

감마선이 조사된 미성숙 생쥐 난소 내 인히빈의 발현 변화

한양대학교 자연과학연구소, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과¹

김상수 · 이창주 · 윤현태¹ · 윤용달^{1,*}

Expression of Inhibin in the Whole-body γ -irradiated Mouse Ovary

Sang Soo Kim, Chang Joo Lee, Hyun-Tae Yoon¹, Yong-Dal Yoon^{1,*}

The Research Institute for Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea,

¹Laboratory of Toxicogemomics, Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Objective: The purposes of the present study were to investigate the effect of γ -radiation on the expression of inhibin- α proteins and genes for inhibin α , β A, and β B in the ovary.

Methods: Immature mice were whole-body γ -irradiated with 25% of a lethal dose. At time 0, 3, 6, 12, and 24 hours after the irradiation, the ovaries were collected and used for immunohistochemistry for inhibin- α , and RT-PCR for inhibin- α , β A, and β B.

Results: The expression of the immunoreactive inhibins- α was maintained at 12 hours post-irradiation and reduced thereafter. The expression of inhibin- α mRNA was significantly increased with the time after the irradiation. However there were no significant changes in the expression of β A and β B mRNAs.

Conclusion: It might be thought that inhibin acts as one of the regulatory factors in the γ -radiation-induced follicular atresia in mice

Key Words: Mouse ovary, Follicle, Inhibin, Radiation

난포의 폐쇄는 성숙단계 이전의 원시난포 및 성장·성숙하고 있는 여러 다양한 단계에서의 난포가 퇴화하여 소멸하는 현상을 의미한다. 난포가 퇴화하게 되면 난포 내 스테로이드 호르몬의 생합성율이 변하며,^{1,2} 형태학적으로 과립층세포의 핵이 응축되고 증식율이 감소하면서, 난포막세포층이 비대해지고 결국 기저막이 붕괴하게 되는데, 최근 연구결과에 의하면, 난포의 퇴화는 과립층세포의 세포자멸사에 의하여 매개된다고 보고되고 있다.³⁻⁵ 세포자멸사는 조직 내 정상적인 세포의 항상성 유지를 위해 면역학적 반응이 유발되지 않는 생리학적 과정으로서,^{6,7} 세포외부 신호와 특정 환경에 반응하여 세포

가 능동적으로 사멸하는 것을 뜻한다.

난포의 폐쇄 기전을 연구하기 위해 인위적으로 폐쇄를 유발하는 방법 중에는 이온화 방사선 특히 X선⁸과 감마선 조사⁹⁻¹²가 포함된다. 생쥐에서 방사선에 의해 난포의 퇴화가 유발하며, 이러한 퇴화의 유발 효과는 성장을 개시한 1차난포에 비해 원시난포에서 더 빠른 것으로 알려져 있다.^{11,13} 또한 방사선의 조사선량에 따라 난포의 수가 감소하고,¹⁴ 난포 내 염색체 이상도 더욱 증가하며,^{15,16} 난포의 퇴화를 가속화시키게 되는 것으로 알려져 있다.⁹

뇌하수체에서 FSH의 생합성과 분비를 선택적으로 억제하는 것으로 알려져 있는 분자량 32~34 kD

주관책임자: 윤용달, 우) 133-791 서울특별시 성동구 행당동 산 17, 한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Tel: (02) 2220-0955, Fax: (02) 2294-0955, e-mail: ydyoon@hanyang.ac.kr

*본 연구는 한국과학재단 선도기초과학연구실 연구비(M02-2004-000-20849-0) 지원에 수행되었음.

