

생식샘자극호르몬분비호르몬이 사람 과립-황체화 세포의 스테로이드 생성과 세포자연사에 미치는 영향

이 효진 · 양 현원[†]

서울여자대학교 생명공학과

Effects of Gonadotropin Releasing Hormone on Steroidogenesis and Apoptosis of Human Granulosa-Lutein Cells

Hyojin Lee and Hyunwon Yang[†]

Dept. of Biotechnology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

ABSTRACT : GnRH and its receptor are known to express locally in the ovary and to regulate the ovarian function by affecting on granulosa and lutein cells. It has been reported that GnRH directly causes apoptosis in the granulosa and lutein cells of the ovary. However, whether the apoptosis of the cells by GnRH is recovered by FSH as an anti-apoptotic factor is not yet known. In this study, we evaluated the apoptosis and the production of progesterone (P₄) and estradiol (E₂) after treatment with 5, 50, and 100 ng/ml GnRH and 1 IU/ml FSH in the granulosa-lutein cells that are obtained during oocyte-retrieval for IVF-ET. Results of DNA fragment analysis and TUNEL assay demonstrated that DNA fragmentation and the rate of apoptotic cells were increased in a dose-dependent manner showing a significant increase in the cells treated with 100 ng/ml GnRH. In addition, we found that FSH suppresses the apoptosis of the cells induced by GnRH. In the results of chemiluminescence assay for P₄ and E₂, P₄ production was decreased by GnRH treatment, whereas E₂ production was not changed. We also demonstrated that FSH inhibits the suppressive effect of GnRH on P₄ production as the result of apoptosis. The present results suggest that GnRH agonist using in ovarian hyperstimulation protocol might induce the dysfunction of the ovary, but its function could be recovered by FSH. These results also will be expected to use as the basic data to elucidate the physiological role of GnRH and to develop new ovarian hyperstimulation protocols for IVF-ET.

Key words : Apoptosis, FSH, GnRH, Granulosa-lutein cell, Ovarian hyperstimulation, IVF-ET.

요약 : GnRH는 국부적으로 난소에서 합성되며, 난소내 과립 및 황체세포에 직접적으로 작용하여 난소의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 특히, GnRH는 난소내 과립-황체화 세포의 세포자연사를 유도하는 것으로 보고하고 있다. 그러나 GnRH에 의한 세포자연사가 FSH에 의해 회복될 수 있는지는 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 실험에서 난자 채취 시 획득한 사람 과립-황체화 세포를 배양한 후 5, 50, 100 ng/ml GnRH와 1 IU/ml FSH를 처리하고 세포의 세포자연사 여부와 분비된 progesterone(P₄)과 estradiol(E₂) 양의 변화를 조사하였다. DNA 분절화 분석과 TUNEL 방법으로 세포자연사를 평가한 결과, GnRH는 농도 의존적으로 과립-황체화 세포의 세포자연사를 증가시켰고, 특히 100 ng/ml GnRH를 처리한 군에서 유의한 차이를 보이며 세포자연사 비율이 증가하였다. 또한 GnRH에 의한 세포자연사의 증가는 FSH에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 화학발광면역 측정법을 이용하여 배양내 P₄와 E₂의 양을 측정한 결과, GnRH를 처리한 후 E₂의 양은 변화가 없었던 반면 P₄의 양은 감소하였다. 이러한 GnRH의 P₄ 합성 억제 효과는 세포자연사 결과 마찬가지로 FSH에 의해 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 체외수정 및 배아이식 기술시 사용되고 있는 GnRH 작용제가 난소의 기능을 억제시킬 수 있을 것으로 보이나, 다량으로 투여되는 FSH에 의해 회복될 수 있음을 보여주고 있다.

이러한 실험 결과는 난소에 대한 GnRH의 생리적 기전을 이해하고 향후 새로운 과배란 유도 방법을 개발하는데 필요한 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

[†] 교신저자: 서울시 노원구 공릉2동 126번지 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 02-970-5662, (팩) 02-970-5974, E-mail: hwyang@swu.ac.kr

서 론

생식샘자극호르몬분비호르몬(gonadotropin releasing hormone, GnRH)은 시상하부에서 합성되는 10개의 아미노산으로 구성된 단백질 호르몬으로 뇌하수체 문맥 순환을 통하여 뇌하수체 전엽에 있는 GnRH 수용체와 결합하여 작용한다. 이러한 작용으로 뇌하수체 전엽에서 생식샘자극호르몬인 FSH와 LH가 분비되며, 분비된 생식샘자극호르몬들은 생식소 및 그 부속기관의 기능을 조절한다(Wierman et al., 1989; Neill, 2002; Limonta et al., 2003). GnRH 수용체는 G 단백질-복합 수용체계에 속하며, 뇌하수체뿐만 아니라 난소를 포함한 다양한 기관에서 발현이 확인되고 있다(Sealfon et al., 1997; Choi et al., 2006). 그러나 시상하부에서 분비되는 GnRH는 반감기가 2~6분으로 매우 짧아 뇌하수체가 아닌 다른 기관에 직접적으로 작용하는 것은 불가능하다. 그러나 최근에 뇌하수체가 아닌 다른 기관에서도 GnRH가 국부적으로 발현되는 것이 확인되었고, 특히 난소의 협막세포, 과립세포, 그리고 황체세포에서 GnRH mRNA와 단백질의 발현을 보고하였다(Kang et al., 2001; Kang et al., 2003).

