

생쥐 Preantral Follicles의 체외성장 및 성숙에 있어서 Gonadotrophins의 역할

김동훈^{1,4} · 지희준³ · 강희규¹ · 한성원¹ · 이훈택⁴ · 정길생⁴ · 이호준^{1,2}

울지병원 의과학연구소¹

Effects of Gonadotrophins on *In Vitro* Growth and Maturation of Mouse Preantral Follicles

Kim, D. H.^{1,4} H. J. Chi³, H. G. Kang¹, S. W. Han¹, H. T. Lee⁴, K. S. Chung⁴, and H. J. Lee^{1,2}

Medical Science Institute, Eulji Medical Center¹

SUMMARY

The present study was designed to investigate the effects of gonadotrophins on *in vitro* growth and maturation in mouse preantral follicles. Ovaries were removed from 12-day-old ICR mice. Follicles were dissociated enzymatically in Leibovitz L-15 medium containing 1 mg/ml collagenase and 0.2 mg/ml DNase I. The follicles were cultured on Transwell-COL membrane inserts in six well cluster dishes for 10 days. The culture medium was α MEM medium supplemented with 5% fetal bovine serum and FSH or HMG. After 10 days of growth *in vitro*, follicles were allowed to mature for 18~20 hr in medium supplemented with 1.5 IU/ml hCG. The oocytes were then denuded of their cumulus cells and assessed maturation status. Concentrations of oestradiol and progesterone were measured with a radioimmunoassay. Oocyte diameter was determined with an ocular micrometer. The survival and Metaphase II rates of oocytes were significantly higher in FSH treatment groups than in control group ($P < 0.001$), but there were no differences among the groups of treated FSH concentration. The survival and Metaphase II rates of oocytes in HMG treatment group (60.9 and 40.6%) were higher than in FSH treatment group (76.6 and 48.2%) and control group (49.2 and 7.1%). The survival and Metaphase II rates of oocytes on both FSH and LH treatment groups were no differences among the ratios of FSH and LH. Diameter of oocyte was no differences among the treatment groups, but smaller than compared to *in vivo* grown oocyte. Through the entire culture period, secretions of oestradiol and progesterone were significantly less in control group than in HMG and FSH treatment groups. These results suggest that gonadotrophins play a key role in *in vitro* culture of mouse preantral follicles. Especially, addition of FSH and LH should be more effective than FSH alone.

(Key words : Preantral follicle, *In vitro* growth, FSH, LH, HMG.)

² 울지외과대학 생리학교실 (Department of Physiology, Eulji Medical College)

³ 한나여성의원 불임연구소 (Infertility Lab. of Hanna Women's Clinic)

⁴ 건국대학교 축산학과 (Department of Animal Science, Konkuk University)

I. 서 론

포유동물의 난소 내에는 수많은 초기단계의 난포 (primordial, primary follicle)가 존재하고 있으나, 이러한 난포의 대부분은 성장(growth) 및 성숙(maturation)과정에서 퇴행을 수행하게 된다. 사실, 매우 적은 수의 선별된 난포 만이 Graafian 난포까지 발달하여 배란을 하게 되며, 수정이 이루어져서 개체로 발달하게 된다. 따라서, 많은 수의 초기단계 난포는 의료적, 동물학적으로 이용 가능한 난자를 다량으로 획득할 수 있는 잠재적으로 가치있는 제공원이 될 수 있다.

Ovarian follicle의 배양에 관한 연구는 과거에는 주로 preantral follicle의 발달과 preantral follicle에서 분리된 oocyte-granulosa cell complex의 발달을 위한 배양조건에 대해서 수행되어져 왔다. 그러나 이러한 연구의 대부분은 oocyte의 발달보다는, 주로 follicular somatic cells의 발달과 기능에 초점을 맞추었을 뿐, follicle oocyte의 성장, 성숙 및 배발달 능력에는 관심을 보이지 않았다. 하지만, 이러한 연구결과에서 preantral follicle이 체외배양 되었을 때 난포강이 형성됨을 보여주었고, 체외배양된 난포강내 oocyte 또한 발달능력이 있음을 입증하였다 (Spear 등, 1994). Preantral follicle에서 분리된 oocyte-granulosa cell complex를 이용한 연구는 oocyte의 발달에 특별히 초점을 맞추었으며, 이 배양체계에서 oocyte는 성장, 성숙뿐만 아니라 수정 및 배발달을 수행하는 것이 입증되었다 (Eppig 등, 1989, 1992). 한편 primordial follicle의 배양 및 발달에 관한 연구에 대해서는 organ culture 및 *in vitro* culture를 병행했을 때, 정상적인 발달이 이루어진다는 보고가 있다 (Eppig와 O'Brien, 1996). 그렇지만, 지금까지의 연구보고를 종합해 볼 때 초기단계 난포의 완전한 체외성장 및 성숙을 위한 배양조건이 완전하지 못하여, 낮은 생존율과 성숙율을 나타내고 있다.

