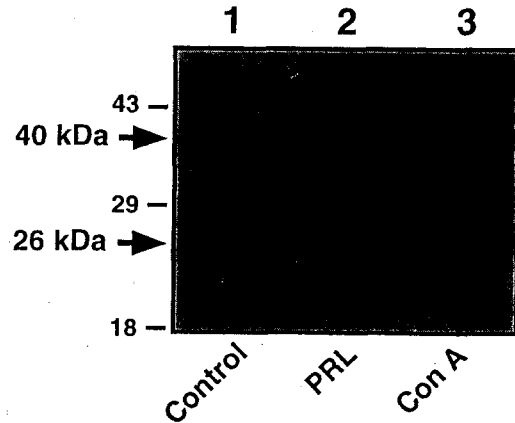


Fig. 6. Western blot analysis of Fas ligand in the cultured cells from CLs (see the legend for Fig. 1 for details). The cells were cultured for 24 h in the presence of PRL or ConA. The cell lysate preparations were analyzed by immunoblotting with anti-Fas ligand antibody which can detect the soluble form (sFasL) and the membrane form of Fas ligand (mFasL). Left lane: control (vehicle), middle lane: PRL (2µg/ml) and right lane: ConA (5µg/ml).

해 gonatotropin의 분비를 촉진시키는 것으로 PRL의 첨가로 인한 황체로부터 분리한 세포로부터는 progesterone 분비 감소현상을 나타내는 것으로 생각되어진다. 이와 같은 감소 현상의 주원인은 steroidogenic 세포에 있는 세포소멸 현상 때문인 것으로 사료되며, PRL의 황체퇴행 작용은 직접적으로 steroidogenic 세포 측면에서 설명되어질 수 있으나, steroidogenic 기능을 유지할 것으로 기대되는 비관련세포의 군집현상에 대하여는 많은 검토가 요구되어진다. 대체로 *in vitro*에서 다른 세포에 대한 세포와 세포간의 접촉은 황체퇴행을 억제하는 현상이지만 세포농도의 증가는 성장요인 또는 cytokines의 파라크린 효과를 통해 세포생존률이 증가하는 것으로 보고되었다 (Raff, 1992; Raff 등, 1993). 난소 과립막세포 배양에 있어 과립막세포의 응집현상은 황체퇴행을 상당히 억제하는 것으로 보고되었

는데(Pate, 1995), 본 연구에서는 apoptotic steroidogenic 세포수는 그들 세포가 다른 세포에 접촉할 때 감소하는 것으로 나타났다. 그렇지만 PRL을 배지에 첨가하였을 때 이와 같은 현상은 완전히 block되었다. Apoptotic steroidogenic 세포의 대부분은 비 apoptotic 및 steroidogenic 세포에 접촉하여 있었고, 세포간의 접촉은 steroidogenic 세포에 있어 황체퇴행을 유도하기 위한 PRL의 작용과 상당한 관련이 있는 것으로서 rat의 황체세포에서는 Fas와 TNF receptor의 구성원인 FasL의 많은 양이 발현되어지기 때문인 것으로 알려져 있다(Watanabe 등, 1992; Guo 등, 1994; Quirk 등, 1995; Sakamaki와 Yonehara, 1996; Myoumoto 등, 1997; Sakamaki 등, 1997). FasL은 Fas와 결합하여 Fas가 발현된 세포에서 세포소멸을 유도한다고 한다(Suda 등, 1993; Quirk 등, 1995). FasL은 steroidogenic 황체세포에서 PRL에 의해 유도되는 황체퇴행의 요인인자로서 알려져 있다. 본 실험에서 PRL은 황체로부터 분리하여 배양된 세포에서 FasL의 발현을 증가시켰는데, 이것은 lysate에 있는 mFasL의 발현을 특이적으로 증가시켰기 때문인 것으로 사료되며, 황체퇴행의 유도를 불활성화시키는 sFasL의 발현은 증가되지 않았다고 한 Tanaka 등(1995)의 보고와 잘 일치하고 있다. 잠정적으로 rat의 구조적 황체퇴행의 예측되는 메카니즘은 첫째, PRL은 일부 세포에 의해 발현된 세포의 receptor와 결합하여 세포 표면의 mFasL의 발현을 증가시키며, 둘째, mFasL을 발현하는 세포는 세포와 세포간의 접촉을 통해 Fas를 발현하는 steroidogenic 세포와 작용하여 세포소멸을 유도하는 것으로서 황체조직에서 어떤 세포가 mFasL을 발현시키고 steroidogenic 세포에서 세포소멸을 유도하는 것일까에 대하여는 아직 불투명한 실정이다. ConA는 T-cell의 특이활성물질이고 splenocytes와 T-cell에서 FasL의 발현을 유도하는 것으로 잘 알려져 있는데(Suda 등, 1993; Suda 등, 1995), 배양된 세포배지에 PRL 대신 ConA를 첨가하면 세포의 생존율을 감소시킬 뿐만 아니라 PRL을 첨가했을 때와 비슷한 수준으로 FasL의 발현을 증가시켰다. 본 연구에서도 황체로부터 분리하여 배양한 세포는 T-cell이 포함되어 있어 황체조직에서 T-cell이 ConA와 반