난소에서 발현되는 GnRH는 난소 기능의 억제와 촉진을 동시에 하는 것으로 알려지고 있다. 먼저 난소 기능에 대한 GnRH의 억제 효과로 GnRH는 난소내 과립세포에 직접적으로 작용하여 생식샘자극호르몬에 의한 스테로이드 합성을 억제시키고(Kolena & Channing, 1972), 과립세포의 cyclic nucleotide의 축적을 방해한다(Magoffin et al., 1981; Erickson et al., 1985). 또한 LH와 prolactin 수용체의 발현을 억제시킬 뿐만 아니라 FSH, LH, IGF-1 수용체의 발현도 감소시켜 P₄, androgen 및 estrogen의 합성을 억제시킨다(Amsterdam et al., 2003). 더욱이 다량으로 투여된 GnRH는 난소내 난포의 발생과 배란을 억제시키며, 배양된 과립세포에 처리하면 inhibin의 생성이 억제되는 것으로 보고하고 있다(Rippel & Johnson, 1976; Bicsak et al., 1986).

반면, GnRH에 의한 난소 기능의 촉진 효과로 난자의 감수분열을 유도하고, 배양된 과립세포에서 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase의 활성을 자극하며, 인지질로부터 arachidonic acid 방출을 자극하여 prostaglandin E와 F의 합성을 증진시킴으로써 배란을 유도하는 것으로 알려지고 있다(Hsueh et al., 1980; Clark, 1982). 더욱이 이러한 GnRH의 효과는 과립세포와 황체세포에 존재하는 GnRH 수용체를 통해 직접

적으로 작용하는 것으로 보고되었고(Hsueh & Erickson, 1979), GnRH 수용체와 GnRH mRNA의 발현이 폐쇄 난포에서 증가하는 것이 보고되고 있다(Whitelaw et al., 1995).

현재 GnRH보다 반감기가 훨씬 긴 GnRH 작용제와 길항제가 체외수정 및 배아이식 시술 과정에서 반복적으로 사용되고 있으며, 이로 인하여 난소내 세포의 생리적 변화가 유발되며, 난포 발달과 배란에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고하고 있다(Pieper et al., 1981; Pellicer et al., 1992). 또한 최근 연구에서 난소내 과립세포의 세포자연사가 난포 폐쇄를 유발시킨다는 것이 밝혀지면서, GnRH에 의한 과립세포의 세포자연사가 난포 폐쇄를 유발시킬 수 있다는 연구 결과를 보고하고 있다(Tilly et al., 1997; Tsai et al., 2005). 그러나 현재까지 GnRH에 의해 유도된 이러한 세포자연사가 과배란 유도시 사용되고 있는 FSH에 의하여 회복될 수 있는지는 잘 알려져 있지 않다.

따라서 본 실험은 사람 과립-황체화 세포를 획득하여 GnRH와 FSH를 처리한 후 합성되는 스테로이드 양의 변화를 조사하고, 배양된 과립-황체화 세포의 세포자연사 여부를 확인함으로써 GnRH가 배양된 과립-황체화 세포에 직접적으로 미치는 작용 기전을 조사하고, 또한 FSH에 의해 GnRH의 난소 기능 억제 효과가 회복될 수 있는지를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 과립-황체화 세포의 획득

사람 과립-황체화 세포는 체외수정 및 배아이식 시술을 시행하는 환자로부터 난자를 채취하는 과정에서 얻어 사용하였다. 난소의 과배란 유도는 FSH(Metrodin, MerckSerono, Germany)와 hMG(IVF-M, LG Chem. Co., Korea) 또는 GnRH 작용제(Buserelin acetate; Suprefact, United Kingdom)와 FSH/hMG를 병용하여 시행하였다. 난포의 성장은 질식 초음파와 호르몬 측정으로 확인하였으며, 난포의 크기가 18 mm 이상이거나 난포당 E₂의 수준이 300~400 pg/ml 이상인 경우 hCG(Pergonal, MerckSerono) 10,000 IU를 주사하여 배란을 유도하였고, 주사 후 35~36시간에 질식 초음파로 난포를 확인하면서 질벽을 통하여 난포액을 채취하였다.

각각의 난포에서 추출된 난포액은 배양 접시에 옮기고, 난포액 내에 존재하는 과립-황체화 세포들을 채취하였으며, 배

양액에 옮긴 후 혈구세포들을 분리하기 위해 과립-황체화 세포가 들어있는 배양액 1 ml를 40% percoll 3 ml 위에 조심스럽게 올려놓고 300×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 과립-황체화 세포들은 중간에 층을 형성하게 되며 혈구 세포들은 바닥에 가라앉는다. 과립-황체화 세포들을 채취하여 배양액으로 3번 세척한 다음 0.1% collagenase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)가 들어있는 배양액으로 옮겨 주었다. 37°C 배양기에서 30분 경과 후 과립-황체화 세포들을 26 G 주사 바늘을 이용하여 여러 번 흡입과 배출을 해줌으로써 뭉쳐져 있던 세포 덩어리를 낱개의 세포들로 분리시킨 다음 hemocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. 생존율을 측정하기 위하여 trypan blue 용액(Sigma Chemical Co.)을 사용하여 염색한 후 염색되지 않은 세포를 계수하여 생존율을 계산하였다. 배양에 사용한 세포는 생존율 70% 이상을 보이는 것으로 배양액 1 ml당 100,000개의 세포를 넣어 배양하였다.