한편 gonadotrophins은 체내에서 난소 내 난포의 성장 및 성숙에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며, follicle의 체외배양에 있어서도 FSH가 follicle의 생존율을 향상시키며, 체외성장 및 난포강 형성을 촉진시키며, estrogen의 분비량을 증가시키고, cumulus cells의 expansion을 증진시킨다

고 보고되고 있다 (Eppig와 Schroeder, 1989; Nayudu와 Osborn, 1992; Boland 등, 1993; Cortvrindt 등, 1997). 이에 본 연구는 생쥐 preantral follicles의 체외성장 및 성숙시, gonadotrophins인 FSH와 LH의 첨가가 follicle내 난자의 생존 및 성숙에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. Preantral follicles의 분리

생후 12일령의 생쥐 (ICR)로 부터 난소를 회수한 후 (Fig. 1), 효소처리방법을 이용하여 preantral follicles을 분리하였다. 간단히 방법을 설명하면, 회수된 난소를 1 mg/ml collagenase (C-2674, Sigma)와 0.2 mg/ml DNase I (DN-25, Sigma)이 함유된 Leibovitz L-15배양액 (Gibco)에 침적하여, 20여분간 실온에 방치한 후, 반복적인 pipetting을 실시하여 난소조직으로부터 분리된 preantral follicles을 회수하였다. 회수된 follicle은 Leibovitz L-15배양액에서 3회 washing을 실시하였으며, oocyte가 2~3층의 granulosa cells로 둘러싸여 있고, 상태가 양호하며, follicle의 중앙에 위치한 preantral follicle만을 선별하여 본 실험에 이용하였다 (Fig. 2).

2. Preantral follicles의 체외성장 및 성숙

Preantral follicles은 transwell-COL membrane insert (24mm diameter, 3.0 μ m pore size; Cos-

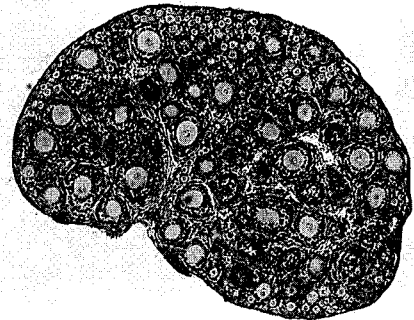


Fig. 1. Histological section of the ovary from an 12-day-old mouse.

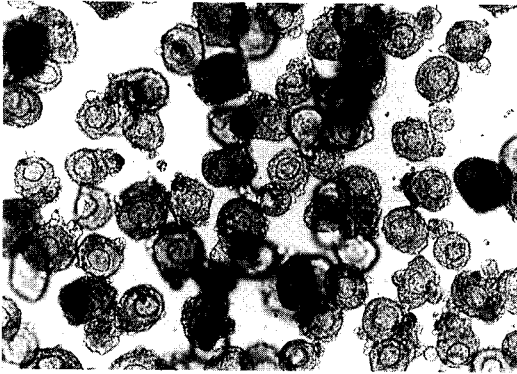


Fig. 2. Preantral follicles isolated from the ovaries of 2-day-old mouse.

tar)가 삽입된 6-well cluster dish에서 체외배양을 실시하였다. 체외성장을 위한 배양액은 α MEM (Gibco)에 5% FBS (C'bc)와 FSH (Metrodin-HP, Sereno) 혹은 HMG (Humegon, Organon)를 첨가하여 이용하였으며, 매 2일마다 배양액의 절반을 교체하였다. 10일간의 체외성장 후, 체외성장 배양액에 1.5 IU/ml hCG (Profasi, Sereno)가 첨가된 체외성숙 배양액에서 18~20시간 배양을 실시하여 난자의 체외성숙을 유도하였다.

