

생쥐 신생자 난소내 생식 세포에서 세포 사멸 관련 단백질의 발현

조동제 · 박철홍¹ · 양현원² · 박주현 · 윤정미 · 김세광[†] · 윤용달¹

연세의대 산부인과학교실, ¹한양대학교 생명과학과, ²을지의과대학교 생명과학연구소

Expression of Apoptosis-Related Proteins on Germ Cells in Neonatal Mouse Ovary

Dong-Jae Cho, Cheol-Hong Park¹, Hyunwon Yang², Joo-Hyun Park, Jeong-Mi Yun, Sei-Kwang Kim[†] and Yong-Dal Yoon¹

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

¹Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

²Life Science Institute, Eulji University School of Medicine, Seoul, 139-711, Korea

ABSTRACT : To investigate the mechanism of germ cell death in postnatal stage of mouse, the involvement of apoptotic executioners, caspase-3 and caspase-activated DNase(CAD), and apoptotic initiators, Bax, Fas and Fas ligand, in the germ cell death has been studied. Immuno-labels of active caspase-3 and CAD were located in TUNEL-positive, apoptotic, oocytes as well as normal oocytes of primary or secondary follicles. CAD immuno-labels were also detected in the nucleus of TUNEL-positive oocytes. Most of oocytes showing positive immuno-labeling of active caspase-3 or CAD had vacuoles in their cytoplasm, which is the morphological characteristic of oocyte during follicular atresia. Bax immuno-stains were detected in the atretic oocytes which showed the vacuole in their cytoplasm. Positive immuno-labels for Fas ligand was localized in TUNEL-positive or atretic oocytes. Presence of immunoreactivity of active caspase-3 and CAD in TUNEL-positive germ cells implicate that active caspase-3 and CAD might play a role in germ cell apoptosis during early development of mouse ovarian follicle. Immunohistochemical localization of Bax and Fas ligand in TUNEL-positive oocytes suggests that these might be the most plausible modulator of oocyte apoptosis.

Key words : Bax, CAD, Caspase-3, Fas/Fas ligand, Germ cell, Neonatal mouse ovary.

요 약 : 생쥐 신생자 시기에 생식 세포의 사멸 기전을 알아보기 위하여 세포 사멸을 보이는 생식 세포에서 세포 사멸 관련 단백질인 caspase-3, caspase-activated DNase(CAD), Bax 및 Fas/Fas ligand의 발현을 조사하였다. 활성화된 caspase-3와 CAD의 면역화학적 염색 결과 일차 및 이차 난포내 TUNEL 양성을 보이는 세포 사멸 난자에서 발현되는 것을 관찰하였다. CAD 또한 TUNEL 양성을 보이는 세포 사멸 난자에서 염색되었다. 활성화된 caspase-3와 CAD에 양성을 보이는 대부분의 난자들은 폐쇄의 형태학적 특징이라고 할 수 있는 세포질 내 공포가 관찰되었다. Bax는 세포질 내 공포가 존재하는 세포 사멸된 난자에서 염색되었다. Fas ligand 또한 TUNEL 양성을 보이는 난자에서 염색되었다. 이러한 TUNEL 양성을 보이는 생식 세포에서 활성화된 caspase-3와 CAD가 염색된 결과는 생쥐 난포 발달 초기 단계에 caspase-3와 CAD가 생식 세포의 세포사멸에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 보여주고 있다. 또한 TUNEL 양성을 보이는 난자에서 Bax와 Fas ligand가 발현된 결과는 이러한 단백질이 난자의 세포 사멸을 조절하는 요소로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

서 론

최근 10여년간 세포사멸에 관한 연구가 급진전되면서 생식소 내 생식세포 및 난포세포의 퇴화 즉 폐쇄(atresia)의 원

인이 세포사멸이라는 가설이 대두되었다. 난자의 사멸은 난포의 폐쇄를 거쳐 간접적으로 소멸된다고 알려져 있으나 그 기전은 아직 불명확하다. 최근 세포사멸을 분석하는 연구 방법이 크게 발달하였으나, 아직도 생식세포의 사멸 기전은 생식 주기 리듬에 따른 급속한 변화, 실험 재료의 제한 등으로 연구가 활발하지 못한 실정이다. 그럼에도 불구하고 난자의 세포사멸은 세포사멸 조절 유전자 군의 활성화가 주원인이라는 가설이 지배적이다.