의 당단백질인 인히빈은 TGF- β 가계에 속하며 α 와 β A 혹은 β B 소단위가 인히빈 A와 인히빈 B를 형성한다.¹⁷⁻²⁰ 인히빈 B가 FSH의 자극에 의해 발달 중인 난포의 과립층세포에서 분비되는 주된 산물이며, 인히빈 A는 우성난포 및 황체에서 분비된다.²¹ 인히빈은 생식소를 포함한 여러 유형의 세포에 대한 성장, 증식, 그리고 분화를 자극하는 기능을 갖고 있다.^{22,23} 또한, 발달 중인 난포로부터 분비되는 인히빈은 난포의 계속적인 발달 뿐 아니라 난포 내 스테로이드 호르몬의 생합성을 조절하며, 난소 및 부신피질에서 종양억제 인자로도 작용한다.²³⁻²⁵ 혈청 내 인히빈은 폐경 이후에 측정되지 않을 정도로 감소되지만 점액종양 (mucinous carcinoma)이나 과립세포암종 (granulosa cell tumor)의 경우 계속적으로 분비되어 혈청 내 진단 표지로 이용된다.^{26,27} 현재 방사요법을 받은 환자의 경우 난소의 기능부전이 유발되는 것으로 보고되었지만,²⁸ 난소 내 인히빈의 발현 변화에 있어 감마선과 관련된 연구는 많지 않다.

따라서, 본 연구는 미성숙 생쥐에 감마선을 전신 조사한 후 시간에 따라 난소 내 인히빈의 발현 변화를 유전자 및 단백질 수준에서 측정하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 3주령의 ICR 품종의 생쥐를 사용하였으며 먹이와 물을 상시 먹을 수 있는 조건으로 1주일 이상 적응 시킨 후 (명/암=12/12 시간) 실험에 사용하였다.

2. 감마선 조사

이온화 방사선의 조사는 기 보고된 방법에 따라 한국원자력연구소의 감마선 발사장치 (Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)에서 감마선 (⁶⁰Co, Source strength: approximately 150 TBq, Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd)을 LD₂₅ (6.42 Gy)의 조사량으로 1시간 동안 전신 조사 하였다.^{9,11} 방사선 조사 후 0, 3, 6, 12, 24시간에 난소를 적출하여 본 실험에 사용하였으며 실험군 당 생쥐는 5마리로 하였다.

3. 면역조직화학 염색 및 관찰

생쥐 난소는 4% paraformaldehyde에 12시간 고정하였으며, 파라핀을 침투시켜 포매한 후 5 μ m의 두께로 박절하였다. 통상적인 헤마톡실린-에오신 (hematoxylin-eosin) 염색을 실시하였으며, 인히빈 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였다. 파라핀을 제거한 후 재-수화시킨 절편에서 인히빈에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였다. 조직절편은 37°C에서 30분 간 0.1% trypsin이 첨가된 CaCl₂ 용액에 담근 후 다시 30분 간 2 N HCl과 반응시켰다. 즉시 조직절편은 0.1% 붕사 (borax) 용액에 담가 반응을 종결시켰으며, 흐르는 물로 수세하였다. 절편을 10 mM 구연산 완충용액 (pH 6.0)에 5분간 2번 담근 후 5분간 마이크로파 오븐 (750 W)을 이용 3회 가열하였다. 가열이 끝난 절편은 실온에서 15분간 방치한 후, Tris-완충 식염수 (TBS; 0.05 M Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH 7.6)으로 수세하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 우선 3% H₂O₂가 들어있는 메탄올 용액에 15분간 담가 내인성 과산화효소의 활성을 억제시켰으며, 5% 정상염소혈청에 10분간 반응시켜 비특이적 결합부위를 차단시킨 후 인히빈에 대한 면역조직화학 염색을 실시하였다. 즉, 절편을 TBS로 세척한 후 1차 항체 (1:100)가 들어있는 습윤기에 넣고 4°C에서 17시간 동안 반응시켰다. 인히빈에 대한 항체는 Oxform Bio-Innovation Ltd. (Oxfordshire, UK) 사의 제품을 사용하였다. 조직절편은 바이오틴 (biotin)이 부착된 항-생쥐 IgG (1:200)와 20분간 반응시켰다. 마지막으로, 절편은 TBS로 세척한 후 streptavidin-ABComplex-HRP (1:100) 용액에 10분간 반응시켰다. 염색은 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.5 mg/ml), 0.01 M imidazole, 그리고 0.3% H₂O₂가 포함된 TBS에서 시행하였다. 대조 염색으로는 1차 항체를 배제한 후 동일과정으로 진행하였다. 그 후 절편을 흐르는 물에 수세하였으며 메이어 헤마톡실린 (Mayer's hematoxylin)으로 대조 염색을 실시한 후 캐나다 발삼 (Canada balsam)으로 봉입하였다. 난소의 조직절편 중 가장 큰 절편을 선정 기 보고된 방법에 따라,¹⁰ 광학현미경 (Zeiss, Jena, Germany) 하에서 원시난포 (primordial follicle), 1차난포 (primary follicle), 강소

형성전 난포 (preantral follicle), 강소형성난포 (antral follicle)를 확인하여 관찰하였다.

4. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

인히빈 소단위 유전자의 발현 변화를 알아보기 위해 전체 RNA 1 µg을 5× 역전사효소 완충용액, dNTP (2.5 µM), 올리고 dT₁₅ 프라이머 (primer), RNase 저해제, AMV 역전사효소가 포함된 용액으로 70분 동안 42°C에서 반응시킨 후, 95°C에서 5분간 효소를 불활성화 시켰다 (Takara, PCR Thermal Cycler 480). 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR) 은 동일한 양의 합성된 cDNA에 MgCl₂ 완충용액, 10×PCR 완충용액, dNTP (2.5 mM), 10 pM의 각 프라이머들을 이용하여 Taq DNA 중합효소 용액 속에서 중합반응을 수행하였다. 최초 94°C에서 1분간 변

성 후, 94°C에서 1분, 각각의 프라이머에 따른 불임 (annealing) 온도에서 1분, 72°C에서 2분간을 한 주기로 하여 30회 반복하여 증폭하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 신장반응을 수행하였다 (Bio-rad, iCycler™ Thermal Cycler). 반응 후 5 µg의 PCR 산물을 6x의 40% 글리세롤 내 0.25% 브로모페놀 블루 (bromophenol blue) 용액에 넣은 후, 1% 아가로스 젤에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 젤은 Vilber Lourmat 사의 Bio-Print로 스캔한 후 Bio-Profil Bio-1D Windows Application V10.02로 분석하였다. 본 실험에 사용된 프라이머 서열은 Table 1에 요약하였다.

5. 통계학적 분석

각 실험군 간의 결과에 대한 유의성 검정은 분산 분석 (ANOVA) 및 Student's t test를 사용하였고, p

Table 1. The primer sequences and the sizes of amplification products of β-actin, Inhibin-α, Inhibin-βA and Inhibin-βB gene used in the present study

Genes		Sequences	Product size (bp ¹)	Cycles
β-actin ²	Forward	5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3'	228	25
	Reverse	5'-CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3'		
Inhibin-α	Forward	5'-GTC TGC CTC GAA GAC ATG CC-3'	341	
	Reverse	5'-CTG TAC CAA GGA CAC AGG CA-3'		
Inhibin-βA	Forward	5'-AAG AGA CCC GAT GTC ACC CA-3'	395	
	Reverse	5'-CTC TCC CCC TTT AAG CCC AT-3'		
Inhibin-βB	Forward	5'-TGG GCA GAG TGA GGC TGT TC-3'	325	
	Reverse	5'-TTT CGC CTG TGT GGG TCA AC-3'		

¹ bp, base pair, ² The primer sequences were adopted from Albano *et al.* (1993)²⁹

Table 2. Immunoreactivity of inhibin-α according to follicle status the control and γ-irradiated mouse ovary

	Normal			Atretic		
	Nucleus	Granulosa	Theca	Nucleus	Granulosa	Theca
Primordial	-	-	-	-	-	-
Primary	-	-/+	-	-	-	-
Preantral	-	+++	-	-	+/-	-
Early antral	-	+++	-	-	+/-	-

Normal and atretic follicles were identified according to Kim and Lee¹⁰.