응하고 FasL 발현의 주원인으로 생각되어진다. 황체조직에 있는 T-cell에서 PRL이 mFasL을 발현시킨다고 볼 수 있는 확실한 증거는 없지만 결과적으로 PRL이 IL-2와 비슷하게 T-cell의 FasL 발현경로를 활성화시키는 것으로 생각된다. PRL과 IL-2 receptor는 Jak/Stat signal을 경유한 cytokine receptor군으로서 IL-2는 splenocyte에 있어 FasL의 발현을 유도하며, T-cell은 PRL receptor에 대해 2개의 이성질체를 가진다고 보고되어 있다(Suda 등, 1993). PRL은 그러한 receptor와 작용하여 FasL 발현경로를 활성화시키며(Touraine 등, 1994), 난소황체의 steroidogenic 세포는 발정주기를 통해 MHC I, II를 발현하는데, 그들은 표적세포로서 T-cell이 steroidogenic 세포를 쉽게 인식하는 데 큰 기여를 하는 것으로 보고되어지고 있다(Fairchild와 Pate, 1989). PRL유도에 의한 황체퇴행은 steroidogenic 세포에서 일어나며 그와 같은 현상은 Fas/FasL 메카니즘을 통하여 PRL과 ConA의 유사성은 황체조직에서 T-cell은 PRL에 반응하여 FasL을 발현하며, 세포와 세포간의 접촉을 통해 Fas를 발현하는 steroidogenic 세포와 작용하여 황체퇴행을 일으키는 것으로 사료된다.

적 요

정상적인 발정주기를 나타내는 rat에 있어 발정 전기 상태의 오후에 나타나는 PRL surge는 황체퇴행의 유도인자로 보고된 바 있다. PRL은 황체퇴행의 특이한 기능인 세포에 대한 생리적 기능으로서 세포 소멸이 아닌 세포 재생인자로 볼 수 있기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 황체 퇴행에 작용하는 PRL의 기능을 알아보기 위하여 rat의 황체조직으로부터 세포를 분리하여 배양하였다. 그리고 PRL에 의해 유도된 황체퇴행의 잠재적인 molecular/cellular의 메카니즘을 조사하였다. 황체는 PRL surge를 억제시키기 위하여 dopamine agonist인 CB154를 투여한 후 다음 배란이 일어나기 전 발정 전기 당일 오후 6시에 rat 난소로부터 외과적인 방법에 의하여 적출하였다. 분리해 낸 황체는 24시간 혹은 48시간 동안 PRL (2 μ g/ml)을 첨가 또는 무첨가하에서 배양하였다. PRL의 첨가군은 세포생존