척추동물의 Bcl-2계 단백질은 적어도 16개 이상이 알려져 있으며, 항세포사멸인자(anti-apoptotic factor; e.g. Bcl-2, Bcl-

* 본 논문은 2002학년도 연세대학교 의과대학 일반교수 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

[†]교신저자: 서울 서대문구 신촌동 134, 연세의대 산부인과학교실.
(우) 120-752, (전) 02-361-5499, (팩) 02-313-8357, E-mail: skkim@yumc.yonsei.ac.kr

xL, Bcl-w)과 항세포사멸인자(pro-apoptotic factor; e.g. Bax, Bcl-xS, Bad, Bak, Bid, Bik/Blk, Bim)로 나뉘어진다. Bcl-2는 세포사멸 마지막 단계의 활성을 조절하면서 세포사멸을 억제하는 것으로 알려지고 있으며, 과발현되면 종양이 유발되기도 한다(Ratts et al., 1995). Bcl-xL도 Bcl-2와 같은 기능을 나타내는 반면 Bax는 세포가 세포사멸 자극에 노출시 세포질에서 미토콘드리아로 이동 후(Wolter et al., 1997; Gross et al., 1998) cytochrome c 분비를 촉진시키면서 cystein aspartic acid-specific proteases(caspase)를 활성화시켜 세포를 파괴시킨다(Jurgensmeier et al., 1998; Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999). Bid 또한 세포사멸 자극에 노출시 절단된 형태로 쪼개져 미토콘드리아로 삽입된 후(Gross et al., 1999; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997) caspase를 활성화시켜 세포사멸을 유도한다(Cryns & Yuan, 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998). 미토콘드리아에서 cytochrome c 방출은 apoptotic protease-activating factors(Apaf)-1의 형태적 변화를 유발한다. 이때 Apaf-1은 procaspase-9과 결합하면서 procaspase-9을 활성화시킨다(Srinivasula et al., 1998). 활성화된 caspase-9은 다른 caspase의 연속적인 활성을 유도하고 단백질 가수분해 cascade를 시작한다(Green, 1998).

Caspase는 다양한 동물 중에서 세포사멸의 일차적인 시발자로 간주되고 있다(Thorberry & Lazebnik, 1998). 여러 종의 caspase계 단백질들이 설치류 난자에서 발견되는 것으로 알려져 있다(Bergeron et al., 1998; Jurisicova et al., 1998). 유전적으로 caspase-2가 결여되어 있는 암컷 생쥐 난소에는 다량의 원시 난포들이 난자를 가지고 있다는 점에서 caspase계 단백질들이 발생동안 다양한 시기에 일어나는 난자 손실을 실행 단계에서 조절한다고 가정되고 있다(Bergeron et al., 1998). 생쥐의 태자 난소를 *in vitro*에서 배양할 때 혈청을 제거하면 생식세포의 세포사멸이 일어나게 된다. 이런 *in vitro* 배양액 안에서 caspase 억제자를 첨가하면 세포사멸이 중지된다(Morita et al., 1999). 또한 배양된 생쥐 태자 난소의 난원세포와 난자에서 single-cell caspase activity assay를 실시해 보면 세포사멸이 일어날 때 caspase 활성이 일어난다(Morita et al., 1999). 그러나 최후동물의 난자 형성 동안 일어나는 생식세포 사멸에서 caspase계 단백질의 역할은 거의 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 생쥐 난소 내 초기 난포 형성과정에 발생하는 생식세포의 사멸현상에 관여하는 여러 조절자들의 발현 여부를 면역조직화학법과 TUNEL 염색을 통하여 확인함으로써 초기 난포 폐쇄 기전을 규명하고자 한다. 아울러 신생아 시기의 난포 형성 과정 중 발생하는 생식세포의 세포

사멸이 caspase계 단백질에 의해 유도되는지 여부와 이 실행 단계를 유도하는 신호로서 어떤 세포사멸 조절인자가 관여하고 있는지 확인함으로써 난포 형성 과정에서 발생하는 난자의 세포 사멸 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 난소 적출

본 실험에서는 샴타코 실험동물 사육장에서 공급받은 8주령 ICR 생쥐를 사용하였다. 공급후 14시간/10시간(명/암) 조명 조건에서 3~4일간 적응시키고, 먹이와 물을 충분히 공급하여 실험에 사용하였다. 충분히 성숙된 암컷을 수컷과 합사시킨 후 임신된 쥐가 출산한 날을 1일로 하여 출생후 7일째 경추 도살한 후 난소를 적출하였다.