-, not expressed; -/+, not always expressed; +/-, weakly and sometimes not expressed; ++, moderately expressed; +++, intensively expressed

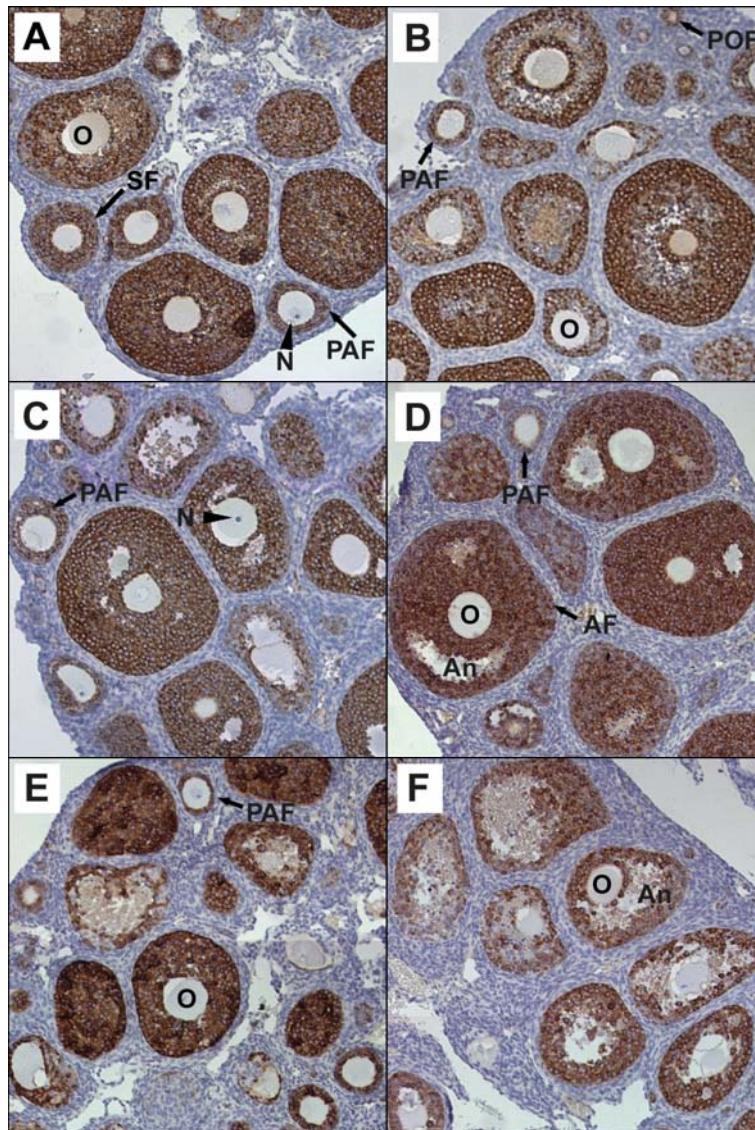


Figure 1. Immunohistochemistry for inhibin- α proteins in the γ -irradiated immature mouse. Follicle status was identified with hematoxylin and eosin stains according to Kim and Lee (2000). The ovaries were collected before (A), and 0 (B), 3 (C), 6 (D), 12 (E), and 24 (F) hours after the irradiation. Original magnification, $\times 100$. Bars 200 μm . An, antrum; AF, antral follicle; N, nucleus; O, oocyte; SF, small follicle; POF, primordial follicle; PAF, preantral follicle.

값이 0.05보다 작은 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 면역조직화학적 관찰

인히빈 단백질의 난소 내 발현을 면역조직화학적

으로 조사한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 감마선을 조사하지 않은 대조군의 경우 난소 내 인히빈 단백질은 과립층세포에서 발현되며 난포의 크기 가 클수록 그리고 정상난포가 퇴화난포에 비해 더 많이 발현함을 알 수 있다. 그러나, 1차난포 및 원시난포에서는 인히빈 단백질이 거의 발현되지 않았다 (Table 2). 감마선 조사 후 시간에 따라 인히빈 단백