3. 난자직경의 측정

체외성숙배양액에 18~20시간 배양하여 체외성숙이 유도된 난자를 0.1% hyaluronidase가 함유된 Leibovitz L-15배양액에서 처리하여 난자를 둘러싸고 있는 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 완전히 제거된 난자중 제 1극체가 방출된 metaphase II 단계의 성숙 난자만을 선별하여 inverted현미경에 부착된 ocular micrometer를 이용하여 투명대를 제외한 난자의 직경을 측정하였다.

4. Steroidogenesis의 분석

체외배양시 follicle에서 분비되는 oestradiol과 progesterone의 농도를 측정하기 위하여, 체외배양 과정중 매 2일마다 절반씩 교체되는 배양액을 -80°C 에서 분석 전까지 냉동보관하였다. Oestradiol과 progesterone 농도의 측정은 radioimmunoassay (RI-

A)를 이용하여 측정하였다.

5. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계처리는 χ^2 검정을 실시하여, $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 대조군과 처리군 간의 통계학적 차이로 인정하였다.

III. 결 과

1. FSH 첨가농도에 따른 preantral follicles의 체외성장 및 성숙

생쥐 preantral follicle의 체외배양시 적절한 FSH의 농도를 조사하기 위하여, 체외성장배양액에 50, 100, 250, 500, 1000 mIU/ml의 농도로 첨가하여 체외성장 및 성숙을 유도한 결과는 Table 1에서 제시한 바와 같다. 대조군은 FSH첨가군들에 비하여 유의하게 낮은 생존율과 성숙율을 나타냈으나, FSH첨가군들 간에는 50 mIU/ml에서 낮은 결과를 나타냈을 뿐, 100 mIU/ml 이상의 농도에서 follicle의 생존율 및 성숙율에 큰 차이를 나타내지 않았다. 체외성장 및 성숙된 oocyte의 직경은 대조군과 FSH첨가군들 간에 유의한 차이가 없었으며, 또한 FSH첨가군들을 비교하였을 때도 큰 차이가 없었다 (Fig. 3). 이 실험의 결과 preantral follicle의 체외성장 및 성숙에 있어서 FSH가 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었으며, 100 mIU/ml의 농도가 preantral follicle의 체외배양에 적절한 농도인 것으로 생각된다.

2. FSH와 HMG 첨가에 따른 preantral follicles의 체외성장 및 성숙

생쥐 preantral follicles 체외배양시, FSH와 LH가 동량으로 함유된 HMG의 효과를 알아보고자, FSH와 비교하여 체외성장 및 성숙을 유도한 결과는 Table 2에서 제시한 바와 같다. 생존율 및 성숙율에 있어서, FSH첨가군(60.9 and 40.6%)과 HMG첨가군(76.6 and 48.2%)이 대조군(49.2 and 7.1%)에 비하여 유의하게 높은 결과를 나타냈다. FSH첨가군과 HMG첨가군을 비교했을 때, 생존율에 있어서는 HMG첨가군이 유의하게 높은 결과를 나타냈으며, 성숙율에 있어서는 HMG첨가군이 FSH첨가군에 비하여 다소 높은 결과를 나타냈지만, 통계적으로 유의한 차이

Table 1. Effects of FSH concentration on *in vitro* growth and maturation of mouse preantral follicles

| Concentration (mIU/ml) | No. of follicles cultured | No. (%) of oocytes survived | GV(%)* | GVBD(%)** | Meta II (%)*** |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------|-----------|-----------------------|
| 0 | 188 | 84(44.7) ^a | 76(40.4) | 4(2.1) | 4(2.1) ^a |
| 50 | 178 | 120(67.4) | 38(21.3) | 24(20.0) | 58(32.6) ^b |
| 100 | 188 | 149(79.3) ^b | 32(17.0) | 28(14.9) | 89(47.3) ^b |
| 250 | 178 | 137(77.0) ^b | 31(17.4) | 26(14.6) | 80(44.9) ^b |
| 500 | 150 | 104(69.3) | 21(14.0) | 29(19.3) | 54(36.0) ^b |
| 1,000 | 150 | 110(73.3) ^b | 17(11.3) | 31(21.0) | 62(41.3) ^b |

a,b : P<0.001

* Germinal vesicle (GV)

