

## 생쥐 난소내 Fas 및 Fas Ligand의 발현과 세포자연사

윤정미 · 윤현숙 · 양현원<sup>1</sup> · 김세광<sup>2</sup> · 조동제<sup>2</sup> · 윤용달<sup>†</sup>

한양대학교 생명과학과, <sup>1</sup>을지의과대학교 생명과학연구소, <sup>2</sup>연세대학교 산부인과학교실

### Apoptosis and Expression of Fas and Fas Ligand Genes in Mouse Ovary

Jeong-Mi Yoon, Hyunsook Yoon, Hyunwon Yang<sup>1</sup>, Seikwang Kim<sup>2</sup>,  
Dong Jae Cho<sup>2</sup> and Yong-Dal Yoon<sup>†</sup>

Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

<sup>1</sup>Life Science Institute, Eulji University School of Medicine, Seoul 139-711, Korea

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University School of Medicine, Seoul 120-752, Korea

**ABSTRACT** : The Fas antigen (Fas) as a cell-surface receptor protein which mediates apoptosis-inducing signals plays an important role in the immune system. Expression of Fas mRNA is detected not only in lymphoid organs but also in the nonlymphoid organs. In the ovary, most of the follicles is known to undergo atresia through apoptosis. However, the exact mechanism of atresia was not elucidated yet. Therefore, the purposes of the present study were to investigate the expression of Fas and Fas ligand in mouse ovary and to clarify the relationship between expression of Fas and Fas ligand and atresia of follicle. The result of RT-PCR demonstrated that Fas and Fas ligand mRNA was expressed in ovary, especially granulosa cells and oocytes. The immunohistochemistry showed that the granulosa cells and oocytes in growing follicles were stained for Fas and Fas ligand, but primordial follicles were not. Furthermore, Fas and Fas ligand were intensively stained in the atretic follicles. As results of TUNEL staining to detect apoptotic cells in the ovaries, the number of TUNEL-positive (apoptotic) granulosa cells and oocytes increased in the atretic follicles compared to the healthy normal follicles. These results demonstrate that there is the positive relationship between expression of Fas and Fas ligand in granulosa cells and oocytes and apoptosis of them leading to atresia of follicles. It suggests that expression of Fas and Fas ligand could be associated with atresia of follicles in mouse ovary.

**Key words** : Apoptosis, Atresia, Fas, Fas ligand, Mouse ovary.

**요약** : Fas는 세포자연을 유도하는 세포 표면 수용체 단백질로서 면역계에서 중요한 역할을 한다. 이러한 Fas mRNA는 림프조직뿐만 아니라 비림프조직에서도 발현한다. 한편 대다수의 난포들은 세포자연사와 연관된 기작을 통해 난포폐쇄로 진행되는 것으로 알려지고 있으나, 난포폐쇄에 관한 기작은 아직 규명되지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 먼저 생쥐의 난소의 과립세포와 난자에서 Fas와 Fas ligand의 발현 여부를 알아보고, Fas와 Fas ligand 발현과 난포폐쇄와의 상관 관계를 알아보고자 하였다. RT-PCR을 수행한 결과, 난소내 과립세포와 난자에서 Fas와 Fas ligand mRNA가 모두 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 면역조직화학적 염색 결과 또한, 원시 난포를 제외한 모든 발달 중인 난포의 과립세포와 난자들에서 Fas와 Fas ligand가 검출되는 것을 확인하였고, 특히 폐쇄를 보이는 난포에서 강한 발현을 보였다. 한편, 난소에서 세포자연을 확인하기 위해 TUNEL 염색을 수행한 결과, TUNEL 양성을 보이는 과립세포와 난자의 수는 건강한 정상 난포에 비해 폐쇄난포에서 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과들은 난소내 과립세포와 난자에서 Fas와 Fas ligand 발현과 난포폐쇄와 상관 관계가 있음을 보여주고 있으며, 이러한 Fas와 Fas ligand가 생쥐 난소내 난포폐쇄 유발에 관여하고 있을 것으로 사료된다.

## 서론

난소내 세포의 세포자연사는 개체의 생식기 발생 전반에 걸쳐 광범위하게 관찰된다. 특히 난소의 주된 기능을 담당하는 과립세포의 죽음은 난소의 생리 조절에 중요한 영향을 미치며, 이러한 세포들의 죽음으로 인하여 난소내 난자를 포함한 난포의 폐쇄(atresia)가 진행되는 것으로 알려져 있다(Byskov, 1979a; Tsafirri and Braw, 1984; Yoon, 1990). 포유동물의 경우 생식이 가능한 시기 동안에 난자를 포함하는 난포의 99% 이상이 폐쇄된다(Byskov, 1974, 1979b; Tsafirri and Braw,

\* 이 논문은 1999년도 일부 한국과학재단 (KOSEF/HRC 99-0303) 연구비와 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

<sup>†</sup>교신저자: 서울시 성동구 행당동 산 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과. (우) 133-791, (전) 02-2290-0955, (팩) 02-2294-0955. E-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr

1984). 이러한 자연적 난포폐쇄에 대한 연구는 과거에는 단순한 형태적 분석과 호르몬 측정을 통하여 이루어졌으나 최근에 생리, 생화학적 그리고 분자생물학적 연구방법이 발전함에 따라 세포자연사의 개념을 난포폐쇄 기전 연구에 도입함으로써 그 원인을 밝혀내려는 실험들이 다양하게 진행되고 있다(Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al., 1991, 1992a; Jolly et al., 1994; Quirk et al., 1995). 그러나 그 기전의 규명에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

Fas는 세포자연사를 매개하는 세포 표면 단백질로서 TNF/NGF 수용체계 중의 하나이며 (Itoh et al., 1991), 활성화된 림프구뿐만 아니라 간, 심장, 허파에서도 발현되는데 8주된 성체 생쥐의 흉선, 심장, 간, 난소에서는 Fas mRNA가 풍부하게 발현된다고 보고되었다 (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). 이러한 Fas와 결합하는 Fas ligand는 type II 막단백질이고, 활성화된 T 세포에서 발현되어 세포독성 림프구의 효과인자로서 작용한다. 그리고 Fas를 발현하는 세포들에 대해 특이적 세포독성 활성을 가지며, 이로 인해 Fas ligand가 Fas와 결합하여 세포자연사를 유도한다고 가정되어 왔다(Suda and Nagata, 1994). 그러나 신체내의 다른 기관과는 달리, 면역계로부터 밀접한 영향을 받고 있지 않는 난소내에서 Fas의 발현이 미성숙 및 다양한 성숙단계에 있는 난포의 과립세포에서 나타난다는 사실이 생쥐, 흰쥐, 사람 등에서 보고되고 있다 (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Kim et al., 1998). 이러한 사실들은 난소내 기능적 주요 세포인 과립세포에 Fas ligand가 결합하여 세포자연사가 유발될 수 있다고 가정할 수 있겠으나 아직까지 이에 관한 연구는 미진한 상태이다.

따라서 본 실험에서는 생쥐 난소내 난자와 과립세포에서 Fas와 Fas ligand의 발현 유무를 확인하고 난포폐쇄와의 연관성을 조사하고자 하였다. RT-PCR 방법으로 Fas와 Fas ligand mRNA의 발현유무를 확인하였고, 또한 발현 부위를 알아보기 위하여 면역조직화학적 염색 방법을 시행하였다. 그리고 Fas와 Fas ligand의 발현과 난자 및 과립세포의 세포자연사간의 연관성을 알아보고자 TUNEL 염색 방법으로 세포자연사를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난소 및 난자의 획득

본 실험에서는 생쥐 (ICR strain) 암컷을 14시간(명)/10시간(암) 조명 조건하에서 일정기간 이상 먹이와 물을 충분히 공급하여 실험에 사용하였다. 실험 생쥐는 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis MO,

USA) 투여 여부에 따라 2가지 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 먼저 대조군은 생리식염수 0.2 ml을, 실험군은 5 IU PMSG를 복강에 주사하여 24시간 후 경추파괴로 도살하고, 즉시 난소와 흉선을 적출하였다. 적출한 왼쪽 난소와 흉선은 total RNA 추출을 위해 RNAzol™B (Tel-Test Inc., USA)에 넣어 사용전까지 -20°C에 보관하였다. 오른쪽 난소와 흉선 중 일부는 조직면역학적 검정을 위해 4% neutral buffered formaldehyde (NBF)에 고정하여 4°C에서 보관하였다. 나머지 난소는 난자를 얻기 위해 M16 배지에서 26G 주사기로 난포들을 터뜨려 난자와 과립세포를 얻은 다음, 난자는 0.1% hyaluronidase (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis MO, USA)를 처리하여 과립세포를 제거하였다. 과립세포는 배양액으로 3회 세척한 뒤 total RNA를 추출하기 전까지 RNAzol에 넣어 -20°C에 보관하였다. 획득한 난자 중 일부는 핵막이 있는 난자 (Germinal Vesicle, GV), 핵막이 붕괴된 난자 (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD), 퇴화된 난자, 절편화된 난자로 나누었다. 이들을 Poly-L-Lysin-coated 슬라이드에 부착시키고, 4% NBF로 고정된 후, phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고, 실온에서 건조시킨 후 -20°C에 보관하였다. 나머지의 난자는 상태에 따라 정상 난자, 퇴화된 난자, 분절화된 난자로 나누어 각각 약 100 개씩 모아 RNAzol™B에 넣어 실험 전까지 -20°C에서 보관하였다.

### 2. 난소 및 난자의 total RNA 추출

Total RNA를 추출하기 위해서, 0.2 ml의 RNAzol™B(Tel-Test Inc., USA)에 들어있는 생쥐의 난소를 homogenizer로 얼음위에서 균질화시켰다. 균질화된 현탁액을 각각 microcentrifuge tube로 0.2 ml씩 옮겨 20  $\mu$ l chloroform을 넣어 15초간 잘 섞어준 후, 12,000×g로 15분간 4°C를 유지하면서 원심분리하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하고 있는 무색의 수용액층을 새로운 tube로 옮겼다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 15분간 얼음위에 방치한 후, -20°C에서 최소 12시간 이상 RNA를 침전시켰다. 12,000×g로 15분간 4°C를 유지하면서 원심분리하여 상층액을 버린 후 75% ice-cold ethanol로 RNA를 세척하여 7,500×g로 8분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 10~15분간 진공상태에서 잘 건조시켰다. 건조된 RNA 침전물은 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수나 nucleasefree water에 용해시켜 50°C에서 15분간 녹인 후, 260nm / 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하고 -70°C에 보관하였다.