2. 조직학적 준비

준비된 난소 조직 박편을 10% neutral buffered formalin (NBF)에 고정한 다음 알코올 처리 과정을 거쳐 탈수시키고, xylene에 투명화시킨 후 파라핀(Paraplast, Monoject)을 침투시켜 포매시켰다. 그런 다음 박편 절단기(Microtome, Lipshaw)를 사용하여 5 μ m 두께로 박편을 만들었다. 슬라이드에 올린 박편을 건조시킨 후 다음 과정까지 슬라이드 박스에 보관하였다.

3. TUNEL 방법에 의한 생식세포의 세포 사멸 판정

준비된 난소 조직 슬라이드는 *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag kit, PharMingen)를 사용하여 난자의 세포 사멸 여부를 확인하였다. 먼저 조직 슬라이드는 xylene 과정을 통해 paraffin을 제거하고, 알코올 과정을 거쳐 물로 세척한 후 phosphate buffered saline(PBS, Gibco)으로 세척하였다. 세포에 존재하는 endogenous peroxidase를 불활성화시키기 위하여 3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 상온에서 30 분간 처리한 후, ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 15 분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme(TdT)을 첨가하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 반응 정지 완충용액을 상온에서 30 분간 처리한 후 Tris buffer(pH 7.6)로 3회 세척하였다. 그런 다음 anti-digoxigenin-peroxidase로 37°C에서 30분간 반응시킨 후 Tris buffer로 세척하고 3,3'-diaminobenzidine(DAB, 0.1% in PBS;

Research Genetics)으로 10 분간 발색시켜 검경하였다.

4. Caspase-3, CAD, Bax 및 Fas/Fas ligand의 면역조직 화학적 관찰

먼저 조직 슬라이드는 xylene 과정을 통해 파라핀을 제거하고, 알코올 과정을 거쳐 물로 세척한 후 PBS로 세척하였다. 준비된 슬라이드를 증류수로 씻어낸 후 0.5M NH₄Cl을 포함한 Tris buffer를 통하여 quenching시켰다. 이 과정이 끝나면 Tris buffer에 2 분간 4 번 세척하고 1% BSA와 반응시켜 4°C에서 14 시간 정도 방치하여 endogenous background를 block시켰다. Caspase-3, CAD, Bax, 및 Fas/Fas ligand에 대한 일차 항체 용액을 슬라이드에 올리고 조직이 마르지 않도록 실온의 습윤 상자에서 2 시간 동안 반응시킨 후 슬라이드를 Tris buffer로 5 분간 3 회 세척하고 BSA를 포함한 Tris buffer에 5 분간 반응시켰다. 이차항체를 Tris buffer에 1:500으로 희석하여 조직에 충분히 도포한 후 37°C의 습윤상자 안에서 1 시간 동안 반응시킨 다음 Tris buffer로 5 분간 3 회 세척하였다. DAB로 10 분간 발색시킨 후 슬라이드를 증류수로 2 회 세척하고 Mayer's hematoxylin으로 2 분간 대조염색을 실시하였다. 탈수를 마친 슬라이드는 xylene으로 투명화시키고 Canada balsam으로 봉입하여 영구표본을 제작하였으며 염색이 끝난 슬라이드는 광학현미경하에서 400 배로 관찰하였다.

결 과

1. 생쥐 신생자 난소의 발달에 따른 조직학적 변화

신생자 생쥐 난소에는 출생 후 중양에서부터 원시난포(primordial follicle)들이 형성되기 시작하여 7 일째에 이르러 난소에는 2-3 층의 난포세포들로 둘러싸인 비교적 큰 이차난포(secondary follicle)들이 형성되어 있었다. 난소의 가장자리에는 주로 원시난포들이 존재하였다(Fig. 1).

