

생쥐 내로 투여된 GnRH Agonist가 난소내 세포자연사와 Estradiol 및 Progesterone 합성에 미치는 영향

홍순정 · 양현원^{1†} · 김미란 · 이치형² · 황경주 · 권혁찬³ · 윤용달⁴
아주대학교 의과대학 산부인과학교실, ¹을지의과대학교 생명과학연구소,
²21세기 연세산부인과, ³매이저병원, ⁴한양대학교 생명과학과

Effects of GnRH Agonist Administered to Mouse on Apoptosis in Ovary and Production of Estradiol and Progesterone

Soonjung Hong, Hyunwon Yang^{1†}, Mi-Ran Kim, Chi-Hyeong Lee²,
Kyung-Joo Hwang, Hyuck-Chan Kwon³ and Yong-Dal Yoon⁴

Department of Obstetrics and Gynecology, Ajou University School of Medicine, Suwon 442-721, Korea

¹Life Science Institute, Eulji University School of Medicine, Seoul 139-711, Korea

²21 Century Yonsei Obstetrics and Gynecology Clinic, Seoul 136-033, Korea

³Major Woman's Care Center, Seoul 138-040, Korea

⁴Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT : There have been reports that administrated high-dose gonadotropin-releasing hormone-agonist(GnRH-Ag) suppresses endogenous gonadotropin production and inhibits function of ovary. In human IVF-ET program, however, GnRH-Ag is employed in large amounts during superovulation induction resulting to luteal phase defects which must be supported with progesterone. To elucidate the reason of luteal phase defects by GnRH-Ag, the aim of this study was to investigate the apoptosis changes in the ovary and the hormonal changes in the serum after GnRH-Ag and PMSG administration in adult mice in a method similar to human superovulation induction. GnRH-Ag(10 µg) or saline was injected every 12h beginning 48h prior to PMSG injection until 48h after PMSG injection when blood sampling and ovary collection was performed. In results, the ovary weight in the GnRH-Ag only injection group was significantly lower when compared with the other two groups, PMSG only or PMSG + GnRH-Ag injection. The ratio of preantral follicles in the ovary are increased in the GnRH-Ag only group, while the ratio of antral follicles are decreased and the corpus luteum ratio is increased in the PMSG + GnRH-Ag group. The proportion of all follicles showing apoptosis in the GnRH-Ag only injection group was seen to be more than twice the proportion seen in the PMSG only injection group, and such increased apoptosis is decreased after addition of PMSG. The serum levels of both estradiol and progesterone were significantly lower in the GnRH-Ag only group compared to those in the other two groups. When the administration of GnRH-Ag were followed by PMSG injection, however, estradiol concentration was completely recovered compared to the serum level of PMSG group, but not progesterone level. In conclusion the use of GnRH-Ag in human IVF-ET program may induce the apoptosis and the suppression of hormone production by ovary leading to luteal phase defects, thus adequate progesterone support seems to be necessary against them.

Key words : Apoptosis, Luteal phase defects, GnRH agonist, Ovary, Progesterone.

요 약 : 높은 농도로 투여된 성선자극호르몬 분비호르몬 이성체(GnRH-Ag)는 성선자극호르몬의 분비를 억제시키고 난소의 기능을 억제하는 하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 체외수정 및 배아이식 시술과정에서 과배란 유도를 위해 다량의 GnRH-Ag를 사용하고 있으며, 이는 progesterone을 보충해 주어야 하는 황체기 결함을 유발시킨다. 본 실험의 목적은 이러한 황체기 결함을 유발시키는 원인을 알아보고자 사람 과배란 유도 과정과 비슷하게 생쥐에 GnRH-Ag와 PMSG를 투여하고 난소내 세포자연사와 호르몬 합성의 변화를 조사하고자 하였다. GnRH-Ag과 생리식염수를 PMSG 투여전 48시간부터 투여 후 48시간까지 12시간 간격으로 10 µg씩 주사한 후 난소와 혈액을 채취하였다. 결과로서 난소의 무게는 GnRH-Ag만을 투여한 군에서 다른 두 실험군(PMSG 투여군, PMSG + GnRH-Ag 투여군)에 비해 유의하게 감소하였다. GnRH-Ag 투여군에서 난소내 강소형성전 난포의 비율은 증가한 반면, PMSG + GnRH-Ag 투여군에서는 강소형성 난포의 비율은 감소하였고 황체

의 비율은 증가하였다. 한편 난소내 세포자연사를 보이는 난포의 비율은 GnRH-Ag 투여군에서 PMSG 투여군에 비해 두배 이상 증가한 것을 알 수 있었고, 이러한 증가는

[†]교신저자: 서울시 노원구 하계1동 280-1, 을지병원 생명과학연구소
(우) 139-711, (전) 02-970-8710, (팩) 02-970-8002, E-mail: hwyang@eulji.or.kr

PMSG를 함께 투여함으로써 감소하는 것을 알 수 있었다. 혈청내 estradiol과 progesterone의 농도는 GnRH-Ag 투여군에서 다른 두군에 비해 유의하게 감소하였다. 그러나 GnRH-Ag와 함께 PMSG를 투여한 경우 estradiol 농도는 PMSG 투여군 수준까지 완전히 회복되었으나, progesterone 농도는 완전히 회복되지 않았다. 결론적으로 체외수정 및 배아이식 과정에서 사용되는 GnRH-Ag는 난소내 세포자연사를 유발하고 호르몬 합성을 억제시켜 황체기 결함을 유발시킬 수 있으며, 이를 막기 위해 적절한 progesterone 보충이 필요한 것으로 사료된다.