** Germinal vesicle break-down (GVBD)

*** Metaphase II (Meta II)

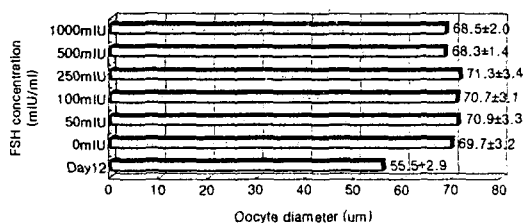


Fig. 3. Diameter of *in vitro* grown oocytes cultured in the various concentrations of FSH.

를 나타내지는 않았다. 체외성장 및 성숙된 난자의 직경은 대조군($68.5 \pm 1.7 \mu\text{m}$), FSH첨가군($69.1 \pm$

$1.6 \mu\text{m}$) 그리고 HMG첨가군($68.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$) 간에 큰 차이가 나타나지 않았다. 그렇지만 체외성장 및 성숙된 난자의 직경은 체내에서 성장한 난자에 비해서는

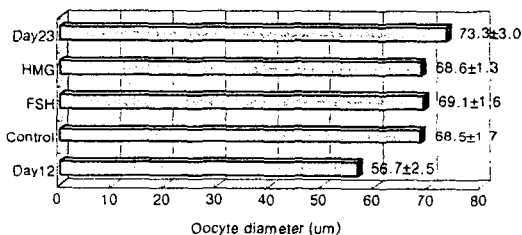


Fig. 4. Diameter of *in vitro* grown oocytes cultured in medium containing FSH and HMG.

Table 2. Effects of FSH and HMG on *in vitro* growth and maturation of mouse preantral follicles

| Treatment | No. of follicles cultured | No. (%) of oocytes survived | GV(%) | GVBD(%) | Meta II (%) |
|-------------------|---------------------------|-----------------------------|----------|----------|-----------------------|
| Control | 197 | 97(49.2) ^a | 79(40.1) | 4(2.0) | 14(7.1) ^a |
| FSH* | 197 | 120(60.9) ^c | 25(12.6) | 25(12.6) | 80(40.6) ^b |
| HMG* | 197 | 151(76.6) ^{b,d} | 38(19.2) | 18(9.1) | 95(48.2) ^b |
| <i>In vivo</i> ** | 105 | 105(100) ^{b,d} | 18(17.1) | 13(12.4) | 74(70.5) ^b |

a,b : P<0.001, c,d : P<0.05

* Concentration of FSH and HMG : 100 mIU /ml, respectively.

** Oocytes collected from the ovaries of 22-day-old mice and matured in medium containing 1.5 IU /ml hCG for 18~20 hr.

유의하게 작은 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이 실험의 결과 preantral follicle의 체외 성장 및 성숙에 있어서 FSH와 LH가 중요한 역할을 수행하지만, FSH와 LH의 단독작용보다는 공동작용이 보다 효과적임을 알 수 있었다.

3. FSH와 LH첨가 비율에 따른 preantral follicle의 체외성장 및 성숙

앞의 실험에서 FSH와 LH가 동량으로 함유된 HMG가 preantral follicle의 체외배양에 있어서 가장 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 보다 더 세밀하게 가장 효과적인 FSH에 대한 LH의 비율을 조사하였으며, 그 결과는 Table 3에서 제시한 바와 같다. 생존율 및 성숙율에 있어서, FSH와 LH첨가군들 간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지는 않았지만, FSH 100 + LH 10군 (74.1 and 53.7%)이 FSH 100 + LH 50군 (72.8 and 52.4%)과 FSH 100 + LH 100군 (69.4 and 46.9%)보다 다소 높은 결과를 나타냈다. 그리고 난자의 직경을 측정한 결과는 각 실험군들 간에 거의 유사한 크기를 나타냈다 (Fig. 5). 이 실험의 결과 preantral follicle의 체외배양에 있어서, 적절한 비율의 FSH와 LH의 첨가가 요구됨을 알 수 있었으며, 또한 FSH 100 mIU/ml과 LH 10 mIU/ml의 농도가 가장 적합한 비율임을 알 수 있었다.