2. TUNEL 방법에 의한 생식세포의 세포사멸 판정

파라핀 박편으로 준비된 생후 7 일째 신생자 생쥐 난소를 재료로 TUNEL 방법에 의해 생식세포의 세포 사멸 여부를 확인하였다. 출생전에 비해 출생후 2 일째 신생자 난소에서는 몇 개의 세포에서 진한 갈색을 보일 뿐 뚜렷한 반응이 없었다. 그러나 7 일자 신생자 난소에서는 정상 난포의 과립세포에서 전부 음성반응을 보였으며, 퇴화난포의 과립세포에서는 강

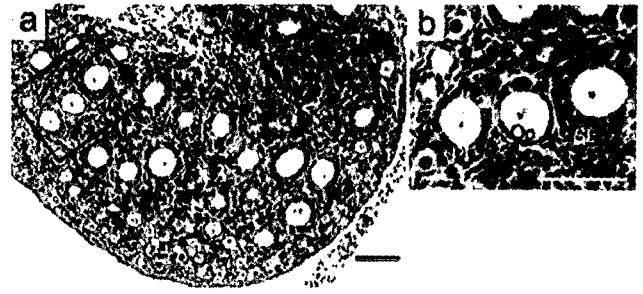


Fig. 1. Microphotographs of the ovary in the neonatal mouse at 7 days post partum. The ovaries were fixed with 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin. The tissues were stained with hematoxylin-eosin. Panel b is the magnified image of square grid(black) in panel a. PF; primary follicle, SF; secondary follicle, Oo; oocyte. Bar=50 μ m.

한 갈색의 양성반응이 나타났다. 그리고 난포내 난자 주변부, 즉 난포 중앙의 과립세포는 강한 양성반응이 나타났고 비교적 초기의 성장 난포보다는 난포가 성장한 이후 즉 비교적 큰 난포에서 많은 반응이 나타나 DNA 분절화 현상이 많이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2, 3).

3. Caspase-3, CAD, Bax 및 Fas/Fas ligand의 면역조직 화학적 관찰

활성적 caspase-3는 일차 및 이차 난포에서 TUNEL에 대해 양성을 보이는 난자에서 공통적으로 관찰되었으나 일부 음성 난자에서도 갈색 반응을 보였다. 그러나 이렇게 활성적 caspase-3에 양성을 보이는 난자의 경우 막을 따라 세포 안 쪽으로 여러 형태와 크기의 액포를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2 a,b).

CAD의 경우도 활성적 caspase-3와 마찬가지로 일차 및 이차 난포에서 TUNEL에 대해 양성을 보이는 난자에서 공통적으로 관찰되었다. 이 경우 TUNEL labeling에 의해 염색된 핵 부분은 균일하지 않고 부분적으로 주변화되는 특징을 나타냈다. 그러나 일부 TUNEL에 양성을 보이지 않는 음성 난자에서도 갈색 반응을 보였는데, 이렇게 CAD에 양성을 보이는 난자도 활성적 caspase-3 경우와 마찬가지로 막을 따라 세포 안 쪽으로 여러 형태와 크기의 액포를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며 난자의 외형도 정상적인 원형의 형태에서 타원형으로 일부 변형된 것을 관찰할 수 있었다. 일부에서는 CAD 면역반응이 핵 내에서 관찰되기도 하였다(Fig. 2 c,d).