서 론

시상하부에서 분비되는 생식선자극호르몬 분비호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)은 뇌하수체의 GnRH 수용체를 활성화시켜 난포자극호르몬(follicle-stimulating hormone)과 황체화 호르몬(luteinizing hormone, LH)의 분비를 조절함으로써 생식소의 기능을 조절한다(Andrews et al., 1988; Wierman et al., 1989). 뇌하수체에서 GnRH가 정상적인 생리적 반응을 일으키기 위해서는 시상하부에서 분비되는 GnRH가 일정한 리듬과 빈도를 가지고 뇌하수체에 작용하여야 한다. 그러나 시상하부의 기능에 이상이 생겨 GnRH가 지속적으로 분비되거나, 외부에서 다량의 GnRH agonist(GnRH-Ag)를 투여할 경우 GnRH 분비 리듬이 깨지면서 뇌하수체에서는 GnRH에 대한 탈감각(desensitization) 반응을 일으켜 오히려 FSH와 LH의 분비를 억제시키고 이로 인하여 난소의 기능이 억제된다(Kalra, 1986). 이러한 탈감각 반응을 이용한 GnRH-Ag의 억제 효과는 자궁내막증의 치료와 피임 목적으로 임상에서 사용되고 있으며(Fraser, 1982; Meldrum et al., 1982), 또한 체외수정 및 배아 이식 기술(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)에 있어서 보다 안정적인 과배란 유도를 위해 다량의 GnRH-Ag를 FSH 및 hMG와 병용하여 사용하고 있다(Maclachlan et al., 1989; Smitz et al., 1992). 이러한 GnRH-Ag의 지속적이고 반복적인 사용은 난소에 직접 또는 간접적으로 작용하여 난소의 기능에 이상을 유발시킬 수 있는 것으로 보고하고 있으며(Naor & Yavin, 1982; Ma & Leung, 1985; Pellicer et al., 1992), 또한 난포내 세포들에 세포자연사를 유발시켜 난포의 폐쇄 및 황체 퇴화를 유도하는 것으로 보고하고 있다(Billig et al., 1994). 이러한 원인으로 과배란 유도를 위해 투여하고 있는 다량의 GnRH-Ag 또한 난소의 기능을 억제하는 효과를 보일 수 있으며, 특히 황체의 기능을 저하시켜 progesterone 합성이 억제됨으로써 황체기 결함(luteal phase defects)을 유발시킬 수 있다. 한편 GnRH-Ag를 사용한 경우 FSH/hMG만으로 과배란을 유도한 방법과 비교해 볼 때 난자 회수율과 수정률, 발달률 및 임신율에는 차이가

없는 것으로 보고하고 있어(Martin, 1989; Herman et al., 1990), GnRH-Ag에 의한 난소 기능 억제 효과가 함께 투여된 FSH/hMG에 의하여 회복되는 것으로 판단되나 아직 정확한 기전을 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 사람 과배란 유도 과정중에 GnRH-Ag를 다량 투여하였음에도 불구하고 양질의 난자를 얻을 수 있는 이유와 황체기 결함의 원인을 조사하고자 생쥐를 대상으로 PMSG와 GnRH-Ag를 사람 과배란 유도 과정과 유사한 방법으로 투여한 후 난소의 무게와 혈청내 estradiol과 progesterone의 농도를 측정하고 난포내 세포자연사를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 난소 및 혈청 획득

본 실험에서 사용한 생쥐(6주령, ICR 계열)는 14시간/10시간(명/암) 조명 조건에서 3~4일간 적응시키고, 먹이와 물을 충분히 공급하여 실험에 사용하였다. 배란 시기를 동일하게 유도하기 위하여 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Sigma, St. Louis, MO) 7.5IU를 복강 주사한 후 48시간에 생쥐의 몸무게를 측정하고 심장에서 혈액을 채취한 다음 난소를 획득하여 무게를 측정하였다. 실험은 PMSG 투여군, GnRH-Ag 투여군, PMSG+GnRH-Ag 투여군으로 나누어 시행하였다. PMSG 투여군은 PMSG만 투여하였으며 다른 군과 동일한 자극을 주기 위하여 PMSG 주사 48시간 전부터 PBS 0.2ml를 12시간 간격으로 투여하였다. GnRH-Ag 투여군은 PMSG는 주사하지 않고 동일 기간 동안 12시간 간격으로 GnRH-Ag만을 10 μ g 씩 매회 주사하였다. PMSG+GnRH-Ag 투여군은 PMSG 주사 48시간 전부터 GnRH-Ag(buserelin acetate; Suprefact, Hoechst) 10 μ g을 12시간 간격으로 투여한 후 PMSG를 주사하였다(Fig. 1).