4. Steroidogenesis의 비교 분석

생쥐 preantral follicle의 체외배양시 gonadotrophins 첨가에 따른 steroidogenesis를 분석하기 위하여, 배양시 매 2일마다 배양액을 회수하여 oestradiol과 progesterone의 농도를 측정하였다. Oestradiol의 측정결과는 Fig. 6에서 제시한 바와 같이, 대조군에

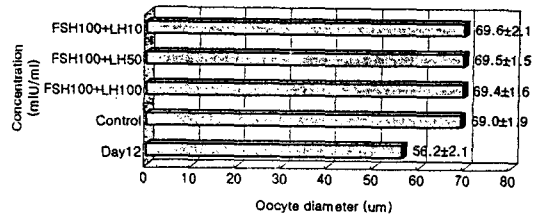


Fig. 5. Diameter of *in vitro* grown oocytes cultured in medium containing FSH and LH.

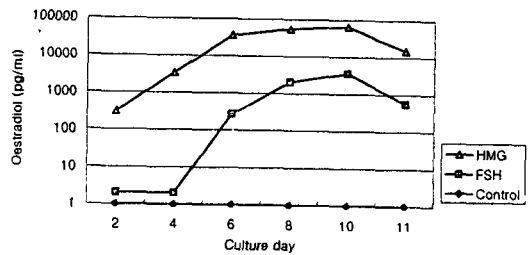


Fig. 6. Oestradiol concentration of conditioned medium collected from growing follicles.

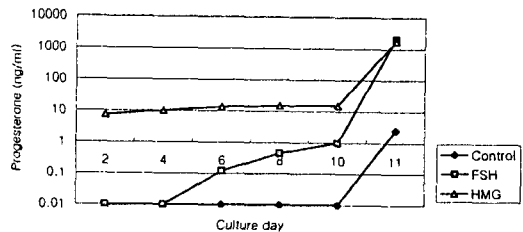


Fig. 7. Progesterone concentration of conditioned medium collected from growing follicles.

Table 3. Effects of FSH and LH on *in vitro* growth and maturation of mouse preantral follicles

| Treatment (mIU/ml) | No. of follicles cultured | No. (%) of oocytes survived | GV(%) | GVBD(%) | Meta II (%) |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------|----------|---------|-----------------------|
| Control | 147 | 72(49.0) ^a | 56(38.1) | 5(3.4) | 11(7.5) ^c |
| FSH 100 + LH 10 | 147 | 109(74.1) ^b | 20(13.6) | 10(6.8) | 79(53.7) ^d |
| FSH 100 + LH 50 | 147 | 107(72.8) ^b | 24(16.3) | 6(4.1) | 77(52.4) ^d |
| FSH 100 + LH 100 | 147 | 102(69.4) ^b | 29(19.7) | 4(2.7) | 69(46.9) ^d |

^{a,b} : P < 0.05, ^{c,d} : P < 0.001

서는 배양기간 동안 측정이 불가능한 정도의 양을 분비하였다. FSH첨가군과 HMG첨가군에서는 배양기간이 경과함에 따라 급격히 oestradiol의 농도가 증가하였으며, 체외성숙을 유도하기 위하여 hCG를 첨가했을 때 농도가 급격히 감소하였다. 그렇지만 전체적인 oestradiol의 분비농도는 HMG첨가군이 FSH첨가군보다 유의하게 높게 나타났다. 한편, progesterone의 측정결과는 Fig. 7에서 제시한 바와 같이, 대조군에서는 배양기간 동안 아주 적은 양을 분비하다가 체외성숙을 위하여 hCG를 첨가했을 때 농도가 증가하였다. FSH첨가군과 HMG첨가군에는 배양기간이 경과하면서 점진적으로 progesterone의 농도가 증가하였으며, hCG를 첨가했을 때 농도가 급격히 증가하였다. 전체적인 progesterone의 분비농도는 oestradiol과 마찬가지로 HMG첨가군이 유의하게 높게 나타났다. 이상의 결과에 나타난 FSH와 HMG첨가군에서의 oestradiol과 progesterone의 분비양상은 체내에서 난포의 성장과정에서 일어나는 분비양상과 동일하며, preantral follicle의 체외배양시 gonadotrophins를 첨가했을 때 정상적인 steroidogenesis가 일어난다는 것을 확인할 수 있었다.

