

한우 난소의 Follicular Fluid의 특징과 과립막 세포의 스테로이드호르몬 분비에 대한 Anti-Inhibin Serum의 첨가효과

성환후[†] · 민관식 · 양병철 · 노환국 · 최선호 · 임기순 · 장유민 · 박성재 · 장원경
축산기술연구소 유전공학과

Effects of Characteristics of Ovarian Follicular Fluid and Anti-Inhibin Serum on Steroid Hormone Secretion by Hanwoo Granulosa Cells *In Vitro*

Seong, H. H.[†], K. S. Min, B. C. Yang, W. G. Nho, S. H. Choi, G. S. Im, Y. M. Chang,
S. J. Park and W. K. Chang

Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of the peptide to carrier ratio on the immune and biological functions to inhibin immunization in Hanwoo. A peptide sequence from the alpha -subunit (19~32 peptide) of porcine inhibin was synthesized for antigen and conjugated to human serum albumin(HSA) for carrier protein. Anti-inhibin sera(AI) were produced 52 day later from rabbit after injection of inhibin- α -subunit peptide conjugator for antigen with the interval of 2 weeks.

Immuno-blotting analysis using antibody specific for inhibin- α subunits revealed that the inhibin was detected at 1.0 cm bovine follicular fluid(bFF). However, each stage of corpus lutea and 0.1 cm of follicular fluid were not detected. The maximal contents of estradiol-17 β in Hanwoo ovarian follicular fluid were detected at 2.0 cm of follicular size(diameter), but the mean total contents of these hormone decreased significantly with decreasing diameter of follicles. However, progesterone contents of follicular fluid were high at 1.0 cm of follicle.

Progesterone secretion by Hanwoo granulosa cell cultured for 48 hr *in vitro* was significantly ($p<0.05$) inhibited in 5% bFF and 5% bFF + 5% AI addition group compared with control group. Estradiol-17 β secretion by Hanwoo granulosa cell cultured for 48 hr *in vitro* was significantly ($p<0.05$) increased in 5% AI and 5% AI + 5% bFF addition group compared with control group. However, the groups added 5% AI were not changed compared to control groups in progesterone and estradiol-17 β .

Taken together, we suggested that inhibin in the mature FF plays a pivotal role on the biosynthesis of steroid hormone of follicular cells during follicular development.

(Key words: Inhibin- α subunit, Hanwoo granulosa, Estradiol-17 β , Progesterone, Anti-inhibin serum)

[†] Corresponding author : Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute.

I. 서 론

소의 난포발육에 관한 연구는 최근 초음파진단기를 이용하여 난포의 발달을 연속적으로 관찰할 수 있게 되어 난포발달에 관한 연구에 많은 진전이 있게 되었다. Adams(1994)의 보고에 의하면 발정 주기 중에 난포 발육이 2회 혹은 3회로 반복되어 난포 발달이 주기적으로 출현한다고 하였으며, 각 난포가 발달하는 과정에서 직경 수 mm 전후까지 발달하다가 그 중에서 단일 난포가 선발되어 직경 약 10 mm 전후까지 발달하는 우세 난포(dominant follicle)가 발생하게 되고, 그 외의 난포(subordinate follicle)는 변성하여 퇴행하게 되는 것으로 알려져 있다(OOE 등, 1997). 우세 난포의 존재는 인접한 난포의 발달을 억제하고 차기 난포의 발달시기를 결정하는데 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Turzillo 와 Fortune, 1990). 따라서 소에 있어서 발정 주기 중에 발생하는 황체의 퇴행에서 난포의 발달과 배란까지는 약 3~5일 정도 걸리게 되며, 황체기 중 난포파(follicular wave)는 2 wave 혹은 3 wave가 존재하게 된다.