를(MTT) 감소와 염색체가 수축되었다. PRL에 의해 degradation된 대부분의 DNA는 steroidogenic 세포에서 일어났음이 3β -HSD activity 염색방법으로 확인되었고, 3β -HSD 양성 세포수가 상당히 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 세포소멸성 핵을 가진 대부분의 세포들이 비steroidogenic 세포에 하나 혹은 그 이상으로 부착되어 있었고, Fas는 세포소멸에 있어 생리적으로 중요한 역할을 하는 것으로서, rat의 경우 난소에서 Fas가 특히 많이 발현되는 것으로 나타났다. PRL의 첨가는 mFasL의 발현을 증가시켰으며, T-cell 특이활성물질인 ConA를 첨가하면 황체퇴행 기능이 증가되는 것으로 나타났다. 황체퇴행에 대한 PRL의 작용은 steroidogenic 황체세포보다 다른 세포에서 기능이 증가되어 PRL의 반응에 의하여 mFasL이 발현하는 것은 황체조직의 T-cell에 의한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bowen JM, Keyes PL, Warren JS and Townson DH. 1996. Prolactin induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol. Reprod.*, 54: 1120-1127.
- Endo T, Aten RF, Wang F and Behrman HR. 1993. Coordinate induction and activation of metalloproteinase and ascorbate depletion in structural luteolysis. *Endocrinology*, 133: 690-698.
- Fairchild DL and Pate JL. 1989. Interferon- γ induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells. *Biol. Reprod.*, 40:453-457.
- Guo MW, Mori E, Xu JP and Mori T. 1994. Identification of Fas antigen associated with apoptotic cell death in murine ovary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203:1438-1446.
- Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y and Nakane PK. 1996. Fas/APO-I/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology*, 137:1938-1948.
- Kanuka H, Matsuyama S, Ohnishi M, Matsumoto S, Nishihara M and Takahashi M. 1997. Prolactin expresses differential effects on apoptotic cell death of luteal cells *in vivo* and *in vitro*. *Endocrine J.*, 44:11-22.
- Malven PV and Sawyer CH. 1966. A luteolytic action of prolactin in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 79:268-274.
- Malven PV. 1969. Hypophysial regulation of luteolysis in the rat. In: Mackerns KW (ed) *Hypophysial Regulation of Luteolysis*. Meredith, New York, pp.367-382.
- Matsuyama S and Takahashi M. 1995. Immuno-reactive(ir)-transforming growth factor (TGF)- β in rat corpus luteum: ir-TGF β is expressed by luteal macrophages in the rat. *Endocrine J.*, 42:203-217.
- Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohnishi M, Ikeda A, Nishihara M and Takahashi M. 1996. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol. Reprod.*, 54:1245-1251.
- Matsuyama S, Shiota K and Takahashi M. 1990. Possible role of transforming growth factor-beta as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell cultures. *Endocrinology*, 127:1561-1567.
- Murakami N, Takahashi M and Suzuki Y. 1978. Conditions for establishment of reflex ovulation in light estrous rats. *Endocrinol. Jpn.*, 25:299-303.
- Myoumoto A, Manabe N, Imai Y, Kimura Y, Sugimoto M, Okamura Y, Fukumoto M, Sakamaki K, Niwano Y and Miyamoto H. 1997. Monoclonal antibodies against pig ovarian follicular granulosa cells induce apoptotic cell death in cultured granulosa

- cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 59:641-649.
- Nagata S and Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267:1449-1456.
- Naito K, Takahashi M and Homma K. 1986. *In vitro* secretion of progestins by rat luteal cells and their 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Endocrinol. Jpn.*, 33: 43-50.
- Nequin LG, Alvarez J and Schwartz NB. 1979. Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biol. Reprod.*, 20:659-670.
- Pate JL. 1995. Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 49:365-377.
- Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG and Henrikson KP. 1995. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol. Reprod.*, 52:279-287.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y and Jacobson MD. 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science*, 262:695-700.
- Raff MC. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 356:397-400.
- Sakamaki K and Yonehara S. 1996. The Fas system in mammalian reproductive organs. *J. Reprod. Dev.*, 42:119-126.
- Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S, Manabe N and Yonehara S. 1997. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol. Reprod. Develop.*, 47:11-18.
- Sanchez-Criado JE, Ochiai K and Rothchild L. 1987. Indomethacin treatment prevents prolactin-induced luteolysis in the rat. *J. Endocrinol.*, 112:317-322.
- Sandi C, Cambronero JC, Borrell J and Guaza C. 1992. Mutually antagonistic effects of corticosterone and prolactin on rat lymphocyte proliferation. *Neuroendocrinology*, 56:574-581.
- Shiu RP, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Beer CT and Noble RI. 1983. Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology*, 113:159-165.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P and Nagata S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75:1169-1178.
- Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K and Nagata S. 1995. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol.*, 154:3806-3813.
- Takahashi M, Shiota K and Suzuki Y. 1978. Preprogramming mechanism of luteinizing hormone in the determination of the life span of the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 102:494-498.
- Tanaka M, Suda T, Takahashi T and Nagata S. 1995. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *Embo. J.*, 14:1129-1135.
- Tilly JL. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod.*, 1:162-172.
- Touraine P, Leite de, Moraes Mc, Dardenne M and Kelly PA. 1994. Expression of short and long forms of prolactin receptor in murine lymphoid tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 104:183-190.
- Wang F, Riley JC and Behrman HR. 1993. Immunosuppressive levels of glucocorticoid block extrauterine luteolysis in the rat. *Biol. Reprod.*, 49:66-73.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, and Nagata S. 1992. The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol.*, 148:1274-

1279.

Wuttke W and Meites J. 1971. Luteolytic role of prolactin during the estrous cycle of the rat.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137:988-991.

(접수일자 : 1998. 4. 15 / 채택일자 : 1998. 7. 10)