### 3. Fas 및 Fas Ligand의 RT-PCR

RNA 1  $\mu\text{g}$ 을 10 pM random hexamer(Promega, Seoulin Seoulin Scientific Co., Ltd., Korea) 4  $\mu\text{l}$  증류수와 함께 총 15  $\mu\text{l}$ 가 되도록 만든 다음, 70°C에서 5분간 가열시키고 4°C에서 식혀 spindown시켜 tube의 벽면에 붙은 수분을 모았다. 이 tube에 M-MLV RT 5  $\times$  reaction buffer 5  $\mu\text{l}$ , 25 mM dNTP 1  $\mu\text{l}$ , Recombination RNasin Ribonuclease inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.625  $\mu\text{l}$ , M-MLV RTase (200 U/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 와 Nuclease-free 증류수를 총 부피 25  $\mu\text{l}$ 가 되도록 첨가하였다. 이 혼합물은 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA로 만들어 PCR을 할 때까지 -20°C에 보관하였다. RNA 추출 및 역전사가 제대로 수행되었는지를 확인하기 위해서 house keeping gene으로 알려진  $\beta$ -actin을 먼저 PCR로 증폭하였다.  $\beta$ -actin forward primer sequence는 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', reverse primer sequence는 5'-GTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'을 제조하여 사용하였고, PCR 산물의 크기는 532 bp임을 확인하였다. Thin wall tube에 10 X buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , 25 mM dNTP 3  $\mu\text{l}$ , 100 pM의 3', 5'- primer 각각을 0.25  $\mu\text{l}$ 씩, *Taq* polymerase 0.25  $\mu\text{l}$ , cDNA 3  $\mu\text{l}$ 씩을 분주한 후, 총 25  $\mu\text{l}$ 가 되도록 distilled water를 넣어 잘 섞어주었다. PCR (PERKIN ELMER 2400 PCR machine) 반응조건은 95°C에서 5분간 predenaturation하고, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 총 28 cycles 실시하여 증폭하였다. 마지막으로 72°C에서 10 분간 postelongation시켜 충분히 PCR 산물을 얻어내어 전기영동 전까지 4°C에 보관하였다.  $\beta$ -actin으로 RNA 추출을 확인한 cDNA를 사용하여,  $\beta$ -actin에서의 혼합물을 기준으로 Fas 실험용 시료에는 Fas 3', 5'- primer를, Fas ligand 실험용 시료에는 Fas ligand 3', 5'- primer를 넣었다. *Taq* polymerase는 *Ex Taq* polymerase(Takara Co., Corebiosystem, Seoul)를 혼합하였다. Fas antigen forward primer sequence는 5'-CAG ACA TGC TGT GGA TCT GG-3', reverse primer sequence는 5'-TCA CTC CAG ACA TTG TCC-3'로 제조하여 사용하였다. Fas antigen 산물의 크기는 989 bp이다. Fas ligand forward primer sequence는 5'-GGG TGC CAT GCA GCA GCC CAT G-3' 이고 Fas ligand reverse primer sequence는 5'-CTT TTA AAG CTT ATA CAA GCC G-3'이며, PCR 산물의 크기는 850 bp이다. Fas와 Fas ligand의 PCR 반응조건은 95°C에서 5분간 predenaturation 시킨 후, 95°C에서 1분, 55.5°C에서 2분, 72 °C에서 3분간 총 35 cycles을 반복하여 증폭하고, 72°C에서 10분간 postelongation하여 PCR 산물을 얻어내었다. PCR 반응이 끝난 후 각각의 RT-PCR 산물들 9  $\mu\text{l}$ 와 10 X loading dye 1  $\mu\text{l}$ 를 섞어 10  $\mu\text{l}$ 씩 1% agarose gel에 100 V로 30 분간 전기영동하였다. Ethidium

bromide로 10분간 염색한 후 Image analyser (VILBER LOURMAT, France)하에서 관찰하고 촬영하였다.

#### 4. 난소 및 난자의 면역조직화학적 염색

Poly-L-Lysin coated 슬라이드 위에서 고정된 난자는 endogenous peroxidase를 제거하기 위해 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 10분동안 처리한 후 세척하였다. Tris buffer (pH 7.6)에서 5 분간 3회 세척한 후, 1:100으로 희석된 rabbit anti-Fas antibody (M-20; Santa Cruz Biochemistry, Inc., USA) 혹은 1:100으로 희석된 rabbit anti-Fas ligand antibody (Q-20; Santa Cruz Biochemistry, Inc., USA) 를 각각 일차항체로 1시간동안 상온에서 반응시켰다. Negative control은 일차항체 대신에 goat normal serum을 20  $\mu\text{l}$ 씩 각각의 슬라이드에 1 시간 배양시켰다. Tris buffer로 5분씩 3회 세척하고 이차항체인 biotinated goat anti-rabbit IgG (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)에 20분 동안 반응시켰다. Tris buffer로 5분씩 3회 세척 후 peroxidase-conjugated streptavidin (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)을 20분간 반응시키고, Tris buffer에 5분 동안 3회 세척하였다. Amino ethyl carbazol (AEC)로 2분간 발색을 시킨 다음 물에 세척하였다. Mayer's hematoxylin으로 2분간 대조 염색을 한 뒤, Crystal mount로 봉입하여 영구표본을 제작하였다.