FSH는 시상하부로부터 분비하는 성선자극호르몬 방출호르몬(GnRH)의 촉진작용과 더불어 성선에서 피드백작용에 의해 직접 혹은 간접적으로 조절되고 있으며, 난소로부터 피드백작용을 구성하는 것으로서 스테로이드호르몬과 Inhibin이 중요하게 작용한다(Quirk 과 Fortune, 1986). Inhibin은 성숙한 난포의 난포액과 뇌하수체에서 주로 분비하며 FSH를 특이하게 억제하고 인접한 난포의 발달을 억제하는 생리적 기능을 갖고 있다(Yamanouchi 등, 1995). 소와 말에 있어서도 난포에 존재하는 inhibin은 주로 우세난포의 과립막 세포에서 분비하는 것으로 알려져 있으며, activin과 함께 난포의 발달에 중요하게 작용하는 것으로 보고되었다(Henderson 등, 1984; Quirk과 Fortune, 1986; Yoshida 등, 1995). Miller와 Wu(1981) 그리고 McNeilly와 Fraser (1987)에 의하면 소와 면양의 난포기에 발육중인 성숙난포의 난포액을 주사하였을 때 황체퇴행으로부터 발정기의 간격을 연장하였으

며, 혈중 FSH농도를 감소시켰으나 혈중 LH농도는 변화가 없었다고 보고하였다. 이러한 결과는 난포액에 존재하는 Inhibin이 FSH를 억제시키고 난포의 발달을 억제하는 것으로 추측된다(Well 등, 1994; Taya 등, 1991).

본 연구는 난포 발육에 관여하는 FSH의 분비조절에 있어서 특이하게 억제하는 난포액의 기능과 난포액에서 존재하는 Inhibin 및 스테로이드호르몬의 역할에 관한 기초 자료를 얻은 목적으로, anti-inhibin serum을 생산하여 western blotting법으로 Inhibin을 검색하고 과립막 세포를 체외 배양하여 난포액 및 anti-inhibin serum이 스테로이드호르몬 분비에 어떤 영향이 있는지에 대해 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. Anti-inhibin serum 생산

Inhibin에 대한 항혈청을 생산하기 위해 사용된 antigen peptide는 porcine inhibin- α -subunit fragment 19~32(Asp-Ser-Glu-Gly-His-Arg-Thr-Ala-Pro-Tyr-Val-Met-Lys-Ile-Leu-Phe)를 합성하여 두당 총 2 mg(1회 두당 0.50 mg 주사)을 항원에 사용하였다. Carrier protein으로서 2 mg의 human- α -Globulin(HAG)을 0.5 ml의 용액(0.2 M sodium borate, 0.15 M NaCl, pH 8.3)에 용해시키고 동량의 Freund's complete adjuvant를 앙고라 종 토끼 5두(10 주령, 평균체중 2.07 kg)를 정소절제하여 0일, 14일, 28일, 42일째에 각각 피하주사로 항원을 접종하였다. 항혈청의 역가는 ELISA법으로 확인하였는데 사용된 항원은 inhibin α -subunit 19~32 10 μ g/ml을 사용하였으며 2차 항체로서는 anti-rabbit-IgG-POD(Cappel)을 500배 희석하여 사용하였다.

2. 한우 난포액(bovine Follicular Fluid; bFF)준비

도축장에서 도축되는 한우 암소로부터 난소를 회수하여 퇴행된 구황체가 존재하고 발달중인 난포가 다수 확인된 정상적인 난소만을 선별하여 난포직경이 3~5 mm, 10 mm, 15 mm 및 20 mm로 구분하여 난포크기별 12개부터 16개의 난소로부

터(총 62개의 난소) 난포액을 회수하여 12,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 스테로이드호르몬분석시까지 -20°C 에 저장하였다.

과립막세포의 체외배양실험에 첨가되는 난포액의 회수를 위해 10 mm 전후의 난포로부터 난포액을 회수하여 난포액에 존재하고 있는 스테로이드를 완전히 제거하기 위해 Charcoal solution (50 mg/ml, Norrit-A, Fisher Scientific, Fair Lawn, USA)을 난포액의 10%를 첨가하였고, 4°C 에서 45분간 배양하여 12,000 g에 30분간 원심 분리, 상층액을 $0.2 \mu\text{m}$ filter로 멸균 처리하여 체외배양에 사용하였다.