2. 난소의 조직학적 관찰

난소 조직의 형태학적 관찰을 위하여 4% NBF(Neutral Buffered Formalin)으로 고정하고 알콜 처리 과정을 거쳐 탈수시켰으며, xylene으로 투명화시킨 후 파라핀(Paraplast plus, Mo-

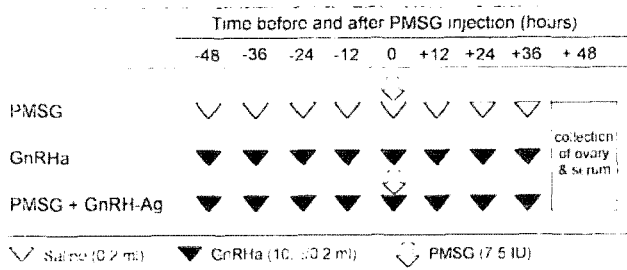


Fig. 1. Experimental design. Five mice from each treatment group were received injections of either GnRH-Ag(10μg/0.2ml) or saline(0.2ml) every 12h before and after PMSG(7.5IU) administration. At 48h after PMSG injection ovaries and serum were collected to investigate apoptosis and measure hormone levels.

noject)을 침투시켜 포매하였다. 박편절단기(Microtome, Lipshaw)를 사용하여 4μm로 절편을 만든 다음 xylene으로 파라핀을 제거하고, 알콜 처리 과정을 거친 후 증류수로 세척하였다. 파라핀이 제거된 조직은 핵과 세포질을 각각 Hematoxylin-Eosin(H-E)으로 염색하였으며, 알콜에 의한 탈수 과정을 거쳐 xylene에 옮긴 후 canadian balsam (Wako Pure Chemical Co.)으로 봉입하였다. 염색된 과립세포 및 황체세포들을 광학현미경하에서 검경하여 핵 응축(pyknotic nuclei) 또는 apoptotic body로 보이는 세포들을 관찰하였다. 난포의 갯수는 강소형성전 난포(pre-antral follicle), 강소형성 난포(antral follicle), 황체(corpus luteum)으로 구분하여 산정하였다.

3. TUNEL 방법에 의한 세포자연사의 확인

세포자연사의 확인은 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP- digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) 방법을 사용하였으며, *in situ* apoptosis detection kit(ApoTag^R Plus; Oncor, Gaithersburg, MD)를 사용하였다. 준비된 조직은 탈 파라핀 과정을 거친 후 tris buffer로 세척하였다. 세포내에 존재하는 peroxidase를 중화시키기 위하여 30% H₂O₂로 5분간 처리한 후 tris buffer로 세척하고, apoptosis detection kit에 들어있는 equilibration buffer로 15분간 처리하였다. 여분의 액은 제거하고 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) enzyme을 첨가하여 37°C 습윤 chamber에서 90분간 반응시켰다. 반응을 종료시키기 위해 kit에 포함되어 있는 stop/wash buffer에 10분간 처리한 후 tris buffer로 충분히 세척하였다. Anti-digoxigenin peroxidase로 30분간 실온에서 반응시킨 후 tris buffer로 세척하고 0.002% H₂O₂가 들어있는 3,3'-diaminobenzidine (DAB)을 5분간 처리하여 발색시킨 후 증류수로 세척하여 methylene blue로 이중 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 탈

수 과정을 거쳐 canadian balsam으로 mounting하여 광학현미경하에서 세포자연사 여부를 관찰하였다. 난소내에서 세포자연사가 일어난 난포의 비율은 전체 난포 수 중에 세포자연사가 확인된 난포 수의 백분율(세포자연사가 확인된 난포 수/전체난포 수×100)로 나타내었다.

4. 혈청내 estradiol과 progesterone 측정

혈청내 estradiol (E₂)과 progesterone (P₄) 농도의 정량은 γ-counter system (Cobra II, Packard, USA)을 이용하여 측정하였다. 각 실험군에서 획득한 혈액은 원심분리하여 순수 혈청만을 분리한 후 E₂와 P₄를 측정하였다. E₂의 정량은 Coat-A-Count Estradiol kit (DPC, USA)를 사용하였으며, 측정 가능한 감도(sensitivity)는 8pg/ml이고, intraassay coefficient variation은 5.8+5.5%, interassay coefficient variation은 7.4+6.7%이었다. P₄의 정량은 Coat-A-Count Progesterone kit (DPC, USA)를 사용하였으며 측정 가능한 감도는 0.02ng/ml이고, intraassay coefficient variation은 3.6+0.12%, interassay coefficient variation은 3.9+0.13%이었다.

5. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 one way ANOVA와 χ²-test 방법을 사용하였으며 p 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 난소 무게의 변화

생쥐 몸무게는 PMSG만을 투여한 군에서 26.62±1.80g, GnRH-Ag만을 투여한 군에서 26.66±2.13g, GnRH-Ag와 PMSG를 함께 투여한 군에서 26.52±0.81g으로 차이가 없었다. 반면 난소의 무게는 PMSG 투여군에서 오른쪽과 왼쪽 각각 7.28±0.66mg과 7.10±1.60mg, GnRH-Ag 투여군에서 4.76±1.44mg과 5.36±1.41mg, PMSG+GnRH-Ag 투여군에서 6.68±1.12mg과 6.48±1.43mg으로서 GnRH-Ag만을 투여한 군에서 유의하게 난소 무게가 감소하였다(p<0.05) (Table 1).

2. 난소의 조직학적 관찰

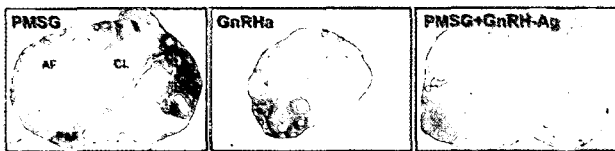
조직학적 관찰 결과 GnRH-Ag의 투여에 의한 난소 무게의 감소에 따라 부피도 작아져 있었으며, GnRH-Ag와 PMSG를 함께 투여하였을 경우 GnRH-Ag를 단독으로 투여한 것보다는 난소의 부피가 증가하는 경향을 보여주었다(Fig. 2A). 각 실험군에서 난소내 난포를 각 시기별로 구분하여 조사한 결

Table 1. Effects of PMSG and GnRH-Ag on ovarian weight

	Body wt.(g)	Ovary wt. (mg)	
		Right	Left
PMSG	26.62±1.80	7.28±0.66	7.10±1.60
GnRH _a	26.66±2.13	4.76±1.44 ^a	5.36±1.41 ^a
PMSG + GnRH-Ag	26.52±0.81	6.68±1.12	6.48±1.43

Ovaries were isolated and weights recorded 48h after PMSG injection. Data are expressed as mean ± SD. Letter a indicates significant difference compared to PMSG group ($p < 0.05$).

A.



B.

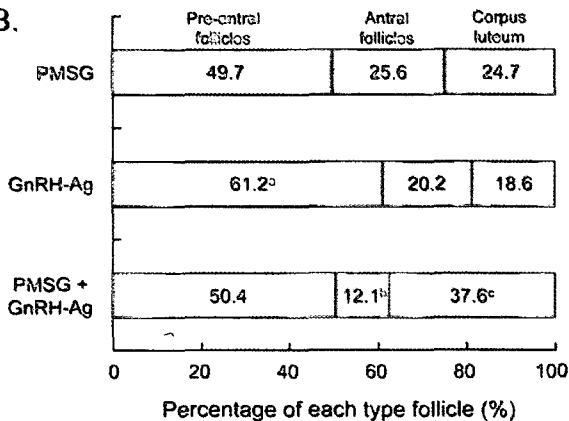


Fig. 2. Representative ovarian tissues stained with hematoxylin-eosin(A) and percentage of each type follicles(B). Observed follicles were classified into preantral (PAF) and antral follicles(AF), and corpus luteum(CL) according to the antrum formation and morphology of follicle and then separately counted in each experiment group. a, b, and c indicate a significant difference between PMSG and GnRH-Ag or PMSG + GnRH-Ag treatment groups ($p < 0.05$). Original magnification, $\times 20$.

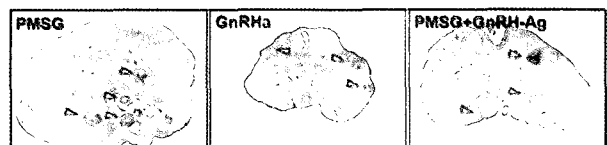
과, PMSG 만을 투여한 군에서 강소형성전 난포 비율은 49.7%, 강소형성 난포의 비율은 25.6%, 황체의 비율은 24.7%를 차지하고 있었으며, GnRH-Ag만을 투여한 실험군에서는 강소형성전 난포 비율은 61.2%, 강소형성 난포의 비율은 20.2%, 황체의 비율은 18.6%로 PMSG 만을 투여한 군과 비교해 볼 때 강소형성 난포와 황체의 비율은 줄어드는 반면 강소형성전 난포의 비율은 증가하는 것으로 나타났다. 반면 PMSG

와 GnRH-Ag을 함께 투여한 군에서는 강소형성전 난포 비율은 50.4%, 강소형성 난포의 비율은 12.1%, 황체의 비율은 37.6%로 황체의 비율이 크게 증가하는 반면 강소형성 난포의 비율은 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2B).