Bcl-2 가계 일원인 Bax의 경우 일차 및 이차 난포에서 TUNEL에 대해 양성을 보이는 난자에서 공통적으로 관찰되

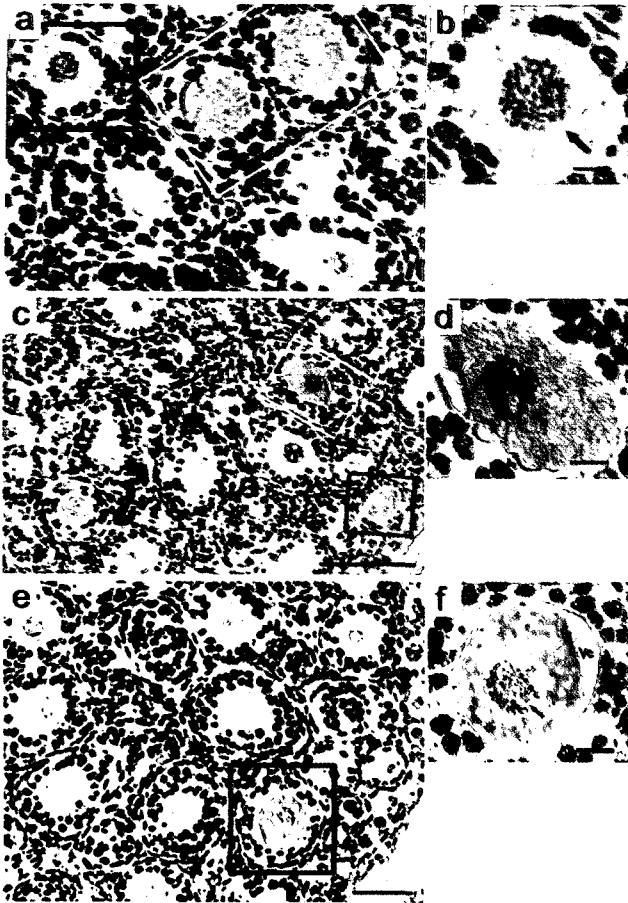


Fig. 2. Co-localization of TUNEL staining(a-f) and active caspase-3 (a, b), CAD(c, d), and Bax(e, f) immunolabeling in the ovary of the neonatal mouse at 7 days post partum. The ovaries were fixed with 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin. The tissues were counter stained with methyl green. Panel b, d, and f are the magnified images of square grids in panel a (black), c (white), and e (black), respectively. Black arrows indicate the nucleus of TUNEL positive oocytes. Deep brown cytoplasm in oocytes indicates active caspase-3, CAD, and Bax immuno-reactivity. Vc; vacuole. Bar=10 μ m.

었으나 염색성의 정도가 뚜렷하지 않았다(Fig. 2 e,f).

Fas 면역 표지의 경우 염색성이 주로 세포막을 경계로 내외부에 존재하였으나 일부 세포질에 폭 넓게 분포하는 경우도 관찰되었다. 이렇게 Fas에 양성을 보이는 난자는 세포막을 따라 세포 안 쪽으로 여러 형태와 크기의 액포를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며 난자 핵이 세포질의 한 쪽으로 치우쳐 정상적인 형태에서 일부 변형된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3 a,b).

Fas ligand 면역 표지의 경우, 강한 갈색의 염색성이 주로 TUNEL 양성 세포에서 내부에 폭 넓게 존재하였다. 이렇게 Fas ligand에 양성을 보이는 난자는 세포막을 따라 세포 안

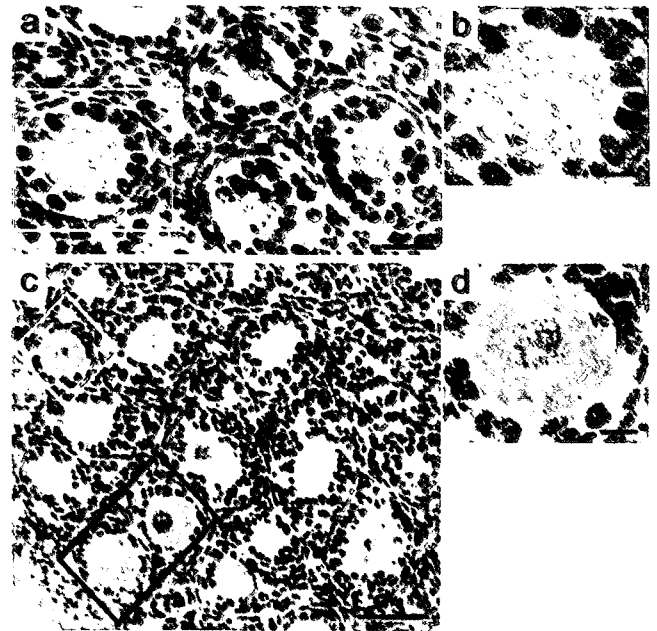


Fig. 3. Co-localization of TUNEL staining(a-d) and Fas(a, b) and Fas ligand(c, d) immunolabeling in the ovary of the neonatal mouse at 7 days post partum. The ovaries were fixed with 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin. The tissues were counter stained with methyl green. Panel b and d are the magnified images of square grids in panel a (white) and c (white), respectively. Black arrow indicates the nucleus of TUNEL positive oocytes. Deep brown cytoplasm in oocytes indicates Fas and Fas ligand immuno-reactivity. Vc; vacuole. Bar=10 μ m.