3. 과립막 세포의 체외배양

과립막 세포는 난소내 난포 직경이 10 mm 이내의 정상 난포로부터 회수된 과립막 세포를 공시하였으며, D-MEM(FCS 10%와 Antibiotics를 첨가)을 배양액으로 1×10^6 cell/ml로 조절하여 5% CO_2 와 38°C 로 조절된 CO_2 배양기(Vision, Model:VS-9108 MS)를 이용하여 48시간까지 체외 배양하였다. 이때 bFF 5%와 anti-inhibin serum 5%(배양액 1 ml당 $50 \mu\text{l}$ 첨가)를 대조구와 구분하여 각각 처리하였다.

4. 과립막 세포 및 황체조직의 세포질추출과 Western blot에 의한 Inhibin의 검색

난소로부터 난포 크기별 과립막 세포와 황체 일령을 구분한 후, 초원심 분리법으로 세포질을 추출하여 농도구배(5~20%) 전기영동법으로 단백질분리를 실시하여 western blot을 실시하였다. 이때 1차 황체는 100배, 2차 황체는 anti mouse IgG-HRP를 1,000배 희석하여 사용하였다.

5. 호르몬 분석 및 통계분석

배양액 및 난포액 중 progesterone과 estradiol-17 β 및 inhibin 농도의 분석은 RIA kit(DPC, USA)와 ELISA를 이용하여 정량분석을 실시하였으며, 통계분석은 Duncan의 다중 검정법으로 계산하였다.

III. 결과 및 고찰

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 항원을 토끼피하에

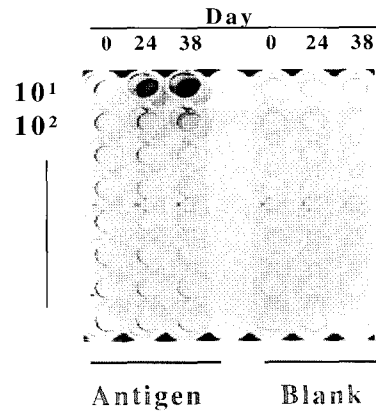


Fig. 1. Profiles of activities of anti-inhibin- α subunit after antigen injection by ELISA method.

접종하여 24일째부터 38일째에 토끼의 이정맥으로부터 채혈하여 얻어진 혈청으로 항원-항체반응을 시작하였다. 그 결과 10배 혹은 100배 희석구에서 항원항체반응이 24일째부터 확인되었으며, 38일째에는 높은 항원-항체반응을 확인하였다. 반면에, Blank구에서는 항원-항체반응이 확인되지 않았다.

난포 크기별 과립막 세포의 세포질과 luteal stage 별 분리된 황체의 세포질내에 존재하는 inhibin을

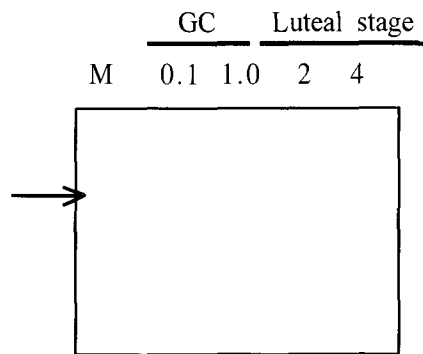


Fig. 2. Western blotting analysis for inhibin α subunit in each stage of granulosa cells (GC) of cytosol and ovarian luteal stage of cytosol. After gradient SDS-PAGE(5~20%) bands were transferred to nitrocellulose membrane and stained with inhibin- α subunit specific antibody.

검색하기 위해, 각 세포질을 SDS-PAGE로 분리하여 nitro cellulose membrane에 transfer하여 Western blotting법에 의해 검토한 결과, Fig. 2와 같이 직경 10 mm의 성숙난포의 과립막세포에 특이하게 존재하고 있음이 확인되었다. 이와 관련되는 자료로서 Ginther 등(1989)과 Taponen 등(1999)은 성숙난포에서 존재하는 inhibin은 뇌하수체의 FSH분비를 특이하게 억제함으로써 배란시까지 난포의 발달을 적절하게 조절하는 역할을 한다고 하였는데 본 실험결과에서는 적어도 성숙난포에서 확인된 inhibin은 난포의 발달에 관여하지만 황체의 기능에는 중요하게 작용하지 않는 것으로 사료된다. 또한, McNatty 등(1992)의 보고에 의하면 난포의 과립막세포에서 높은 inhibin이 존재하나 황체와 간질조직에서는 전혀 검출이 되지 않았다고 하였다. 따라서 한우 난소에서 inhibin은 황체세포보다 오히려 과립막세포에서 특이하게 합성되어 난포의 발달에 관여하는 것으로 사료된다.