4% NBF에 고정된 난소 조직은 흐르는 물에 30분간 수세하고 알코올 탈수과정을 거쳐 자일렌에 투명시켰다. 파라핀으로 침투시켜 포매된 조직을 박편절단기를 이용하여 4  $\mu\text{m}$  두께로 박절하였다. 이 박절된 조직 절편을 Poly-L-Lysin coated 슬라이드에서 60°C로 1시간 이상 열고정시켰다. 조직 절편 슬라이드는 자일렌에 5분씩 3단계로 슬라이드의 파라핀을 제거하고 알코올 탈수과정을 거쳐 흐르는 물에 세척하였다. 면역 항원성을 유지시켜 주기 위해 citric acid (pH 6.0)에 넣어 microwave로 15분간 처리하고 흐르는 물에서 5분간 세척한 후, 난자의 면역조직화학 염색과 동일한 과정을 수행하였다.

#### 5. 난소 및 난자의 세포자연사 확인

파라핀을 침투시켜 포매된 난소와 황선 조직은 세포자연사를 확인하기 위하여 TUNEL 염색을 수행하였다. 염색에는 *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag; Intergen, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하였다. 이 조직 절편 슬라이드는 5분씩 3번 자일렌으로 파라핀을 제거하고 알코올 탈수과정을 거쳐 물에 세척하였다. 조직 내의 단백질을 제거하기 위하여 proteinase K (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 15분간 처리하고, Tris buffer로 5분씩 3번 세척하였다. 그리고 슬라이드에 고정된 난자는 난소 조

적 슬라이드와 함께 다음 단계부터 동일하게 진행하였다. Endogenous peroxidase를 불활성화 시키기 위하여 실온에서 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 메탄올을 10분간 처리하였고, Tris buffer로 5분간 3번 세척한 뒤 equilibration buffer를 처리하여 10분간 방치하였다. Buffer를 제거한 후에 20 µl의 working strength TdT enzyme을 슬라이드에 떨어뜨리고, 수분이 날라가지 않도록 습기가 있는 chamber에 넣어 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 Tris buffer로 5분간 잘 세척한 후, enzyme의 반응을 중단시키기 위하여 37°C로 미리 준비된 20 µl의 working stop/wash buffer를 처리하여 15초간 흔들어준 후, 10분간 실온에 두었다. Tris buffer로 5분씩 3번 세척하고, anti-digoxigenin-peroxidase로 30분간 실온에서 반응시킨 후, Tris buffer로 5분간 3회 세척하였다. 3,3'-diaminobenzidine (DAB)로 2분간 발색시키고 증류수로 1분씩 3회 세척하고, Mayer's hematoxiline으로 2분간 대조염색을 실시하였다. 증류수로 세척한 뒤, 100% 에탄올에 탈수하였으며, 자일렌으로 투명화시켜 Canada balsam으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다.

## 결 과

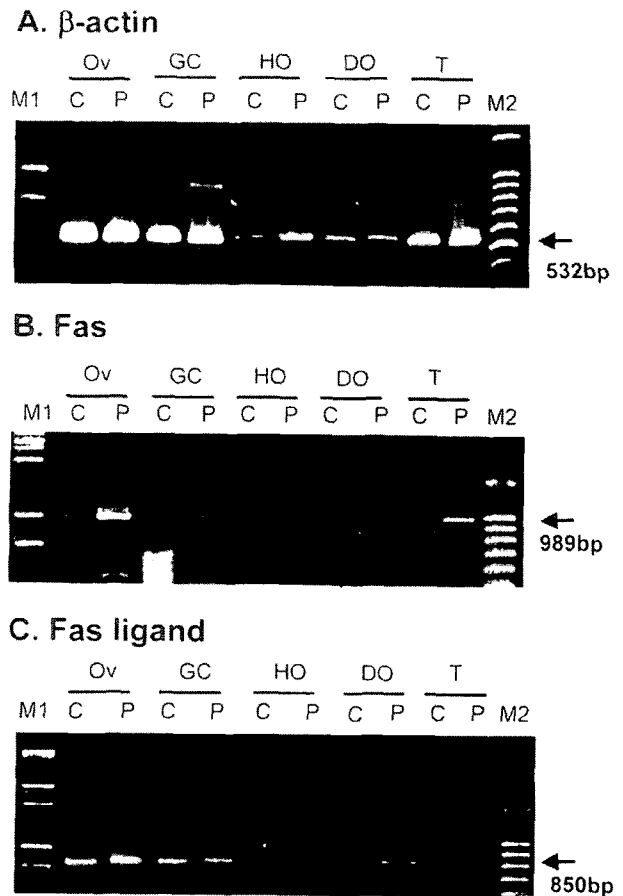
### 1. RT-PCR에 의한 Fas와 Fas ligand의 발현 확인

생쥐 흉선과 난소내 난자 및 과립세포에서 Fas와 Fas ligand mRNA의 발현을 확인하고자 RT-PCR을 실시하였다 (Fig. 1). 먼저 난소 조직에서 Fas와 Fas ligand mRNA가 모두 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 과립세포와 난자를 분리해서 RT-PCR을 수행한 결과에서도 Fas와 Fas ligand가 모두 발현되는 것을 알 수 있었다. 한편, 난자의 상태에 따른 RT-PCR 결과에서도 정상인 난자와 퇴화된 난자 모두 동일하게 Fas와 Fas ligand mRNA가 증폭되는 결과를 나타냈다.