쪽으로 여러 형태와 크기의 액포를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며 난자 핵이 세포질의 한 쪽으로 약간 치우쳐 정상적인 형태에서 일부 변형된 것을 관찰할 수 있었으며 핵 내 염색질의 분절화가 관찰되었다(Fig. 3 c,d).

고찰

대부분의 척추동물 중에서 암컷의 생식세포가 일생동안 사멸에 의해 고갈되는 현상은 근본적으로 세포 사멸 기작에 의한 것으로 알려져 있다. 생식세포 소멸 과정은 난포의 발달과정 중 어느 단계에서나 일어날 수 있으며, 난포의 분화 정도에 따라 조절 기작이 다르기 때문에 그 시작과 이후 진행되는 일련의 기작에 대해서는 아직 명확히 규명되지 않고 있다. 현재 여러 세포 유형에 있어 세포 사멸에 대한 연구는 폭 넓게 진행되어 세포 사멸에 영향을 미치는 다양한 인자들이 규명되었다. 그러나 이러한 인자들이 생식세포의 사멸에도 동일하게 작용하는 지 또한 난자의 성숙과 관련된 난포 형성 단계에 따른 생식 세포의 사멸 기작에 대한 연구는 아

직까지 미비한 실정이다.

본 연구는 생쥐 신생자 생식세포 사멸이 활발하게 일어나는 것으로 보고된(Song, 1998) 생후 7일째의 난소에서 생식세포 내 세포사멸 과정에 세포사멸 조절인자들의 관련 여부를 확인하고자 하였다. 생후 7 일째 생쥐 난소내에서 활발하게 나타나는 생식세포의 사멸 현상이 여러 항세포 사멸인자들에 의해 동일하게 조절되는 지를 알아보기 위하여 TUNEL 염색을 통하여 세포 사멸 여부를 확인한 결과 7 일자 신생자 난소에서는 정상 난포의 과립 세포에서 전부 음성반응을 보였으며, 퇴화 난포의 과립 세포에서는 강한 갈색의 양성 반응이 나타나는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 폐쇄가 일어난 난포내 난자의 퇴화 현상이 세포 사멸에 의한 것임을 의미한다. 그리고 난자 주변부, 즉 난구세포에 강한 양성 반응이 나타났고 비교적 초기의 성장 난포보다는 난포가 성장한 이후 즉 비교적 큰 난포에서 많은 반응이 나타나는 것으로 보아 DNA 분절화 현상이 난포의 성장에 따라 달라짐을 의미한다고 볼 수 있다. 세포 사멸 과정은 난소와 자궁 등 생식기관을 포함하는 다양한 장기에서, 그리고 발생 과정의 여러 단계에서 관찰되는 일반적인 현상으로, 특히 난소의 경우 그 발생 및 주기적 변화에 필수적인 과정이라 할 수 있다. 따라서 이 시기에 일어나는 생식세포 내 세포 사멸은 난소의 발생과 생식세포의 발달에 필수적인 과정으로 생각할 수 있다.

활성적 caspase-3와 CAD의 경우 일차 및 이차 난포에서 TUNEL에 대해 양성을 보이는 난자에서 공통적으로 관찰되었으나 일부 음성 난자에서도 갈색 반응을 보였다. 이 경우 TUNEL 염색에 의해 염색된 핵 부분은 균일하지 않고 부분적으로 주 변화되는 특징을 나타냈다. 그러나 이렇게 활성적 caspase-3와 CAD 면역 반응성을 보이는 난자에서 막을 따라 세포 안 쪽으로 여러 형태와 크기의 액포를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며 난자의 외형도 정상적인 원형의 형태에서 타원형으로 일부 변형된 것을 관찰할 수 있었다. 일부에서는 CAD 면역 반응성이 핵내에서 관찰되기도 하였다. 이것은 세포 사멸의 발전된 형태로서 막의 투과성 변화로 CAD가 핵막 안으로 침투하여 DNase의 기능을 수행하여 DNA 분절화가 일어나 TUNEL 양성을 보이는 사실을 나타내는 증거로 생각된다.