난포 크기별 난포액을 추출하여 난포액 중에 존재하는 progesterone과 estradiol-17 β 를 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 난포 크기별 난포액 중 estradiol-17 β 농도는 직경 10 mm구에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과로 볼 때, 배란전 성숙 난포의 난포강에서는 estradiol-17 β 가 난포액에 다량 함유하고 있으며, progesterone은 상대적으로 낮은 수준이었다. 그러나 난포 크기가 15 mm인 경우에는

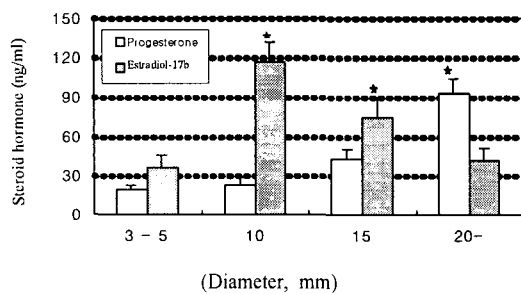


Fig. 3. Changes of progesterone and estradiol-17 β contents in Hanwoo ovarian follicular fluids relative to the size of follicles. *: P<0.05 compared with 3-5 mm group of same hormone.

progesterone이 다소 증가하다가 20 mm 이상인 경우에는 높은 농도의 progesterone과 낮은 농도의 estradiol-17 β 가 존재하고 있음이 확인되었다. 본 논문에서는 제시하지 않았으나 난포 크기별 조직학적으로 검토한 결과 직경 20 mm 이상의 난포조직은 10 mm의 난포에 비해 과립막세포가 극히 적고 세포배열이 불규칙한 것을 확인하였다. 따라서 한우난소의 난포는 적어도 직경 10 mm 이하의 경우에는 정상적으로 성장하고 있는 난포라고 사료되며, 직경 20 mm 이상인 난포는 배란을 자체적으로 할 수 없는 난포낭종의 성질이 있는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Adams(1994)와 O'Shea 등(1994)의 보고에서도 유사한 결과를 나타내고 있다.

한우 난소의 난포액(bFF)과 anti-inhibin serum (AI)이 난포의 과립막 세포의 progesterone 분비에 미치는 영향을 검토하기 위해 과립막 세포의 체외 배양실험을 실시하였다. 그 결과, Fig. 4에서 나타난 바와 같이 배양시간을 24시간과 48시간으로 구분하였을 때, 배양 24시간에서 과립막 세포의 progesterone 분비는 약 40 ng/1 \times 10⁶ cells/well/ml 전후로 나타났으며, bFF 5%, AI 5% 및 bFF+AI첨가구에 따라 유의적인 차이는 없었다. 반면에 48시간 배양구에서는 24시간에 비해 유의적으로 높게 분비되었으며, bFF 5%처리구와 bFF 5%+AI 5% 처

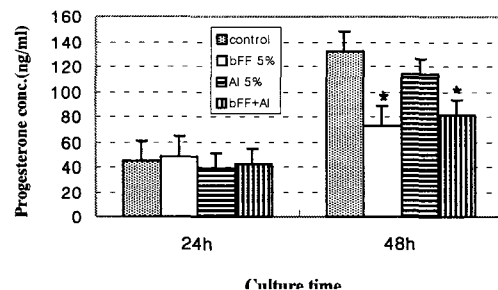


Fig. 4. Effect of bFF and anti-inhibin serum treatment on progesterone secretion *in vitro* ovarian granulosa cells culture. Granulosa cells (1 \times 10⁶ cells/ml/well) were co-cultured with or without 5% bFF and 5% AI addition for 24 and 48hr. *: P<0.05 compared with control of 48hr culture.