PMSG 처리군과 대조군에서 Fas와 Fas ligand mRNA 발현을 조사한 결과, PMSG 처리군의 난소에서 Fas mRNA 발현이 대조군에 비해 증가함을 나타낸 반면 Fas ligand mRNA 발현은 두 실험군간에 차이가 없었다. 그러나 과립세포와 난자에서는 PMSG 처리와 관계없이 Fas와 Fas ligand mRNA 모두 유사한 발현 정도를 보였다. 한편, Fas 양성 대조군으로 사용한 흉선 조직에서는 Fas mRNA가 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

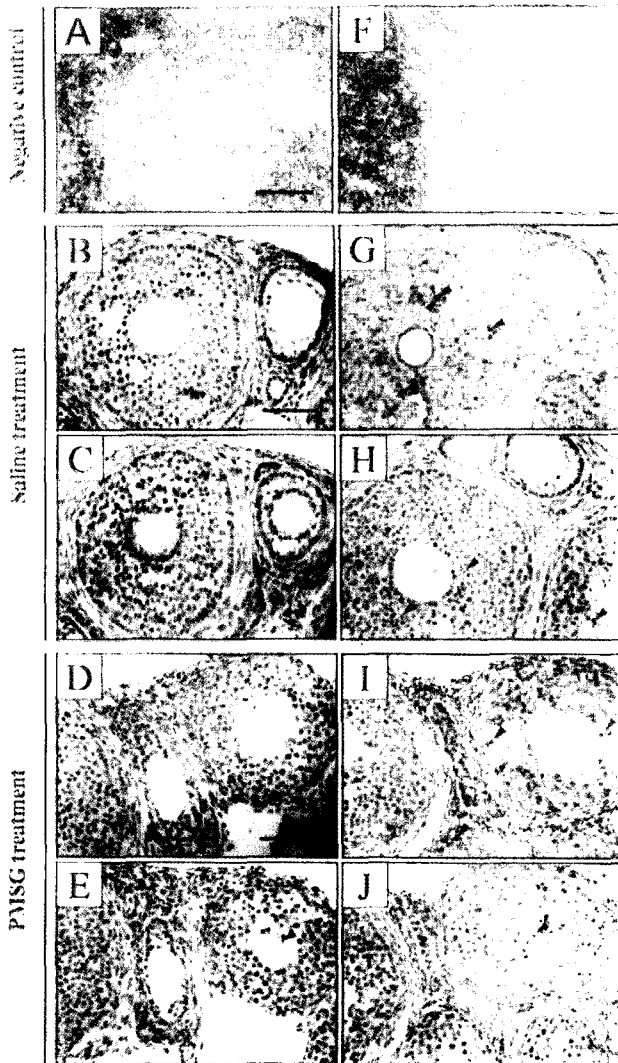
### 2. 난소내 Fas 및 Fas Ligand의 면역조직화학적 관찰

생리식염수 혹은 PMSG를 주사한 생쥐로부터 24시간 후에 적출한 흉선과 난소를 대상으로 Fas 및 Fas ligand에 대한 면역조직화화법을 시행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fas