3. 난포 세포의 세포자연사 확인

세포자연사는 난소내 일부 황체 세포와 과립 세포에서 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 난소내 난포에서 세포자연사를 조사한 결과 PMSG만을 투여한 경우 강소형성전 난포 중 1.6%, 강소형성 난포 중에 9.7%, 황체 중에 41.5%에서 세포자연사가 일어난 것을 확인할 수 있었다. GnRH-Ag와 PMSG를 함께 투여한 군에서는 강소형성전 난포 중 2.1%, 강소형성 난포 중에 23.5%, 황체 중에 52.83%에서 세포자연사가 일어났다. 반면, GnRH-Ag만을 투여한 실험군에서는 강소형성전 난포 중 6.2%, 강소형성 난포 중에 41.8%, 황체 중에 79.41%에서 세포자연사가 일어났다. 이상의 결과에서 세포자연사가 일어난 강소형성 난포와 황체의 수는 PMSG만을 투여한 군과 비교해 볼 때 GnRH-Ag만 투여한 군에서는 증가하나 GnRH-Ag와 PMSG를 함께 투여한 군에서 다시 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B).

A.



B.

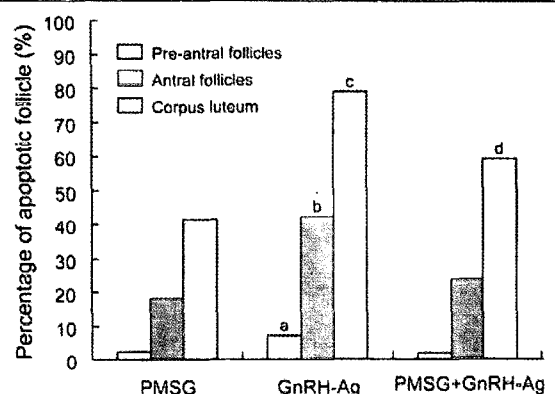


Fig. 3. Representative ovarian tissues stained by using TUNEL method(A) and percentage of apoptotic follicles(B). For evaluation of apoptotic follicles in the ovary, sectioned ovaries were stained by TUNEL and then the number of deep brown colored follicles (arrow heads) were counted in each experiment group ($n=5$). a, b, c, and d indicate a significant difference between PMSG and GnRH-Ag or PMSG+GnRH-Ag treatment groups ($p < 0.05$). Original magnification, $\times 20$.

4. 혈액내 E₂와 P₄의 농도 변화

혈청내 E₂와 P₄의 농도를 측정한 결과 PMSG 투여 48시간 후 혈청내 E₂ 농도는 PMSG 투여군에서 26.92±3.19pg/ml, PMSG+GnRH-Ag 투여군에서 25.34±1.78pg/ml, GnRH-Ag 투여군에서 12.44±1.32pg/ml으로 GnRH-Ag만을 투여한 군에서 유의하게 감소하였다. 반면 혈청내 P₄의 농도는 PMSG 투여군에서 15.18±5.75ng/ml, PMSG+GnRH-Ag 투여군에서 7.91±1.99 ng/ml, GnRH-Ag 투여군에서 1.81±0.48ng/ml으로 PMSG만을 투여한 군에 비하여 GnRH-Ag와 PMSG를 함께 투여한 군에서 유의하게 감소하는 것을 알 수 있었고, 특히 GnRH-Ag만을 투여한 군에서 P₄의 농도는 기저 수준으로 떨어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

체의 수정 및 배아 이식 시술에 있어서 안정된 과배란 유

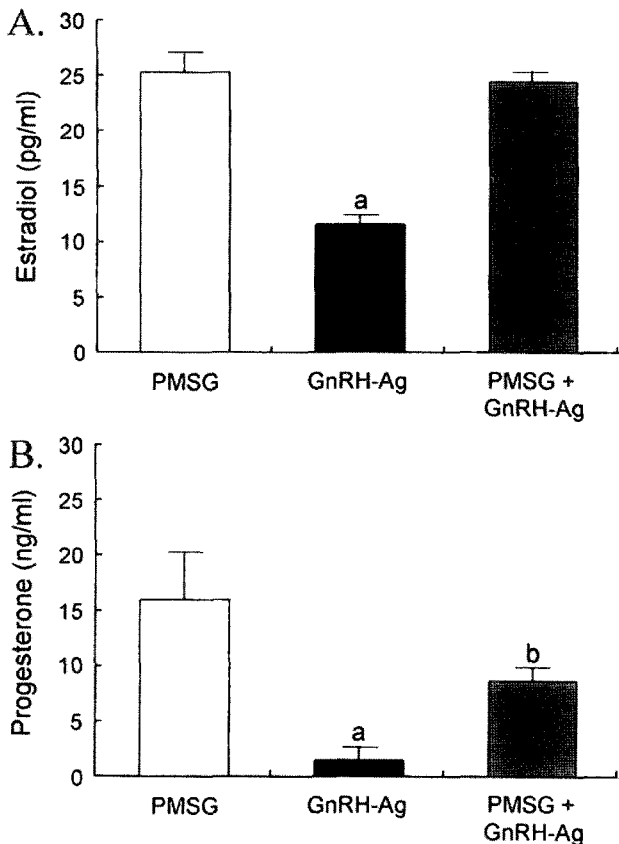


Fig. 4. Effects of PMSG and GnRH-Ag on estradiol and progesterone concentration in serum. Serum was collected from mice treated with GnRH-Ag or saline 48h after PMSG injection. Estradiol and progesterone levels were measured by radioimmunoassay. a and b indicate significant difference(p<0.05).