DNA 손상, 단백질 인산화 효소 저해, 세포 생존 신호물질의 부재와 같은 세포 내 스트레스에 의해 세포 사멸이 유발되는 과정을 미토콘드리아 경로라고 한다. 이 경로에는, Bax와 Bid가 미토콘드리아에 결합함으로써 궁극적으로 세포질로의 cytochrome c 방출을 조절하게 된다(Li et al., 1998). 여기에는 Apaf-1이라는 또 다른 핵심 인자가 관여하는데, Apaf-1

은 cytochrome c, dADP 또는 ATP, caspase-9, caspase-3와 apoptosome이라는 분자량 700 kDa의 다중체를 형성하게 된다(Cain et al., 2000). 활성적 caspase-3는, caspase-9이 Apaf-1과 결합하여 활성화되면서 procaspase-3로부터 활성화되어 세포사멸을 실행하는 것으로 보고되고 있다(Stennicke et al., 1999). 따라서 신생자 생쥐 난소 내 생식세포의 사멸 현상이 caspase-9이 활성화되는 미토콘드리아 경로를 통하여 apoptosome을 형성함으로써 일어날 가능성을 시사한다고 볼 수 있다.

한편 Matikainen 등(1999)은 caspase-3 녹아웃 생쥐를 이용한 실험에서 활성적 caspase-3에 대한 면역조직화학법에 의한 결과, 야생형에 비하여 원시난포와 일차 및 이차 난포를 포함한 강소 형성전 난포내 난자에 활성적 caspase-3의 존재가 차이가 없었다고 보고함으로써 생식세포의 세포 사멸에 활성적 caspase-3가 관여하지 않는 것으로 결론지었으나, 본 실험 결과에 따르면 그러한 가정은 사실과 다를 것으로 판단된다. 이처럼 활성적 caspase-3가 세포사멸의 양상을 보이는 일차난포내 난자에서 검출되는 것으로 보아, caspase계 단백질은 생식 세포 사멸에 관여하고 있는 것으로 생각되지만, 일부의 경우 caspase계 단백질의 활성화 경로를 통하지 않는 세포 사멸의 방법에 의해서도 사멸이 유도될 수 있는 것으로 생각할 수 있다. 이러한 가정은, T 림프구에서 사멸 수용체를 통하지 않는 세포 사멸 자극에 의해서만 caspase-3의 활성화가 관찰되고, 그 외의 경우 활성적 caspase-3가 세포사멸에 관여하지 않는다는 보고에 의해서도 지지된다(Bid'ere & Senik, 2001).

한편 Kim 등(2001)은 테스토스테론 수준이 감소된 흰쥐 정소에서 다수의 정모세포 (spermatocyte)들이 세포 사멸 양상을 보이는 것을 확인하였는데, 이들 세포 사멸 양상을 보이는 정모세포의 세포질 및 핵 주변에서는 활성적 caspase-3에 대한 면역반응성이 검출되었으며, 활성적 caspase-3 및 CAD가 핵 안으로 이동한 것을 관찰함으로써 생식호르몬에 의한 음성 생식세포의 세포사멸이 궁극적으로 caspase계 단백질에 의해 시행됨을 확인하였다. 따라서 음성과 자성의 생식세포 모두 발생과정에서 일어나는 세포 사멸이 초기 단계에서는 여러 다양한 유발 원인에 의해 유도될 수 있지만, 실행 단계에서는 공통적으로 caspase계 단백질들이 관여하는 것으로 생각할 수 있다. 결론적으로 caspase 계 단백질의 활성화는 성체 난소뿐만 아니라 그 이전 시기인 성적 미분화기, 즉 신생자기에도 동일하게 생식세포의 사멸기전에 작용할 수 있을 것으로 생각한다.