2. 과립-황체화 세포의 배양

준비된 과립-황체화 세포들은 24-well 배양접시(Nunc, Denmark)의 1 well 당 100,000개/1 ml의 세포를 넣어, 37°C에서 95% 공기와 5% CO₂가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(dMEM; GIBCO, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)에 10% fetal bovine serum(FBS; GIBCO)과 2 mM L-glutamine(GIBCO), 100 U/ml penicillin(GIBCO), 100 µg/ml streptomycin(GIBCO)을 첨가하여 사용하였다. 준비된 과립-황체화 세포를 24-well 배양접시에 옮겨서 48시간 배양한 후 배양접시 바닥에 세포들이 충분히 부착되어 있는 것을 확인하고 배양액을 갈아주었으며, 다시 24시간 배양 후 배양액을 갈아주면서 배양접시 바닥에 부착된 세포를 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포를 계수하여 생존율을 계산하였다. 배양액 교환 후 실험군에는 각각 5, 50, 100 ng/ml GnRH(Sigma Chemical Co.)와 1 IU/ml FSH(Sigma Chemical Co.)를 처리하였다. 24시간 배양 후 배양액을 수거하여 호르몬 양을 측정하고, 부착된 세포에서 세포자연사를 조사하였다.

3. TUNEL 방법에 의한 세포자연사 확인

배양된 과립-황체화 세포에서 세포자연사를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated

dUTP-digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) kit(ApopTag; Millipore, Billerica, MA)를 사용하였다. 배양된 세포는 4% neutral buffered formalin로 10분간 고정된 후 Tris buffer로 세척하였다. ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 5분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) enzyme를 첨가한 후 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 stop buffer를 상온에서 10분간 처리한 후 Tris buffer로 3번 세척하였다. 세척 후 FITC가 결합되어 있는 anti-digoxigenin antibody로 37°C에서 30분간 처리한 후 Tris buffer로 세척하고 propidium iodide로 2차 염색을 시행하였다. Fluorescence mounting 용액으로 봉입한 후 형광 현미경하에서 세포자연사가 일어난 세포를 조사하였다. 세포자연사 비율은 임의적으로 선택된 200× 시야에서 각각 다른 시야로 5번을 옮기면서 300~500개의 세포를 계수하였으며, 이와 같은 계수를 5번의 각각 다른 실험에서 반복하였다.

4. 세포자연사 확인을 위한 DNA 분절화 분석

획득된 과립-황체화 세포에 0.2 ml 분쇄 완충액을 첨가하고 조직분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 시료에 12.5 µl의 10% SDS를 넣고 65°C에서 30분간 방치하였다. 여기에 35 µl의 8 M potassium acetate를 넣고 시료를 잘 섞은 후 60분간 단백질이 가라앉도록 얼음에 방치한 후 시료를 4°C, 5,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 1.5 ml 미량원심분리 시험관으로 옮기고 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1, V:V:V)를 첨가하여 DNA를 추출하였으며, 다시 동량의 chloroform:isoamyl alcohol(24:1, V:V)로 재추출하였다. 상층액을 1.5 ml 미량원심분리 시험관에 옮기고, 0°C에서 보관한 2.5배 부피의 100% ethanol을 첨가, -70°C 초저온 냉동고에서 1시간 이상 침전시켰다. 이들 시료를 4°C에서 14,000×g로 30분간 원심분리하여 DNA를 추출하고 침전물은 50 µl의 1X TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시킨 후 1 µl의 DNase-free RNase(500 µg/ml; Boehringer-Mannheim, IN)을 첨가하고 60분 동안 37°C에서 방치하였다. 시료의 DNA를 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol로 추출 후, 동량의 chloroform:isoamyl alcohol로 재추출하였다. 상층액을 모아서 0.1배 부피의 3 M sodium acetate와 0°C에 보관한 2.5배의 100% ethanol로 DNA를 침전시키고 -70°C 초저온 냉동고에서 적어도 60분 이상 방치

시켰다. 이것을 4°C에서 14,000×g로 30분간 원심분리하고, 0°C에 보관된 0.2 ml의 80% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 압축 결정물을 25 μ l의 증류수에 녹이고, 260 nm의 흡광도에서 DNA 양을 측정하는 다음 -20°C에 보관하였다. 이렇게 추출된 DNA를 lane당 5 μ g의 농도로 1.5% agarose gel에 loading하고, running buffer로는 TBE 용액을 사용하였으며, 50 V에서 3시간 동안 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 transilluminator로 확인하였다.

5. 배양액 내 스테로이드 호르몬의 측정

배양액 내 호르몬의 정량은 ACS:180™ system (Ciba-Corning, USA)을 이용한 화학발광면역 측정법(Chemiluminescence assay; CIA)으로 시행하였다. 획득된 세포는 2 동안 배양한 후 새 배양액으로 교환해 주었고, GnRH와 FSH를 농도별로 처리하였다. 처리 후 24시간에 배양액을 획득하여 P₄과 E₂를 측정하였다.