도를 위해 투여하고 있는 다량의 GnRH-Ag가 난소에 직접 또는 간접적으로 작용하여 난소의 기능을 억제시킬 수 있는 것으로 추측되어 왔으나 아직 그 정확한 기전은 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구는 생쥐를 대상으로 사람 과배란 유도 방법과 비슷한 조건으로 PMSG와 GnRH-Ag를 투여한 후 생쥐 난소에 미치는 영향을 알아보았다.

먼저 GnRH-Ag가 생쥐 난소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 GnRH-Ag 투여 후 난소의 무게를 측정하고 난소내 세포자연사를 확인하였다. 실험 결과 PMSG만을 처리한 군에 비하여 GnRH-Ag만을 투여한 경우 난소의 무게는 유의하게 감소하였고 난포내 세포자연사가 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 한편 GnRH-Ag와 PMSG를 함께 투여한 경우 난소 조직에서 세포자연사가 감소하고 난소 무게도 다시 회복되는 것을 알 수 있었다. 난소내 난포의 분포를 분석한 결과에서도 GnRH-Ag만을 투여한 군에서 강소형성전 난포의 비율이 증가한 반면, 강소형성 난포 및 황체의 비율은 감소한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 다량의 GnRH-Ag 투여가 뇌하수체의 기능을 방해하여 성선자극호르몬의 분비를 억제시키고, 이로 인하여 난소내 난포의 발달이 억제되었기 때문으로 보인다.

한편 투여된 GnRH-Ag가 직접적으로 또는 간접적으로 난소내 세포자연사를 유발시켰는지는 불분명하지만, GnRH-Ag에 의한 난소내 세포자연사 유발 효과는 PMSG를 함께 투여해 줌으로써 억제됨을 알 수 있었다. 현재 세포자연사를 유발시킬 수 있는 많은 요소들이 밝혀지고 있으며, 이러한 요소들 중 일부는 난포액 내에 존재하는 것으로 보고되고 있다 (Billig et al., 1993; Gorospe & Spangelo, 1993; Quirk et al., 1995). 특히, GnRH와 그 수용체가 포유동물 난소내에 존재한다는 것이 밝혀지면서 (Clayton & Catt, 1981; Leung et al., 1989; Peng et al., 1994), 난소내 세포들의 생리적 변화와 난자의 성장 및 배란에 영향을 미칠 수 있다는 것이 알려지고 있으며 (Clark 1991; Dekel et al., 1983; Pellicer et al., 1992), 최근에 과립 세포 및 황체화 세포의 세포자연사를 직접 유발시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다 (Yang et al., 2003).

반면 FSH는 난포 폐쇄(atresia)를 억제시키는 중요한 생존 요소으로써 흰쥐의 뇌하수체를 제거하거나 성선자극호르몬에 대한 항체를 투입한 경우 난포의 폐쇄가 유도되는 것을 확인할 수 있었다 (Terranova, 1981; Bill & Greenwald, 1981). 또한 뇌하수체를 제거한 미성숙 흰쥐에 FSH를 투여한 후 난소를 적출하여 DNA 분절화 양상을 조사한 결과, 뇌하수체를 제거한 실험군에 비해 분절화 현상이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Billig et al., 1994). 한편 배란전 난포를 배양

하면서 DNA 분절화 양상을 조사한 결과, FSH를 처리하지 않은 난포에서는 시간이 흐름에 따라 자발적으로 일어나는 DNA 분절화 현상이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, FSH를 처리한 난포에서는 DNA 분절화가 억제되는 것으로 보고하고 있다(Chun et al., 1994).