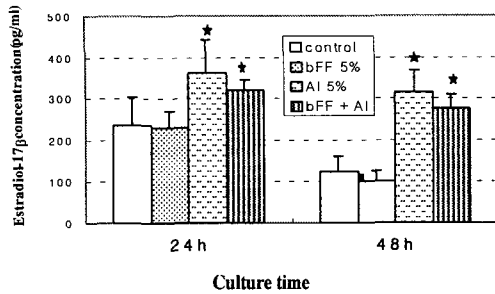


Fig. 5. Effect of bFF and anti-inhibin serum treatment on estradiol-17 β secretion *in vitro* ovarian granulosa cell culture. Granulosa cell (1×10^6 cells/ml/well) were co-cultured with or without 5% bFF and 5% AI addition for 24 and 48hr. *: $P < 0.05$ compared with control.

리구에서는 progesterone을 대조구보다 유의적으로 억제되었으나, AI 5% 단독 처리구에서는 대조구와 큰 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 미루어 과립막세포의 progesterone분비는 AI, 즉 inhibin에 의해 크게 영향을 받지 않으며, 난포액내의 inhibin 이외의 어떤 물질에 의해 특이하게 억제되고 있음을 시사하고 있다.

Fig. 5는 Fig. 4와 동일한 방법으로 배양하여 분석한 estradiol-17 β 농도를 나타내었다. 24시간 배양구에서 대조구에 비해 AI 5% 및 AI 5%+bFF 5% 처리구에서 유의적으로 높은 estradiol-17 β 분비를 나타내었으며, 48시간 배양구에서도 동일한 결과를 보였다. 이와 같이 과립막 세포의 estradiol-17 β 농도는 AI에 의해 특이하게 촉진되는 경향을 보였다. 이와 관련된 보고로 Taponen 등(1999)과 O'shea 등(1994)은 inhibin은 FSH만 특이하게 억제하여 난소의 estrogen 농도를 촉진하는 기능을 한다고 하여 anti-inhibin serum 처리에 의해 과배란유기 효과가 있는 것으로 사료된다(Ginther 등, 1989). 이상의 결과에서 외인성 AI는 내인성 Inhibin의 기능을 억제함으로써, FSH의 억제기구가 해제되어 FSH의 분비가 촉진되는 결과를 초래하여 Estradiol-17 β 농도가 증가하는 것으로 사료되며, 금후 *in vivo* 상태에서 bFF 및 Inhibin에 대한 항혈청을 처리하여 난포의 과배란유기에 대한 효과를 검토할

필요가 있는 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구는 한우 난포발달에 있어서 난포액 및 inhibin의 생리적 역할을 검토하기 위해 수행되었다.

Anti-inhibin serum(AI) 생산을 위해 사용된 항원은 porcine inhibin- α -subunit 19~32의 peptide를 사용하여 adjuvant 용액을 혼합, 앙고라종 토끼 5두(체중 2.5kg)에게 주 2회 간격으로 면역 실시 후 52일째의 토끼로부터 항혈청을 생산하였다. 과립막 세포의 체외배양을 위해 D-MEM(10% FCS와 antibiotics를 첨가)을 배양액으로 하여 1×10^6 cells/ml로 조절하였으며, 호르몬은 RIA 및 ELISA법으로 분석하였다. Western blotting법에 의해 과립막 세포 및 황체조직의 각 세포질을 SDS-PAGE로 분리하여 nitro cellulose membrane에 transfer하여 검토한 결과, 직경 1.0 cm의 성숙 난포의 granulosa cell의 세포질에서 특이하게 Inhibin이 존재하고 있음이 확인되었으나, 황체조직 및 성숙 난포에서는 검출되지 않았다.

난포 크기별 난포액의 progesterone 및 estradiol-17 β 을 농도를 분석한 결과, estradiol-17 β 농도는 난포 크기가 직경 2.0 cm부터 유의적으로 높았으나 난포 크기가 적을수록 감소되었다. 이에 반해, Progesterone 농도는 직경 2.0 cm 난포에서 가장 높았으며 난포 크기가 적을수록 낮았다.