6. 통계학적 분석

실험은 5번 반복하였으며, 스테로이드 농도와 세포자연사 비율은 모두 평균±표준오차로 표시하였다. 통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA, Tukey test 방법을 사용하였으며, 대조군과 실험군을 비교하여 *p* 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 생존율에 미치는 GnRH의 영향

배양된 사람 과립-황체화 세포가 GnRH에 의해 세포 사멸이 일어나는지 알아보기 위하여 GnRH를 농도별로 처리하고 세포의 생존율을 조사하였다. 획득된 과립-황체화 세포를 2일간 배양하여 배양접시 바닥에 붙인 후 3일째부터 GnRH를 5, 50, 100 ng/ml를 처리하였다. 살아있는 세포의 수는 배양 1일째 세포의 수를 100%로 하고 그것에 대한 상대적인 비율로 나타내었다. GnRH 처리 후 2일 동안은 모든 실험군에서 차이 없이 비슷한 수준으로 죽어가는 것을 알 수 있었으나, 처리 후 3일과 4일째에는 100 ng/ml GnRH를 처리한 군에서 생존율이 51.2%와 47.8%로 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 1A).

이러한 GnRH에 의한 과립-황체화 세포의 생존율 감소가

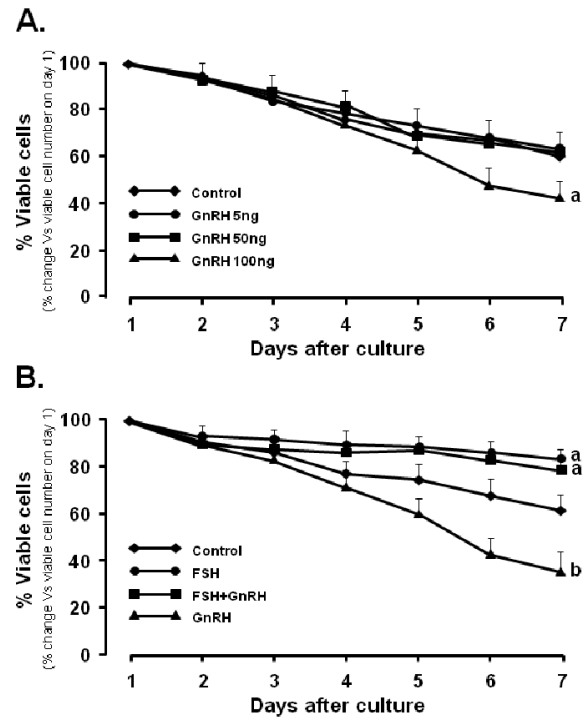


Fig. 1. Viability of the cultured granulosa-lutein cells after treatment with different doses of GnRH or FSH. The granulosa-luteal cells were cultured for 7 days in the media including 5, 50, and 100 ng/ml GnRH or 1 IU/ml FSH. The cells attached on the plates were stained with 0.4% trypan blue and the number of stained cells was counted. All data were expressed as means±standard error. a, b *p*<0.05 versus control.

FSH에 의하여 회복될 수 있는지를 조사하기 위하여 GnRH 100 ng/ml와 FSH 1 IU/ml를 함께 처리한 후 세포의 생존율을 조사하였다. 먼저 FSH 1 IU/ml만을 처리한 군에서는 배양 후 7일째 생존율이 95% 이상을 보인 반면, GnRH만 처리한 군에서는 생존율이 42.5%로 나타났다. 특히, GnRH와 함께 FSH를 처리한 군에서는 생존율이 90.5%로 FSH만을 처리한 군과 차이 없이 나타나 GnRH에 의한 생존율 감소는 FSH에 의하여 회복된다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

2. GnRH에 의해 유발된 세포자연사 확인

GnRH 처리 후 과립-황체화 세포의 생존율 감소가 세포자연사에 의해 일어난 것 인지를 확인하기 위하여 배양된 세포에서 TUNEL 방법으로 세포자연사가 일어난 세포들을 조사하였고, 또한 과립-황체화 세포에서 추출된 DNA를 이용하

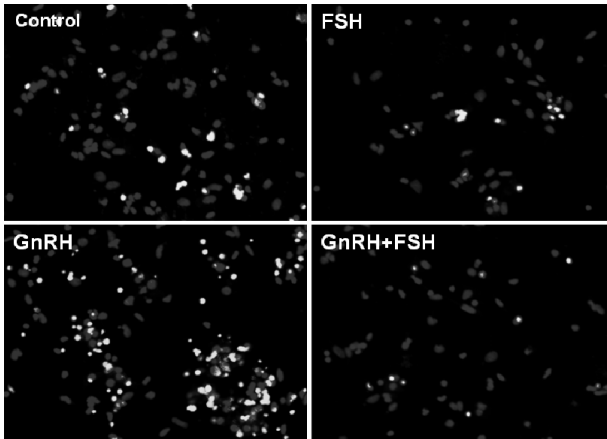


Fig. 2. Detection of apoptotic cells in the cultured granulosa-lutein cells after treatment with GnRH or FSH. The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 100 ng/ml GnRH or 1 IU/ml FSH. The cells attached on the plates were stained by using TUNEL assay kit and counter-stained with propidium iodide. Apoptotic cells stained by TUNEL show as white. Magnification, $\times 200$.

여 분절화 정도를 확인하였다. TUNEL 시행 후 형광현미경으로 관찰한 결과 FSH만을 처리한 군에서는 염색된 apoptotic

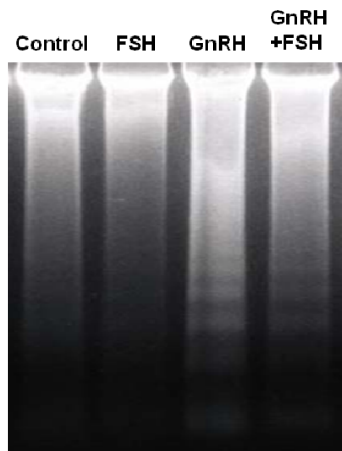


Fig. 3. Analysis of DNA fragmentation in the cultured granulosa-lutein cells after treatment with GnRH or FSH. The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 100 ng/ml GnRH or 1 IU/ml FSH. DNA extracted from the cultured cells were resolved by 1.5% agarose gel electrophoresis. The DNA fragments on gel were stained with ethidium bromide and visualized on UV transilluminator.