IV. 고 찰

생리적 농도의 gonadotrophins은 난포 내에 존재하는 난자의 생존을 위하여 중요한 역할을 수행한다 (Hsueh 등, 1994). 따라서, 본 연구는 난소내 많은 수로 존재하는 preantral follicle의 체외성장 및 성숙을 위한 체외배양체계에서 gonadotrophins인 FSH와 LH의 효과를 조사하기 위하여 실시하였다. 본 실험에서 12일령의 생쥐의 난소에서 분리한 preantral follicle을 이용하였는데, 이 시기에 난소내 존재하는 follicle의 대부분은 1~3층의 granulosa cells로 구성되어 있으며, follicle내 난자는 mid-growth phase로서 자발적인 성숙을 수행할 수 있는 능력이 없는 것으로 알려져 있다 (Eppig와 Down, 1987). 또한, 본 실험과정에서도 확인할 수 있었다.

FSH는 granulosa cells의 성숙에 primary inducer로서의 역할을 수행한다. Estradiol과 함께, FSH는 granulosa cells의 증식을 자극하고, aromatase-enzyme activity를 증진시키며, LH receptor

의 발현을 증가시키는 것으로 보고되고 있다 (Carson와 Smith, 1986; Xu 등, 1995). Preantral follicle 체외배양시, FSH는 follicle의 성장 및 난포강의 형성을 촉진시키며 (Hartshorne 등, 1994), 난자의 GVBD와 1st polar body의 돌출을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Eppig와 Schroeder, 1989). 또한 follicle의 estrogen과 lactate의 생산을 유의하게 증가시킨다고 보고되고 있다 (Nayudu와 Osborn, 1992; Boland 등, 1993). Preantral follicle 체외배양에 있어서 FSH의 효과와 적정농도를 조사한 결과, FSH의 첨가가 preantral follicle의 생존율을 유의하게 향상시켰으며, metaphase II 까지의 성숙율도 유의하게 향상시켰다. FSH를 첨가하였을 경우에는 난자를 둘러싸고 있는 granulosa cells이 난자와 3차원적인 구조를 이루면서 증식을 하게 되므로서 많은 수의 follicle이 생존성을 유지할 수 있었지만, FSH를 첨가하지 않았을 경우에는 granulosa cell의 증식이 원만치 않고, 난자와 granulosa cells간의 3차원적 구조가 유지되지 못하여, 난자가 granulosa cell 밖으로 돌출하게 되어 성장을 하지 못하고 퇴행을 하게 되는 것을 관찰할 수가 있었다. 따라서 FSH는 preantral follicle의 체외성장 및 성숙에 있어서 중요한 역할을 수행하며, 특히 granulosa cells의 생존성과 증식에 중요한 기능을 수행한다는 것을 알 수 있었다. 그리고 실험 결과에 의하면 preantral follicle의 체외배양시 100 mIU/ml의 농도가 가장 적절한 농도인 것으로 생각된다.

LH는 초기단계의 난포성장시 theca cell에 의한 androgen의 생산에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다 (Richards 등, 1987). 최근 면역조직화학적 연구는 LH receptor가 난포발달 동안에 cumulus cell에서 발현되는 것을 확인하였고, 따라서 LH가 난자의 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Bukovsky 등, 1993). LH를 다양한 농도로 follicle 체외배양시 첨가했을 때 LH의 농도가 granulosa cell의 발달에 중요하며 (Yong 등, 1992), 난포강 형성 및 estradiol의 생산에 관여하며 (Qvist 등, 1990), glucose uptake를 유의하게 증가시키며 (Boland 등, 1994), 난포내 난자의 생존율과 성숙율을 향상시키는 것으로 보고되고 있다 (Cortvrindt 등, 1998). 그리고 rat에서 적절한 LH:FSH 비율은 난자의 생산에 영향

을 미치는 것으로 알려져 있다 (Armstrong 등, 1989). 본 실험에서 follicle의 체외배양시, FSH와 LH를 같이 첨가했을 때, FSH를 단독으로 첨가했을 때 보다 높은 생존율과 성숙율을 나타냈으며, 또한 FSH와 LH의 비율이 100 mIU/ml 대 10 mIU/ml (10:1)일 때 가장 양호한 결과를 나타냈다. 따라서 본 실험의 결과 LH는 follicle의 생존에 있어서 중요한 역할을 하며, 그리고 난자의 완전한 핵성숙을 이루는 mechanism을 조절하는데 하나의 역할을 수행하는 것으로 생각되어진다.