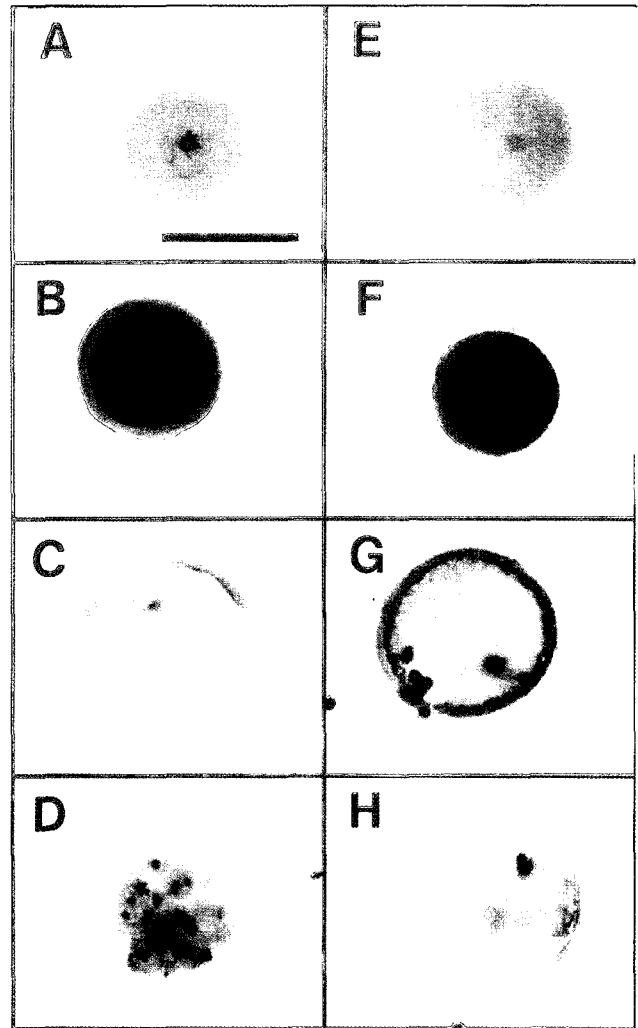
**Fig. 1. Electrophoretic analysis of RT-PCR products for Fas and Fas ligand mRNA.** Total RNAs from mouse ovary (Ov), thymus (T), granulosa cells (GC), healthy oocytes (HO), degenerated oocytes (DO). Tissues and cells were collected after 24 hours post injection of saline (C) or PMSG (P). Lanes were denoted as Ov, GC, HO, DO and T respectively. PCR products are electrophoresed with EtBr on 1% agarose gel. Gels were observed and photographed under image analyser. EtBr, Ethidium Bromide; M1, 1kb DNA ladder Marker; M2, 100bp ladder marker. A, RT-PCR analysis of  $\beta$ -actin mRNA from mouse tissues using mouse  $\beta$ -actin primers.  $\beta$ -actin transcripts of 532 bp were detected. B, RT-PCR analysis of Fas mRNA mRNA from mouse tissues using mouse Fas antigen primers. Fas transcripts of 989 bp were detected. C, RT-PCR analysis of Fas ligand from mouse tissues using mouse Fas ligand antigen primers. Fas ligand transcripts of 850 bp were detected.

양성 대조군으로 사용한 흉선에서는 Fas가 발현되나, Fas ligand는 발현되지 않는 것으로 알려져 있다(Watanabe-Fukunaga et al., 1992). 본 실험의 결과도 역시 Fas는 흉선 조직에서 검출되었으나(Fig. 2A), Fas ligand는 염색되지 않았다(Fig.



**Fig. 2. Immunohistochemistry for Fas and Fas ligand and TUNEL staining in mouse thymus and ovary.** Thymus and ovaries were collected 24 hours after PMSG or saline administration. They were embedded in paraffin and sectioned at the thickness of 4 $\mu$ m. Thymus was stained for Fas (A) and for Fas ligand (F). Ovaries treated with saline were stained with Mayer's hematoxylin (B) and for TUNEL (G), Fas (C), and Fas ligand (H). Ovaries treated with PMSG were stained with Mayer's hematoxylin (D) and for TUNEL (I), Fas (E), and Fas ligand (J). Arrow heads indicate pyknotic cells. Bar Scale = 20  $\mu$ m (A, F) and 10 $\mu$ m (B-E and G-J).

2F). 생리식염수를 주사한 대조군의 난소내 과립세포에서 Fas와 Fas ligand는 난포의 발달단계에 따라 염색정도를 보이며 발현하고 있음을 관찰할 수 있었다. Fas는 원시난포에서는 나타나지 않았으나 강소형성전난포(PAF)에서 약하게 염색되었고, 초기 강소형성난포(EAF)에서는 가장 강한 염색을



**Fig. 3. Immunohistochemistry for Fas and Fas ligand in mouse oocytes.** Oocytes were collected 24 hours after PMSG administration. Oocytes were fixed in 4% NBF and air-dried on poly-L-lysine coated slide. Oocytes were stained with Mayer's hematoxylin (A, E), anti-Fas antibody (B-D), anti-Fas ligand antibody (F-H). A and E, negative control oocyte. B and F, normal oocytes. C and G, degenerated oocytes. D and H, fragmented oocytes. Original magnification: X 400. Bar Scale = 5  $\mu$ m.

보였다(Fig. 2C). 반면, Fas ligand는 원시난포, 강소형성전난포 그리고 초기강소형성난포 모두 약한 염색정도를 나타내었다(Fig. 2H).

PMSG를 주사한 생쥐 난소의 경우, Fas의 발현 정도는 전체적으로 PMSG를 투여하지 않은 생쥐 난소에서보다 증가한 양상을 나타냈다(Fig. 2E). 그러나 난포가 성장함에 따라 각 난포별 염색성의 차이는 보이지 않았다. Fas ligand도 역시 Fas와 같이 모든 난포들의 과립세포에 고르게 발현되고 있었으나 발현 정도는 약했다(Fig. 2J). 특히, 난소내 난자에서 Fas

와 Fas ligand의 발현을 확인할 수 있었는데, Fas는 주로 원시 난포와 강소형성전난포내 난자들에서 염색되었고, 일부는 투명대에 강한 염색 정도를 나타내었다. 그러나 Fas ligand는 난포의 발달단계에 관계없이 약한 염색 정도를 보였다.

### 3. 난소내 세포자연사 관찰

대조군의 원시난포 및 강소형성전난포에서 TUNEL 양성 염색을 보이는 과립세포는 거의 관찰되지 않았으나, 강소형성난포와 배란전 난포에서는 많은 수의 TUNEL 양성 염색을 보이는 과립세포들을 확인할 수 있었다(Fig. 2G, I). Fas와 Fas ligand의 면역조직화학 염색 결과와 비교했을 때, Fas가 주로 강하게 염색된 강소형성난포내 과립세포와 난자에서 세포자연사가 일어났음을 확인할 수 있었다.