세포를 거의 찾아볼 수 없었으나, GnRH 100 ng/ml를 처리한 군에서 많은 세포들이 형광으로 염색된 것을 확인할 수 있었다. GnRH과 FSH를 함께 처리한 군에서는 FSH만을 처리한 군에서와 같이 염색된 apoptotic 세포를 거의 찾아볼 수 없었다(Fig. 2). 배양된 과립-황체화 세포에 GnRH와 FSH를 처리한 후 DNA 분절화 정도를 조사한 결과에서도 GnRH만을 처리한 군에서는 DNA 분절화가 많이 일어난 반면, GnRH과 FSH를 함께 처리한 군에서는 DNA 분절화 정도가 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3).

3. 세포자연사에 미치는 GnRH의 영향

GnRH에 의해 일어난 세포자연사 정도를 정확히 분석하기 위해 TUNEL 방법으로 염색된 apoptotic 세포를 계수하였다. GnRH 5 ng/ml를 처리한 군에서 apoptotic 세포의 비율은 각각 $23.7 \pm 10.5\%$ 로 GnRH을 처리하지 않은 대조군 ($12.3 \pm 17.2\%$)에 비하여 유의한 차이 없이 나타났으나, 50과 100 ng/ml를 처리한 군에서는 각각 $61.0 \pm 8.9\%$ 와 $73.1 \pm 10.5\%$

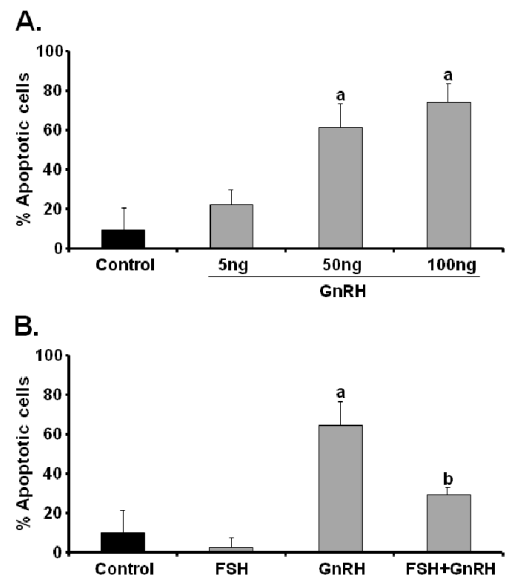


Fig. 4. Effects of GnRH and FSH on the apoptosis of the cultured granulosa-lutein cells. The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 5, 50, 500 ng/ml GnRH or 1 IU/ml FSH. The cells were fixed and stained by using TUNEL assay kit. The number of the cells stained with propidium iodide and the apoptotic cells stained by TUNEL was counted. All data were expressed as means \pm standard error. a, $p < 0.05$ versus control.

로 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 4A). FSH가 GnRH에 의해 유발된 세포자연사를 억제시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 위와 동일한 방법으로 FSH 1 IU/ml와 GnRH 100 ng/ml를 함께 처리한 결과, apoptotic 세포의 비율은 FSH만을 처리한 군에서 2% 이하로 세포자연사가 억제되는 것을 알 수 있었고, GnRH을 처리한 군에서는 63±14.3%를 보여 유의하게 증가된 것을 알 수 있었다. 반면, FSH와 GnRH을 함께 처리한 군에서는 31±3.1%를 보여 FSH가 GnRH의 apoptotic 효과를 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 4B).

4. 스테로이드 합성에 미치는 GnRH의 영향

1~1,000 ng/ml의 GnRH와 FSH 1 IU/ml를 처리한 후 배양액 내로 분비된 P₄와 E₂의 농도를 측정된 결과, P₄의 농도는 처리된 GnRH 농도가 증가할수록 감소하였고, 특히 100과 1,000 ng/ml GnRH을 처리한 군에서 통계학적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 5A). 반면, FSH와 GnRH을 함께 처리

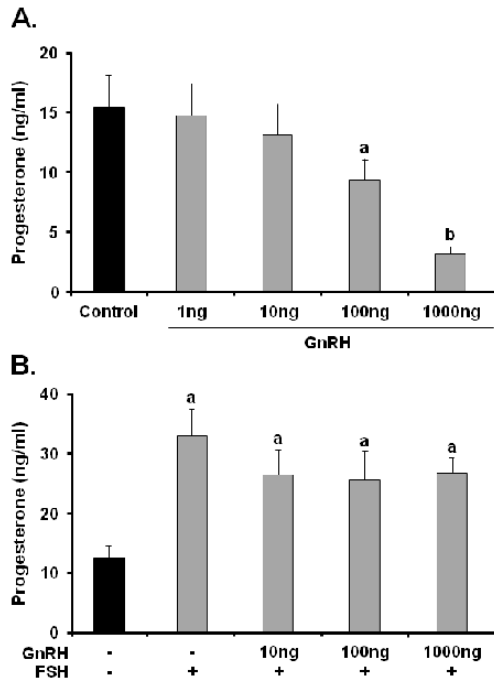


Fig. 5. Effects of GnRH and FSH on the progesterone production by granulosa-lutein cells. The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 1 to 1000 ng/ml GnRH or 1 IU/ml FSH. The concentration of progesterone in the cultured media was measured by using chemiluminescence assay kit. All data were expressed as means±standard error. a, *p*<0.05 versus control.