각각의 체외배양 조건에서 steroidogenesis를 분석하기 위하여 oestradiol과 progesterone의 농도를 측정된 결과, gonadotrophins을 첨가하지 않았을 때는 분비된 oestradiol과 progesterone농도가 검출할 수 없을 정도의 양이었으며, 또한 배양시간이 경과함에 따라서도 그 양의 증가를 나타내지 않았다, 이에 반하여 gonadotrophins을 첨가했을 때는 oestradiol의 분비는 배양시간이 경과함에 따라 유의하게 증가하였으며, 특히 배양 6일째 급격히 분비량이 증가하였다. 체외성숙을 유도하기 위하여 배양 10일째 hCG를 첨가했을 때는 그 농도가 유의하게 감소하는 양상을 나타냈다. 그리고 progesterone의 분비는 배양시간이 경과함에 따라 점진적으로 증가하다가, hCG를 첨가했을 때 급격히 증가하는 양상을 나타냈다. Hypogonadotrophic 환자와 동물에 대한 연구 결과에 의하면, 난포 내에서 정상적인 양의 oestradiol이 합성되기 위해서는 FSH와 LH가 병용되어야 한다고 보고하고 있다 (Balasch 등, 1995; Zelinski-Wooten 등, 1995). 또한 본 실험에서도 oestradiol과 progesterone의 전체적인 농도는 FSH와 LH공동첨가군이 FSH단독첨가군보다 높은 결과를 나타냈다. Steroidogenesis를 분석한 결과, gonadotrophins을 첨가하여 preantral follicle을 체외배양했을 때, 체내에서 난포의 성장 및 성숙과정에 보여주는 steroidogenesis 양상과 동일한 양상을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 또한 FSH와 LH공동첨가군이 FSH단독첨가군에 비하여 oestradiol과 progesterone의 전체적인 농도가 높게 나타난 결과는 앞의 실험에서의 preantral follicle의 생존율과 성숙율을 조사한 결과와 일치함을 알 수 있었다. 한편 최근에 난포성장 및 steroidogenesis에 관여하는 요소로서 gonadotrophins 외에 growth hormone,

activin, IGF-I 과 같은 것들이 보고되고 있으며, 특히 activin과 IGF-I은 FSH와 공동작용을 하여 난포의 성장을 촉진하고, steroidogenesis를 유의하게 증가시키는 것으로 보고되고 있다 (Li 등, 1995; Liu 등, 1998). 따라서 앞으로 난포성장의 기전을 밝힐 수 있는 난포의 성장 및 성숙에 관여하는 intraovarian factor에 관한 연구가 활발하게 이루어져야 한다고 생각된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 체외배양조건에서 생쥐 preantral follicle의 체외성장 및 성숙 그리고 정상적인 steroidogenesis가 일어남을 확인할 수 있었다, 또한, gonadotrophins이 preantral follicle의 체외배양에 중요한 역할을 수행하며, FSH단독보다는 FSH와 LH의 공동작용이 보다 효과적임을 확인할 수 있었다.

V. 적 요

본 연구는 생쥐 preantral follicle의 체외성장 및 성숙에 있어서 gonadotrophins인 FSH와 LH의 효과를 조사하기 위하여 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. FSH첨가군은 대조군에 비하여 유의하게 높은 생존율과 성숙율을 나타냈으며, 100mIU/ml의 FSH농도가 preantral follicle의 체외배양에 적절한 농도인 것으로 나타났다.
2. HMG첨가군은 FSH첨가군보다, 통계적 유의차는 인정되지 않았지만, 높은 생존율과 성숙율을 나타냈다.
3. FSH와 LH의 첨가비율이 100 mIU/ml 대 10 mIU/ml (10:1)에서 가장 높은 생존율과 성숙율을 나타냈다.
4. FSH 혹은 HMG첨가시, 정상적인 oestradiol과 progesterone 분비양상을 나타냈으며, HMG첨가군에서 유의하게 높은 농도의 oestradiol과 progesterone을 분비하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, gonadotrophins은 preantral follicle의 체외성장 및 성숙 뿐만 아니라 steroidogenesis에서 중요한 역할을 수행한다는 것을 확인할 수 있었다.