Bax의 경우 일차 및 이차 난포에서 TUNEL에 대해 양성을

보이는 난자에서 공통적으로 관찰되었다. Bax의 존재 확인은 신생자 생쥐 생식세포의 사멸이 미토콘드리아내 Bax와 관련이 있다는 사실을 입증하는 결과로 앞서의 활성화적 caspase-3에 대한 결과와 연결하여 볼 때 이 시기의 세포사멸이 Bax의 영향으로 미토콘드리아 막의 기능이 붕괴되어 cytochrome c가 방출됨으로써 caspase가 활성화되어 유도되는 경로에 의해 진행될 수 있음을 시사한다고 사료된다.

그러나 태자기 돼지 난소를 재료로 한 다른 실험(Garrett & Guthrie, 1999)의 결과, Bcl-2 면역 반응이 난소 수질내 난포 주위의 기질세포에서 주로 관찰됨으로써 체세포에서 생성되는 Bcl-2가 생식세포 및 강소형성전 난포의 생존에 중요하다고 보고하였는데, 이는 생식소 발생의 태자기와 신생자기에 미치는 Bcl-2의 영향이 차이가 있거나, 두 동물 사이의 작용 기전이 서로 다르기 때문일 것으로 추측된다.

Fas 면역표지의 경우, 염색성이 주로 세포막을 경계로 내외부에 존재하였으나 일부 세포질에 폭 넓게 분포하는 경우도 관찰되었다. 이렇게 Fas에 양성을 보이는 난자는 세포막을 따라 세포 안 쪽으로 여러 형태와 크기의 액포를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며 난자 핵이 세포질의 한 쪽으로 치우쳐 정상적인 형태에서 일부 변형된 것으로 생각된다. 또한 Fas 배위자 면역 표지의 경우 주로 TUNEL 양성의 세포에서 내부에 강한 갈색의 염색성이 폭넓게 존재하였고, 세포막을 따라 세포 안 쪽으로 여러 형태와 크기의 액포를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 난자 핵이 세포질의 한 쪽으로 약간 치우쳐 정상적인 형태에서 일부 변형된 것을 관찰할 수 있었으며 핵내 염색질의 분절화가 관찰되었다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 생쥐 신생자 시기의 난포 발달 과정 중 발생하는 생식세포의 퇴화는 세포 사멸에 의한 것임을 알 수 있었으며, 이들이 Fas에 의해 사멸 신호를 받아 생존과 사멸의 조절을 담당하는 Bax 단백질에 영향을 미침으로써 결국 caspase-3가 활성화되면서 활성화적 caspase-3와 CAD에 의해 세포 사멸이 유도되는 것임을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 생식세포의 세포 사멸에 여러 향사멸 조절인자들이 관여하는 것으로 보아 이 시기에 생식세포의 사멸에는 최소한 하나 이상의 조절 기전이 관여할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J (1998) Defects in regulation of apoptosis in caspase 2 deficient mice. *Genes Dev* 12:1304-1314.
- Bid`ere N, Senik A (2001) Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview. *Apoptosis* 6:371-375.
- Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275:6067-6070.
- Cryns V, Yuan J (1998) Proteases to die for. *Genes Dev* 12:1551-1570.
- Garrett WM, Guthrie HD (1999) Expression of bcl-2 and 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in fetal and post-natal pig ovaries. *Reprod Fertil Dev* 11:463-470.
- Green DR (1998) Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94:695-698.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17:3878-3885.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C (1999) Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while Bcl-xL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274:1156-1163.
- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4997-5002.
- Jurisicova A, Ian R, Alessandro F, Robert FC, Sue V (1998) Effect of maternal age and conditions of fertilization on programmed cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod* 4:139-145.
- Kim JM, Ghosh SR, Weil ACP, Zirkin BR (2001) Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142:3809-3816.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by

- caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
- Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL (2001) Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signalling in the ovary. *Endocrinology* 142:2468-2480.
- Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL (1999) Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis *in vitro*. *Mol Endocrinol* 13:841-850.
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL (1995) Ablation of Bcl-2 gene expression decreases the number of oocytes and primordial follicles established in the postnatal female mouse gonad. *Endocrinology* 136:3665-3668.
- Song KW (1998) Immunohistochemical studies on the germ cell degeneration and follicular atresia during ovarian differentiation in mouse. Ph.D. Thesis, Hanyang University, Seoul, Korea.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1:949-957.
- Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274:8359-8362.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: Enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139:1281-1292.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c blocked. *Science* 275:1129-1132.