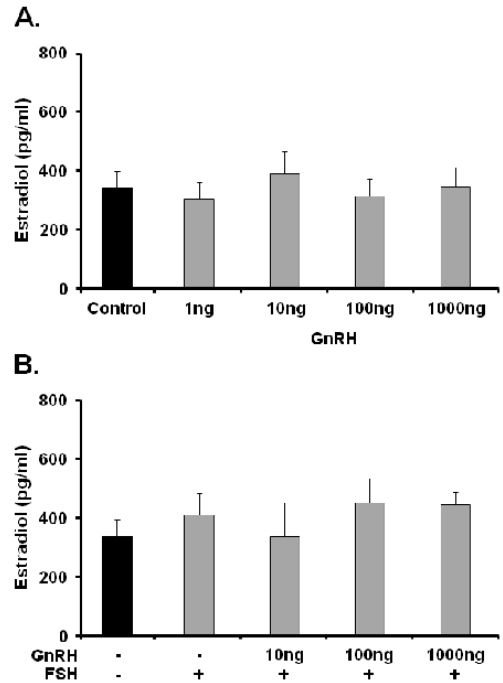


Fig. 6. Effects of GnRH and FSH on the estradiol production by granulosa-lutein cells. The granulosa-lutein cells were cultured for 3 days in the media including 1 to 1000 ng/ml GnRH or 1 IU/ml FSH. The concentration of estradiol in the cultured media was measured by using chemiluminescence assay kit. All data were expressed as means±standard error.

한 군에서는 GnRH 농도에 상관없이 대조군에 비하여 2배 이상의 높은 농도를 보였다(Fig. 5B). 배양액 내에서 E₂ 농도를 측정된 결과에서는 모든 군에서 대조군과 큰 차이 없이 비슷한 수준을 나타냈다(Fig. 6).

논 의

GnRH는 뇌하수체에 작용하여 생식샘자극호르몬을 통해 간접적으로 난소의 기능을 조절할 뿐만 아니라 직접적으로 난소에 작용하여 그 기능을 조절할 수 있는 것으로 알려지고 있다(Hsueh & Erickson, 1979). 난소 기능에 대한 GnRH의 직접적인 효과는 억제와 촉진 작용을 동시에 하는 것으로 알려지고 있으며, 난소내 과립세포와 황체세포에 있는 GnRH 수용체를 통해 일어나는 것으로 보고되고 있다(Jones et al., 1980; Pieper et al., 1981). 특히, GnRH는 난소에 직접적으

로 작용하여 세포의 세포자연사 유도 및 스테로이드 호르몬 합성을 억제하는 것으로 알려지고 있으나(Parborell et al., 2002; Takekida et al., 2003), 아직 그 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 GnRH가 난소내 세포의 세포자연사와 스테로이드 호르몬 합성에 미치는 영향을 알아보고자 사람 과립-황체화 세포를 이용하여 GnRH와 FSH를 처리한 후 세포자연사를 확인하고 합성되는 P₄와 E₂ 양의 변화를 조사하였다.

먼저 GnRH에 의해 과립-황체화 세포의 세포 사멸이 일어나는지 알아보기 위하여 GnRH 처리 후 세포의 생존율을 조사한 결과, 농도에 의존적으로 세포가 죽어가는 것을 알 수 있었고, 이러한 세포의 죽음이 세포자연사에 의해 진행된다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 기존에 발표된 GnRH가 난포의 성장을 억제하고 난포 폐쇄를 유발시키며, 또한 GnRH 작용제의 투여가 난소내 IGFBP-4의 생성을 유도하여 난포 폐쇄를 유도시킨다는 사실을 뒷받침하는 결과라고 할 수 있겠다(Birbaumer et al., 1985). 아울러 뇌하수체가 제거된 미성숙 흰쥐에 GnRH 작용제를 투여한 실험에서 GnRH 작용제는 난소내 세포자연사를 직접적으로 유발시키며, FSH를 함께 투여할 경우에 GnRH 작용제에 의한 세포자연사는 반 이상 감소한다는 결과와 일치하고 있다(Billig et al., 1994). 최근에 다른 유전자에 의해 조절되는 두 가지 형태의 GnRH, GnRH-I과 GnRH-II가 사람에서 밝혀졌고(Cheng & Leung, 2005), 두 GnRH 모두가 사람 과립세포에 존재하는 각각의 GnRH 수용체에 작용하여 세포자연사를 유발시키는 것으로 보고하고 있다(Tsai et al., 2005; Sifer et al., 2003).