VI. 인용문헌

1. Armstrong, D.T., A. Siuda, M.A. Opavsky and Y. Chandrasekhar. 1989. Bimodal effects of luteinizing hormone and role of androgens in modifying superovulatory responses of rats to infusion with purified porcine follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, 40:54-62.
2. Balasch, J., F. Miro and I. Burzaco. 1995. The role of LH in human follicle development and oocyte fertility; evidence from IVF in a woman with long-standing hypogonadotropic hypogonadism and using rh-FSH. *Hum. Reprod.*, 10:1678-1683.
3. Boland, N.I., P.G. Humpherson, H.J. Leese and R. G. Gosden. 1993. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 48:798-806.
4. Boland, N.I., P.G. Humpherson, H.J. Leese and R.G. Gosden. 1994. The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis *in-vitro*. *Hum. Reprod.*, 9:617-623.
5. Bukovsky, A., T.T. Chen, J. Wilmalasena and M.R. Caudle. 1993. Cellular localization of luteinizing hormone receptor immunoreactivity in the ovaries of immature, gonadotrophin-primed and normal cycling rats. *Biol. Reprod.*, 48:1367-1382.
6. Carson, R. and J. Smith. 1986. Development and steroidogenic activity of preantral follicle in the neonatal rat ovary. *J. Endocrinol.*, 110:87-92.
7. Cortvrindt, R., J. Smitz and A.C. Van Steirteghem. 1997. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 12: 759-768.
8. Cortvrindt, R., Y. Hu and J. Smitz. 1998. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum. Reprod.*, 13:1292-1302.
9. Eppig, J.J. and S.M. Downs. 1987. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development *in vitro*: maintenance of meiotic arrest and gonadotrophin-induced oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 119:313-321.
10. Eppig, J.J. and A.C. Schroeder. 1989. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 41: 268-276.
11. Eppig, J.J., A.C. Schroeder and M.J. O'Brien. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J. Reprod. Fert.*, 95:119-127.
12. Eppig, J.J. and M.J. O'Brien. 1996. Development of *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.*, 54:197-207.
13. Hartshorne, G.M., I.L. Sargent and D.H. Barlow. 1994. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. *Hum. Reprod.*, 9:1003-1012.
14. Hsueh, A.J.W., H. Billig and A. Tsafiriri. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.*, 15:1-18.
15. Li, R., D.M. Phillips and J.P. Mather. 1995. Activin promotes ovarian follicle development *in vitro*. *Endocrinology*, 136:849-856.
16. Liu, X., K. Andoh, H. Yokota, J. Kobayas-

- hi, Y. Abe, K. Yamada, H. Mizunuma and Y. Ibuki . 1998. Effects of growth hormone, activin and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, 139:2342-2347.
17. Nayudu, P.L. and S.M. Osborn. 1992. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 95:349-362.
18. Qvist, R., L.F. Blackwell, H. Bourne and J. B Brown. 1990. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages *in-vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 89:169-180.
19. Richards, J.S., T. Jagensen, I. Hedin, J. Lifka, S. Ratoosh, J.M. Drica and N.B. Goldring. 1987. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Resent. Prog. Horm. Res.*, 43:231-270.
20. Spears, N., N.I. Boland, A.A. Murray and R. G. Gosden. 1994. Mouse oocytes derived from *in vitro* grown primary ovarian follicles are fertile. *Hum. Reprod.*, 9:527-532.
21. Xu, Z., A. Garverick, G.W. Smith, M.F. Smith, S. A. Hamilton and R. S. Youngquist. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicle during the first follicular wave. *Biol. Reprod.*, 53:951-957.
22. Yong, E.L., D.T. Baird, R. Yates, L.E. Jr. Reichert and S.G. Hillier. 1992. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74:842-849.
23. Zelinski-Wooten, M.B., J.S. Hutchison, D.L. Hess, D.P. Wolf and R.L. Stouffer. 1995. FSH alone supports follicle growth and oocyte development in GnRH antagonist-treated monkeys. *Hum. Reprod.*, 10:1685-1666.
- (접수일자 : 1999. 1. 25. /채택일자 : 1999. 2. 24.)