과립막 세포의 48시간 체외배양에서 bFF 5% 처리구와 bFF 5%+AI 5% 처리구에서는 progesterone은 대조구보다 유의적으로 억제되었으나, AI 5% 단독 처리구에서는 대조구와 큰 차이가 없었다. 또한, estradiol-17 β 농도는 5% AI구와 5% AI+5% bFF 처리구에서는 대조구에 비해 증가하였다. 그러나, 5% bFF 단독처리구에서는 대조구와 큰 차이가 없었다.

이상의 결과로, 한우에 있어서 성숙난포에 존재하는 Inhibin은 AI처리에 의해 내인성 Inhibin의 기능이 약화되어 FSH분비를 조절하는 역할을 함으로써 난포발달 및 난포세포의 스테로이드호르몬합성에 중요하게 관여하고 있는 것으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Adams, G. P. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle : Implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, 41: 19-24.
2. Ginther, O. J., Knopf, L. and Kadtelic, J. P. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, 87: 223-230.
3. Henderson, K. M., Franchimont, P., Charlet-Renard, C. and McNatty, K. P. 1984. Effect of follicular atresia on inhibin production by bovine granulosa cells *in vitro* and inhibin concentrations in the follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 72: 1~8.
4. McNatty, K. P., Heath, D. A., Hudson, N. L., Ball, K. and Condell, L. 1992. Concentrations of immunoreactive inhibin in ovarian and peripheral venous plasma and follicular fluid of Booroola ewes that are homozygous carriers or non-carriers of the *Fec^B* gene. *J. Reprod. Fertil.*, 95: 489-502.
5. McNeilly, A. S. and Fraser, H. M. 1987. Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpora luteum function in the ewe. *J. Endocrin.*, 115: 273-282.
6. Miller, W. L. and Wu. J. 1981. Estrogen regulation of follicle-stimulating hormone production *in vitro*: species variation. *Endocrinology*, 108: 673-679.
7. OOE, M., Rajamahendran, R., Boediono, A. and Suzuki, T. 1997. Ultrasound guided follicle aspiration and IVF in dairy cows treated with FSH after removal of the estrous cycle. *J. Vet. Med. Sci.*, 59(5): 371-376.
8. O'Shea, T., Hillard, M. A., Anderson, S. T., Bindon, B. M., Findlay, J. K., Tsonis, C. G. and Wilkins, J. F. 1994. Inhibin immunization for increasing ovulation rate and superovulation. *Theriogenology*, 41: 3-17.
9. Quirk, S. M. and Fortune. J. E. 1986. Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 76: 609-621.
10. Taponen, J., Katila, T. and Rodriguez-Martinez, H. 1999. Induction of ovulation with gonadotropin-releasing hormone during proestrus in cattle: influence on subsequent follicular growth and luteal function. *Anim. Reprod. Sci.*, 55: 91-105.
11. Taya, K., Kaneko, H., Watanabe, G. and Sasamoto, S. 1991. Inhibin and secretion of FSH in oestrous cycles of cows and pigs. *J. Reprod. Fertil. Supplement* 43: 151-162.
12. Turzillo, A. M. and Fortune, J. E. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 89, 643-653.
13. Well, R., Gong, J. G. and Bramley, T. A. 1994. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development cattle. *Theriogenology*, 41: 25-30.
14. Yamanouchi, K., Yoshida, S., Hasegawa, T., Ikeda, A., Chang, K. T., Matsuyama, S., Nishihara, M., Miyazawa, K. and Takahashi, M. 1995. Molecular cloning fo DNA for inhibin alpha-subunit from equine ovary. *J. Vet. Med. Sci.*, Oct: 57(5): 905-9.
15. Yoshida S, Yamanouchi, K., Hasegawa, T., Ikeda, A., Suzuki, M., Chang, K. T., Matsuyama, S., Nishihara, M. and Takahashi, M. 1995. Molecular cloning of cDNA for equine ovarian inhibin/activin beta A subunit. *J. Vet. Med. Sci.*, Jun:57(3):469-73.

(접수일자: 2001. 3. 26. / 채택일자: 2001. 4. 16.)