한편, GnRH에 의한 난포세포의 세포자연사 유발은 세포내 칼슘 양의 증가에 의한 protein kinase C 단백질 활성화로 인해 일어나는 것으로 보고되고 있다(Zeleznik et al., 1989; Wang et al., 1992). 또한 GnRH 작용제는 난소내 inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA 발현을 감소시키면서 세포자연사를 유발시킬 수 있는 것으로 보고하고 있다(Matsumi et al., 2000). 이러한 결과들은 GnRH 작용제에 의한 난포세포의 세포자연사가 세포내 NO 농도의 감소로 인해 유발될 수 있다는 것을 시사하고 있으나, 아직 명확한 신호 전달 기전은 밝혀져 있지 않다. 그러나 최근에 세포자연사와 관련된 신호전달물질들 중 caspase-8, caspase-9, caspase-3가 세포자연사 과정에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려지고 있

으며(Kumar, 1995), 이들과 함께 APAF-1, PARP, ICAD, gelsolin과 같은 기질의 역할도 밝혀지고 있다(Ashkenazi & Dixit, 1998). 본 저자들도 과립-황체화 세포에서 caspase-3와 -9에 대한 활성도를 조사한 결과, 세포자연사가 일어난 세포에서 caspase-3와 -9에 대한 활성도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히, GnRH 작용제가 caspase-3와 -9의 활성도를 증가시키는 것을 확인하였으며, PARP의 활성도 또한 GnRH 작용제에 의해 증가하는 것을 알 수 있었다(박 등, 2004).

본 실험 결과에서 GnRH에 의해 유도된 과립-황체화 세포의 세포자연사가 FSH에 의하여 억제된다는 것을 보여줬다. FSH는 난포내 과립세포에 존재하는 FSH 수용체와 결합하여 난포 발달에 중요한 역할하면서 세포자연사를 억제하는 것으로 알려져 있다(Markstrom et al., 2002). 따라서 난포 발달 이상이나 난포 폐쇄는 FSH에 의존적으로 일어나며(Tsafriiri & Braw, 1984; Hirshfield, 1991), FSH의 처리는 전체 난포들 중 강소 형성 난포와 배란전 난포의 폐쇄를 억제시키는 것으로 보고되고 있다(Braw & Tsafriiri, 1980). 따라서 시험관 시술과정에서 뇌하수체 기능을 억제시키기 위해 투여되는 GnRH 작용제는 난포세포의 세포자연사를 유발시킬 수 있으나, 이와 함께 투여되는 FSH가 이러한 세포자연사를 막는 것으로 보인다(Billig et al., 1994; Matsubara et al., 2000).

한편, P₄와 E₂ 분비에 미치는 GnRH의 영향을 조사한 결과, P₄의 양은 처리된 GnRH 농도가 증가할수록 감소하였으며, GnRH 100 ng/ml 이상 처리한 군에서 통계학적으로 유의하게 감소하였다. 반면, FSH와 GnRH를 함께 처리한 군에서는 GnRH 농도에 상관없이 대조군에 비하여 2배 이상의 높은 농도를 보임으로서 GnRH에 의한 P₄ 분비의 감소가 FSH에 의해 완전히 회복됨을 알 수 있었다. 그러나 배양액내에서 E₂의 양을 측정된 결과, 모든 실험군에서 대조군과 큰 차이 없이 비슷한 농도를 보여주었다. 이런 결과들을 기존에 발표된 연구 결과들과 비교해 보면, Hsueh 등(1979)은 GnRH가 직접적으로 난소내 스테로이드 생성에 관여하여 FSH에 의해 촉진된 E₂와 P₄의 분비량의 증가를 감소시킨다는 결과와 일치하고 있다. 또한 흰쥐에서 시행한 실험에서도 GnRH가 P₄의 대사에 관여하는 효소인 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase의 활성을 촉진한다는 보고가 있었고, 이러한 효소의 변화가 P₄ 분비를 감소시키고 대신 20 α -hydroxyprogesterone 양을 증가시키는 것으로 설명하고 있다(Sridaran et al., 1999). 또한

Smith와 Fraser(1991)는 흰쥐에서 P₄₅₀ side chain cleavage mRNA 양의 감소와 이러한 효소의 감소가 P₄의 합성을 억제하는 것으로 보고하고 있다. 이상의 결과에서 난포세포의 P₄ 합성에 미치는 GnRH의 영향은 난포의 발달 시기에 따라 다를 것으로 판단된다. 이와 관련하여 Parinaud 등(1992)은 배양된 사람 과립-황체화 세포에서 GnRH을 처리한 후 P₄의 분비량을 조사한 결과 두 가지의 다른 기작에 의해 GnRH가 작용하는 것으로 보고하고 있다. 즉, 과립세포에는 생식샘자극호르몬의 효과를 매개하는 것으로 보이는 GnRH에 높은 친화력을 가지는 수용체와 억제 효과를 보이는 낮은 친화력을 가지는 두 가지 형태의 GnRH 수용체가 존재하며, 이러한 수용체의 비율은 난포의 성숙 정도에 따라 것으로 주장하고 있다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, GnRH는 난소내 세포의 세포자연사를 직접적으로 유발시키면서 스테로이드 합성에 이상을 유발시킬 수 있는 것으로 판단되며, 또한 GnRH에 의해 유발된 과립-황체화 세포의 세포자연사와 스테로이드 합성 억제 효과는 FSH에 의해 부분적으로 회복될 수 있는 것으로 보인다. 또한 본 연구 결과는 체외수정 및 배아이식 시술과정에 있어서 다량으로 투여하고 있는 GnRH 작용제의 기전을 이해하고 향후 새로운 과배란 유도 방법을 개발하는데 필요한 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 2009학년도 서울여자대학교 교내학술특별연구비의 지원을 받아 작성되었습니다.