### 4. 난자에서 Fas 및 Fas Ligand의 면역조직화학적 관찰

난자만을 분리해서 Fas와 Fas ligand에 대한 면역조직화학 염색을 수행한 결과, 먼저 1차 항체대신에 goat normal serum를 처리한 음성 대조군은 Fas와 Fas ligand가 난자표면이나 난자내 어느 곳에서도 염색이 되지 않았음을 보여주었다(Fig. 3A, E). 난자의 발달 단계에 따라 보았을 때, 핵막이 있는 난자 표면에 Fas와 Fas ligand가 모두 발현되었고(Fig. 3B, F), 핵막이 붕괴된 난자에서도 마찬가지로의 결과를 보였다. 또한 퇴화된 난자에서도 동일한 염색 결과를 나타내었다(Fig. 3C, G). 반면, 분절화된 난자의 경우 Fas와 Fas ligand가 난자의 표면에는 아주 약하게 염색되었으나, 난자의 내부에 그들의 발현 정도는 정상 난자와 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3D, H).

## 고 찰

Sakamaki 등 (1997)은 많은 양의 Fas mRNA가 림프 조직뿐만 아니라 간, 심장, 난소에서도 검출됨을 확인하였고, 특히 Fas는 난소내 과립세포와 황체세포에서만 발현되고, 난자에서는 발현되지 않는 것으로 보고하였다. 그러나 본 실험 결과에서 Fas와 Fas ligand가 난자와 과립세포 모두에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다. Kondo 등 (1996)은 난포의 발달 단계에 따라 Fas의 발현을 조사한 결과 정상적인 난포에서는 강소를 형성할 때까지 난자에서만 발현되다가 배란전 난포가 되면 난자와 과립세포에서는 발현되지 않고 협막세포에서만 발현된다고 보고하였다. 그러나 폐쇄난포의 경우, 강소형성 전까지는 퇴화하고 있는 난자에서만 Fas가 발현되고 강소형성 후에는 과립세포에서 Fas가 발현되며, 난포폐쇄 말기에는 협막세포에서만 발현되는 것으로 보고하였다. 한편

Hakuno 등 (1996)은 면역조직화학적 염색 방법과 *in situ hybridization* 방법으로 흰쥐의 난소에서 Fas 발현을 조사한 결과 강소형성 시기의 폐쇄 난포내 과립 세포들에서 Fas가 발현되고, 정상 난포내 과립 세포에서는 발현되지 않는 것을 보고하였다. 그러나 Fas ligand는 거의 모든 난포내 난자에서 검출되었다고 밝혔다. 또한 강소형성 시기의 폐쇄 난포에서 Fas와 Fas ligand가 과립 세포에서 발현되며, 특히 초기 강소형성 단계에 있는 정상 난포에서 Fas와 Fas ligand가 강하게 염색됨을 보고하였다(Kim et al., 1998). 이러한 Fas가 생쥐 난자에서 발현되어 세포자연사를 유발시켜 난자를 퇴화시키는 것으로 보고하고 있다(Guo et al., 1994). 그러나 본 연구에서 난자의 상태에 따라서 정상적인 난자, 퇴화된 난자와 분절화된 난자로 나누어 Fas와 Fas ligand의 발현을 조사한 결과 그들의 mRNA 및 단백질 발현 정도에는 큰 차이가 없었다. Fas와 Fas ligand의 발현 정도의 차이가 없고 Fas가 발현되었음에도 불구하고 세포자연사가 일어나지 않은 난자가 있는 것으로 보아 난자내 Fas의 발현만으로 난자가 퇴화되어 난포폐쇄가 일어나지는 않는 것으로 사료된다. 이러한 원인 중에 하나로 난자를 둘러싸고 있는 투명대를 들 수 있다. Xu 등 (1997)과 Guo 등 (1997)은 난자의 Fas와 과립세포의 Fas ligand 간의 상호작용이 난자의 세포자연사를 유발시키며, 난자의 투명대를 제거한 후 과립세포와 함께 배양하면 투명대가 Fas와 Fas ligand의 상호작용을 방해하여 세포자연사가 억제된다는 것을 증명하였다. 본 실험에서는 난자의 면역조직화학적 염색 시 Fas와 Fas ligand가 막에 결합된 단백질임을 고려하여 acidic Tyrod's solution(pH 3.0)을 사용할 경우 단백질의 변성을 야기할 수 있음을 고려하여 투명대를 가진 난자를 그대로 염색하였다. 또한 난소 염색 결과에 나타난 바와 같이 Fas와 Fas ligand가 강소형성전난포 상태인 난자의 투명대에 염색되지 않고 강소형성난포에서 투명대에 염색되는 것으로 보아, Xu 등과 Geo 등의 결과와는 달리 Fas와 Fas ligand가 난포의 발달단계에 따라 난자의 투명대를 통해 상호작용을 하는 것으로 사료된다.