혈청내 E₂와 P₄의 농도를 측정된 결과 GnRH-Ag만을 투여한 군에서 E₂와 P₄의 농도가 모두 유의하게 감소하였다. 이는 Broekmans 등(1996)과 Billig 등(1994)이 발표한 바와 같이 GnRH-Ag를 주입하면 혈청내 E₂의 농도가 유의하게 감소된다는 논문과 같은 결과인 것을 확인할 수 있었다. 한편, GnRH-Ag와 PMSG를 함께 투여해 줌으로써 E₂의 농도는 완전히 회복되어 PMSG만을 투여한 군과 같은 수준으로 증가한 반면, P₄의 농도는 PMSG를 함께 투여했음에도 불구하고 회복하지 못하고 유의하게 감소한 것을 알 수 있었다. 이러한 난소내 steroidogenesis의 변화는 다량의 GnRH-Ag가 뇌하수체에 작용하여 탈감각 반응을 일으켜 성선자극호르몬의 방출을 억제함으로써 난소에 steroidogenesis를 간접적으로 억제시키는 효과로 설명할 수 있으나, 다른 한편으로 다량의 GnRH-Ag가 난소에 직접적으로 작용한 결과로 설명할 수 있다. 이러한 직접적인 효과를 뒷받침하는 연구 결과들로서 뇌하수체가 절제된 미성숙 흰쥐에 GnRH-Ag를 처리하면 FSH에 의해 자극되는 E₂, P₄, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 합성과 LH 및 prolactin 수용체의 합성이 억제되며(Tureck et al., 1982; Polan et al., 1984; Birnbaumer et al., 1985), 사람의 배양된 과립 세포와 황체화 세포에서도 GnRH-Ag를 처리하면 LH 또는 hCG의 작용이 억제되는 것으로 보고하고 있다(Massicote et al., 1981). 한편 흰쥐에서 시행한 실험에서 GnRH는 P₄의 대사에 관여하는 효소인 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase의 활성화를 촉진한다는 보고가 있었고(Srivastava et al., 1994), 이러한 GnRH에 의한 효소의 변화가 분비된 P₄의 양은 감소시키고 대신 20 α -hydroxyprogesterone 양을 증가시키는 것으로 설명하고 있다. 또한 흰쥐에서 P₄₅₀ side chain cleavage(P₄₅₀ scc) 효소의 mRNA 발현 감소가 P₄의 합성을 억제한다고 보고하였다(Smith et al., 1989). 다른 한편으로 배양된 황체세포에서 GnRH-Ag에 의한 P₄ 합성 감소는 NO 생성의 감소로 인한 PBR과 StAR 단백질의 감소 때문으로 설명할 수 있다(Yang et al., 2003). PBR 단백질은 미토콘드리아에 존재하는 단백질로서 미토콘드리아 막을 통한 cholesterol 이동과 연관이 있는 것으로 알려지고 있다(Papadopoulos et al., 1997). StAR 또한 cholesterol을 미토콘드리아 외막까지 이동시키면서 스테로이드 호르몬 합성에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Stocco et al., 1997; Wang et al., 1998). 이미 peri-

pheral benzodiazepin receptor(PBR)과 steroidogenic acute regulatory(StAR) 단백질은 황체내에 존재하는 것으로 밝혀져 있으며, GnRH-Ag에 의한 이러한 단백질의 감소가 난소의 스테로이드 호르몬 합성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 보고하고 있다(Sridaran et al., 1999). 이러한 결과로 미루어 보아, GnRH-Ag에 의한 P₄ 합성의 감소는 cholesterol 이동에 관여하는 PBR과 StAR 단백질의 합성 또는 활성이 감소하기 때문으로 설명할 수 있다.

본 연구 결과를 종합하여 볼 때 GnRH-Ag의 장기 투여가 뇌하수체의 기능을 방해하여 성선자극 호르몬의 분비를 억제시키고, 이로 인하여 난소의 발달이 저해되어 부피와 무게가 감소된 것으로 보인다. 그러나 투여된 GnRH-Ag가 난소내 세포들의 세포자연사에 직접적으로 작용한 결과인지는 불분명하지만, GnRH-Ag에 의해 유도된 난소내 세포자연사 효과는 PMSG를 함께 투여해 줌으로써 그 효과가 억제됨을 알 수 있었다. E₂의 생성 또한 PMSG를 함께 투여해 줌으로써 GnRH-Ag에 의해 감소되었던 농도가 다시 회복되는 것을 알 수 있었으나, P₄의 생성은 완전히 회복되지 못하는 결과를 보여주었다. 이러한 결과는 사람 체외수정 및 배아 이식 시술에 있어서 과배란 유도 과정에서 다량으로 사용한 GnRH-Ag가 회수된 난자의 상태에는 큰 영향을 미치지 못하는 못하나, 황체기에 P₄ 생성에 감소를 가져와 황체기 결함을 유발시키고 또한 자궁 내막 발달을 억제시킴으로써 착상률을 저하시킬 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 과배란 유도 과정중 GnRH-Ag를 투여한 환자에서는 자궁 내막을 착상에 알맞은 상태로 유지하기 위한 방법으로 GnRH-Ag를 사용하지 않은 환자에서보다 많은 P₄을 배아이식 후 투여해 줌으로써 황체기 결함을 보다 적극적으로 보완해야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Andrews WV, Maurer R, Conn PM (1988) Stimulation of rat luteinizing hormone β -messenger RNA levels by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 263:13755-13761.
- Bill CH, Greenwald GS (1981) Acute gonadotropin deprivation. I. A model for the study of follicular atresia. *Biol Reprod* 24:913-921.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133:2204-12.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW (1994) Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat

- ovary:biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134: 245-252.
- Bimbaumer L, Shahabi N, Rivier J, Vale W (1985) Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. *Endocrinology* 116:1367-1370.
- Broekmans FJ, Hompes PGA, Lambalk CB, Schoute E, Broeders A, Schoemaker J (1996) Short term pituitary desensitization: effects of different doses of the gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin. *Hum Reprod* 11:55-60.
- Clark PGH (1991) Developmental cell death:morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181:195-213.
- Clayton RN, Catt KJ (1981) Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 2:186-209.
- Chun SY, Billig H, Tilly J, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJW (1994) Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogeneous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135:1845-1853.
- Dekel N, Sherizyl I, Tsafiriri A, Naor Z (1983) A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and a gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. *Bio Reprod* 28:161-166.
- Fraser HM (1982) New prospects for luteinising hormone releasing hormone as a contraceptive and therapeutic agent. *Br Med J* 285:990-991.
- Gorospe WC, Spangelo BL (1993) Interleukin-6 production by rat granulosa cells *in vitro*: effects of cytokines, follicle-stimulating hormone, and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biol Reprod* 48:538-543.
- Herman A, Ron-Ei R, Golan A, Soffer Y, Caspi E (1990) Pregnancy rate and ovarian hyperstimulation after luteal human chorionic gonadotropin in *in vitro* fertilization stimulated with gonadotropin-releasing hormone analog and menotropins. *Fertil Steril* 53:92-96.
- Kalra SP (1986) Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion: a model for the preovulatory LH release. In: Ganong WF, Martini L (eds) *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York Vol 9:31.
- Leung PCK, Wang J, Baimbridge KG (1989) Mechanism of action of luteinizing hormone-releasing hormone in rat ovarian cells. *Can J Physiol Pharmacol* 67:962-967.
- Meldrum DR, Chang RJ, Lu J, Vale W, Rivier J, Judd HL (1982) "Medical oophorectomy" using a long-acting GNRH agonist-a possible new approach to the treatment of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1081-1083.
- Maclachlan V, Besanko M, O'Shea F, Wade H, Wood C, Trounson A, Healy DL (1989) A controlled study of luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) for the induction of Folliculogenesis before *in vitro* fertilization. *N Engl J Med* 320:1233-1237.
- Ma F, Leung PCK (1985) Luteinizing hormone-releasing hormone enhances polyphosphoinositide breakdown in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 130:1201-1208.
- Martin MC (1989) Gonadotropin releasing hormone agonists and the induction or augmentation of ovulation. *J Reprod Med* 34:1034-1038.
- Massicote J, Borgus JP, Lachance R, Labrie F (1981) Inhibition of hCG-induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in rat luteal cells by an LHRH agonist. *J Steroid Biochem* 14:239-242.
- Naor A, Yavin E (1982) Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipid labeling in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 111:1615-1619.
- Pellicer A, Tarin JJ, Miro F, Sampaio M, Santos MJ, Remohi J (1992) The use of gonadotropin releasing-hormone analogues(GnRHa), in *in-vitro* fertilization: some clinical and experimental investigations of a direct effect on the human ovary. *Human Reprod* 7:39-47.
- Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversa JL, Bernassau JM, Drieu K (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62:21-8.
- Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen, Leung PCK (1994) Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa luteal cells. *Endocrinology* 135:1740-1746.
- Polan ML, Laufer N, Dlugi AM, Tarlakis BC, Haseltine FP, DeCerny AH, Behrman HR (1984) Human chorionic gonadotropin and prolactin modulation of early luteal function

- and luteinizing hormone receptor-binding activity in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 59:773-779.
- Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson KP (1995) Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol Reprod* 52:279-287.
- Smith CJ, Greer TB, Banks TW, Sridaran R (1989) The responses of large and small luteal cells from the pregnant rat to substrates and secretagogues. *Biol reprod* 41:1123-1132.
- Smitz J, Ron-Ei R, Tarlatzis BC (1992) The use of gonadotropin releasing hormone agonists for *in vitro* fertilization and other assisted procreation techniques: experience from three centres. *Human Reprod* 7:49-66.
- Sridaran R, Philip GH, Li H, Culty M, Liu Z, Stocco DM, Papadopoulos V (1999) GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J Mol Endocrinology* 22:45-54.
- Srivastava RK, Luu-The V, Marrone BL, Harris-Hooker S, Sridaran R (1994) Inhibition of steroidogenesis by luteal cells of early pregnancy in the rat in response to *in vitro* administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49:73-79.
- Stocco DM, Clack BJ (1997) The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 62:29-36.
- Tureck RW, Mastroianni L, Blasco L, Strauss JF (1982) Inhibition of human granulosa cell progesterone secretion by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1078-1080.
- Terranova PF (1981) Steroidogenesis in experimentally induced atretic follicles of the hamster: a shift from estradiol to progesterone synthesis. *Endocrinology* 108:1885-1890.
- Wang X, Liu Z, Eimerl S, Timberg R, Weiss AM, Orly J, Stocco DM (1998) Effect of truncated forms of the steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transport. *Endocrinology* 139:3903-3912.
- Wierman ME, Rivier JE, Wang C (1989) Gonadotropin-releasing hormone-dependent regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the rat. *Endocrinology* 124:272-278.
- Yang H, Bhat GK, Wadley R, Wright KL, Chung BM, Whittaker JA, Dharmarajan AM, Sridaran R (2003) Gonadotropin-releasing hormone-agonist inhibits synthesis of nitric oxide and steroidogenesis by luteal cells in the pregnant rat. *Biol Reprod* 68:2222-2231.