인용문헌

- Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, Sasson R, Hirsh L (2003) Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids* 68:861-867.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
- Birnbaumer 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.
- Bicsak TA, Tucker EM, Cappel S, Vaughan J, Rivier J, Vale W, Hsueh AJ (1986) Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology* 119(6):2711-2719.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ (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.
- Braw RH, Tsafirri A (1980) Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J Reprod Fertil* 59:267-272.
- Cheng CK, Leung PC (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* 26:283-306.
- Choi JH, Gilks CB, Auersperg N, Leung PC (2006) Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4562-4570.
- Clark MR (1982) Stimulation of progesterone and prostaglandin E accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells. *Endocrinology* 110:146-152.
- Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C (1985) The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6:371-399.
- Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
- Hsueh AJ, Erickson GF (1979) Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone: direct inhibition ovarian steroidogenesis. *Science* 204:854-855.
- Hsueh AJ, Wang C, Erickson GF (1980) Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor and aromatase activity in rat granulosa cells. *Endocrinology* 106:1697-1705.
- Jones PB, Conn PM, Marian J, Hsueh AJ (1980) Binding

- of gonadotropin-releasing hormone agonist to rat ovarian granulosa cells. *Life Sci* 27:2125-2132.
- Kang SK, Choi KC, Yang HS, Leung PC (2003) Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* 10:169-177.
- Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Leung PC (2001) Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142:182-192.
- Kolena J, Channing CP (1972) Stimulatory effects of LH, FSH and prostaglandins upon cyclic 3',5'-AMP levels in porcine granulosa cells. *Endocrinology* 90:1543-1550.
- Kumar S. (1995) ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 20:198-202.
- Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Motta M (2003) The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol.* 24:279-295.
- Magoffin DA, Reynolds DS, Erickson GF (1981) Direct inhibitory effect of GnRH on androgen secretion by ovarian interstitial cells. *Endocrinology* 109:661-663.
- Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, Billig H (2002) Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123: 23-30.
- Matsubara H, Ikuta K, Ozaki Y, Suzuki Y, Suzuki N, Sato T, Suzumori K (2000) Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1620-1626.
- Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP (2000) Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Bio Reprod* 63:141-146.
- Neill JD (2002) GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* 143:737-743.
- Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A, Tesone M (2002) Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by epidermal growth factor and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol Reprod* 67:481-486.
- Parinaud J, Oustry P, Bussenot I, Tourre A, Perineau M, Plantavid M, Monrozies X, Reme JM, Pontonnier G (1992) Paradoxical ovarian stimulations in the use of LHRH analogs. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 47: 129-133.
- Pellicer A, Tarin JJ, Miró F, Sampaio M, De los Santos MJ, Remohi J (1992) The use of gonadotrophin releasing-hormone analogues (GnRH_a), in *in-vitro* fertilization: some clinical and experimental investigations of a direct effect on the human ovary. *Hum Reprod* 1:39-47.
- Pieper DR, Richards JS, Marshall JC (1981) Ovarian gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors: characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology* 108:1148-1155.
- Rippel RH, Johnson ES (1976) Inhibition of HCG-induced ovarian and uterine weight augmentation in the immature rat by analogs of GnRH. *Proc Soc Exp Biol Med* 152:432-436.
- Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP (1997) Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 18:180-205.
- Sifer C, Blanc-Layrac G, Bringuier AF, Porcher R, Madelenat P, Feldmann G, Benifla JL (2003) Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist and follicle stimulating hormone on the incidence of apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110: 43-48.
- Smith KB, Fraser HM (1991) Control of progesterone and inhibin secretion during the luteal phase in the macaque. *J Endocrinol* 128:107-113.
- Sridaran R, Lee MA, Haynes L, Srivastava RK, Ghose M, Sridaran G, Smith CJ (1999) GnRH action on luteal steroidogenesis during pregnancy. *Steroids* 64:618-623.
- Takekida S, Matsuo H, Maruo T (2003) GnRH agonist action on granulosa cells at varying follicular stages. *Mol Cell Endocrinol* 202:155-164.

- Tilly JL, Tilly KI, Perez GI (1997) The genes of cell death and cellular susceptibility to apoptosis in the ovary: a hypothesis. *Cell Death Differ* 4:180-187.
- Tsafiri A, Braw RH (1984) Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 6:226-265.
- Tsai NM, Hsieh RH, Au HK, Shieh MJ, Huang SY, Tzeng CR (2005) Effects of gonadotrophin-releasing hormone agonists on apoptosis of granulosa cells. *Ann NY Acad Sci* 1042:531-537.
- Wang J, Steele GL, Baimbridge KG, Rodway MR, Leung PC (1992) Intracellular calcium and the signaling mechanism of luteinizing hormone-releasing hormone in rat granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol* 167:541-547.
- Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD, Hillier SG (1995) Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology* 136:172-179.
- Wierman ME, Rivier JE, Wang C (1989) The structure and regulation of the pituitary gonadotrophin subunit genes. *Endocrinology* 124:272-278.
- Zeleznik AJ, Ihrig LL, Bassett SG (1989) Developmental expression of Ca^{++}/Mg^{++} -dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology* 125:2218-2220.
- 박은주, 김평식, 염윤희, 양현원, 박원일, 강병문 (2004) GnRH-agonist에 의한 인간 과립-황체화 세포의 세포사멸은 caspase-3와 -9 및 PARP의 활성화에 의해 유도됨. *대한산부인과 학회지* 47:1145-1153.
-
- (received 9 November 2009, received in revised form 1 December 2009, accepted 5 December 2009)