난소에서 Fas와 Fas ligand의 발현을 면역조직화학적 방법으로 염색한 결과 모든 단계의 난포에서 발현되나 세포자연사는 특정 난포에서만 나타났다. 특히 강소형성전난포와 초기 강소난포의 강소 주변에 pyknotic nuclei를 보이는 과립세포들에서 세포자연사가 일어났다. 반면에 일부 Fas와 Fas ligand의 발현을 보이는 난포에서 세포자연사가 일어나지 않는 과립세포도 존재함을 확인할 수 있었다. 한편 난자에서 Fas와 Fas ligand 발현을 관찰해본 결과, 강소형성전난포내 난자들이 Fas를 발현하지만 투명대에는 전혀 염색되지 않고

난자의 내부에 약하게 염색되었다. 초기강소난포의 난자에서는 Fas ligand가 난자 내부에 염색되었으며, 투명대에 좀 더 강하게 염색되는 결과를 얻었다. 반면 난자들만을 염색하였을 때는 성숙단계와 상태에 따라 Fas와 Fas ligand가 동일하게 투명대에 염색되는 것을 확인하였다. 이는 난자의 획득 단계에서 이미 그 난포는 성숙이 완료된 상태이므로 난소 조직의 면역조직화학적 염색 결과 중에서 초기 강소형성난포 내 난자의 투명대 염색 결과와 일치하는 것으로 판단된다.

그러나 Fas와 Fas ligand를 발현하는 세포들이 모두 세포자연사를 유발하는 것은 아니며, Fas-Fas ligand system 이외에 이와 더불어 세포자연사를 유발하는 다른 인자에 의해서 조절이 되는 것으로 보인다. 그동안 많은 다른 단백질들이 Fas로 매개된 세포자연사를 조절하는 것으로 제시되어 왔다. 이와 같이 세포자연사를 활성화 혹은 억제시키는 많은 인자들에 의해서 Fas와 Fas ligand의 상호작용으로 인한 세포자연사를 조절하는 것으로 사료된다.

본 실험의 결과들을 종합해 볼 때 Fas와 Fas ligand가 발현되고 있는 난포임에도 불구하고 세포자연사가 일어나지 않은 것은 세포내 신호전달과정 중 특정 단계의 억제 가능성을 시사한다. 이와 더불어 Fas 및 Fas ligand의 발현은 세포자연사의 유도에 필요조건이지만 충분조건은 아니라고 생각된다. 특히 난소내 난포의 분화과정에는 각 단계별로 다양한 호르몬 및 cytokine이 관여한다는 사실을 고려할 때, Fas의 활성화에 의한 세포자연사에는 Fas ligand와의 결합이외에 난소내 다양한 양성 및 음성 조절인자들이 관여되어 있을 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Byskov AG (1974) Cell Kinetic studies of Follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 37:277-285.
- Byskov AG (1979a) Regulation meiosis in mammals. *Ann Biochem Biophys* 19:1251-1261.
- Byskov AG (1979b) Atresia. In: Midgley FAR, Sadler WA (eds), *Ovarian Follicular Development and Function*, Plenum Press, New York pp 41-58.
- Guo MW, Mori E, Xu JP, Mori T (1994) Identification of Fas antigen associated with apoptotic cell death in murine ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 30;203(3):1438-46.
- Guo MW, Xu JP, Mori E, Sato E, Saito S, Mori T (1997) Expression of Fas Ligand in murine ovary. *Am J Reprod Immunology* 37:391-398.
- Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakane PK (1996) Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137(5):1938-1948.
- Hughes Jr FM, Gorospe WC (1991) Biochemical identification of apoptosis (programed cell death) in granulosa cells: Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415-2422.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243.
- Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP (1994) Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cAMP response to FSH and follicular atresia. *Biol Reprod* 51:934-944.
- Kim JM, Boone DL, Auyeung A, Tsang BK (1998) Granulosa Cell Apoptosis Induced at the Penultimate Stage of Follicular Development Is Associated with Increased Levels of Fas and Fas Ligand in the Rat Ovary. *Bio Reprod* 58:1170-1176.
- Kondo H, Maruo T, Peng X, Mochizuki M (1996) Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2702-2710.
- Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson PK (1995) Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/ luteal cells. *Biol Reprod* 52:279-287.
- Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S-I, Manabe N, Yonehara S (1997) Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *MRD* 47:11-18.
- Suda S, Nagata S (1994) Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 179:873-878.
- Tilly JL, Kovalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW (1991) Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129:2799-2801.
- Tilly JL, Billig H, Kovalski KI, Hsueh AJW (1992) Apoptosis in atretic ovarian follicle is associated with selective decreases in messenger RNA transcripts for gonadotropin receptors and cytochrom p450 aromatase. *Endocrinology* 131:1670-1676.
- Tsafiri A, Braw RH (1984) Experimental approaches to atresia

- in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* pp 6226-6265.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992) The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148:1274-1279.
- Xu JP, Li X, Mori E, Sato E, Saito S, Guo MW, Mori T (1997) Expression of Fas-Fas ligand system associated with atresia in murine ovary. *Zygote* 5:321-327.
- Yoon Y-D, Lee CJ, Do BR, Kim JH, Kim MK (1990) Biochemical study on the metabolism of follicular maturation II. Protein composition and steroid concentration in individually isolated medium-sized follicular fluid of pig ovary. *Kor J Zool* 33:63-69.