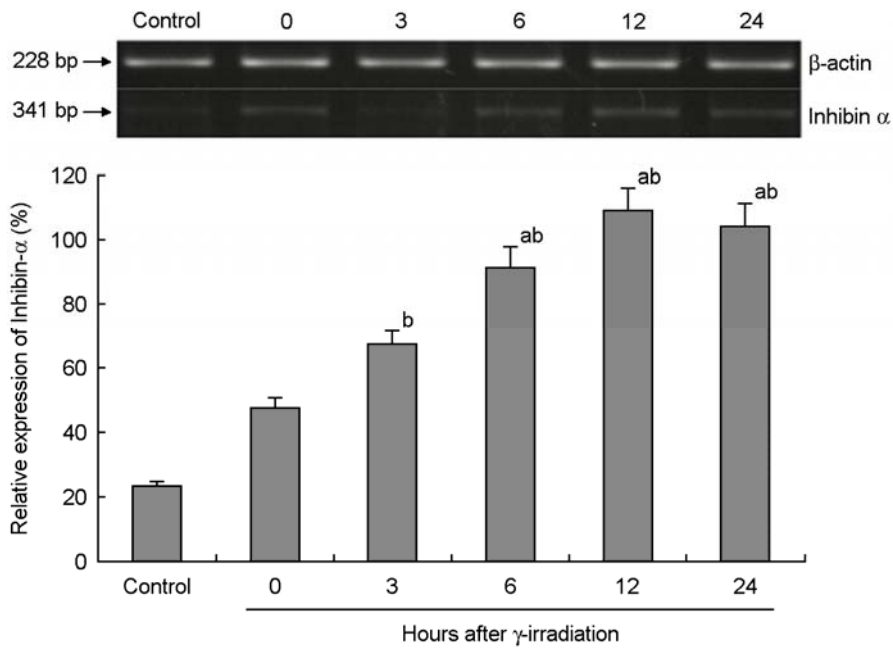


Figure 2. Electrophoretogram and its densitogram of RT-PCR products for inhibin- α mRNA in the control and γ -irradiated mouse ovaries. The data was expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The expression of inhibin- α mRNAs was significantly increased at 6, 12 and 24 hours post irradiation. a, $p < 0.05$ significantly higher than 0 hours post irradiation. b, $p < 0.01$ significantly higher than normal control.

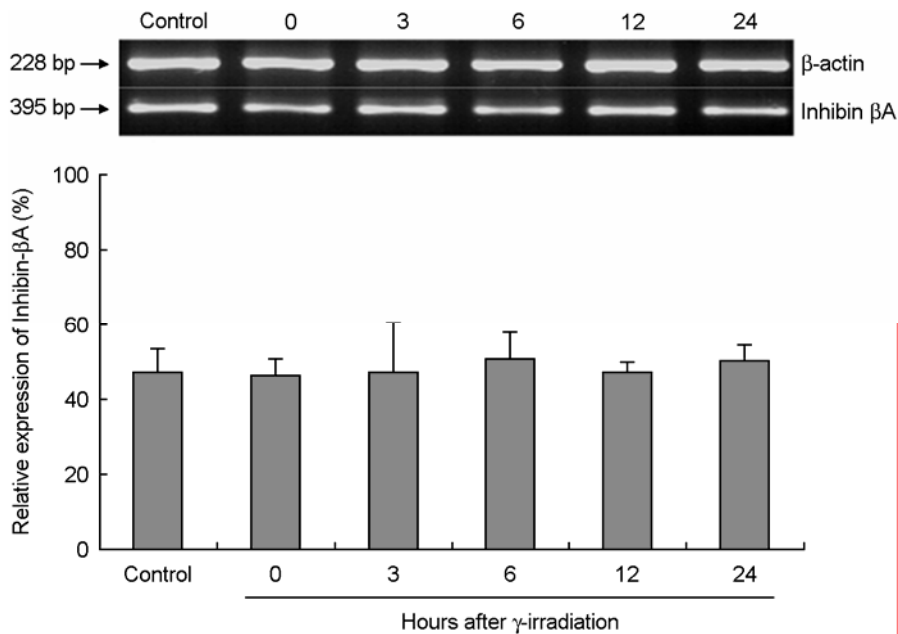


Figure 3. Electrophoretogram and its densitogram of RT-PCR products for inhibin- β A mRNA in the control and γ -irradiated mouse ovaries. The data was expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The ovarian expression of inhibin- β A mRNAs was not changed according to the time after the irradiation.

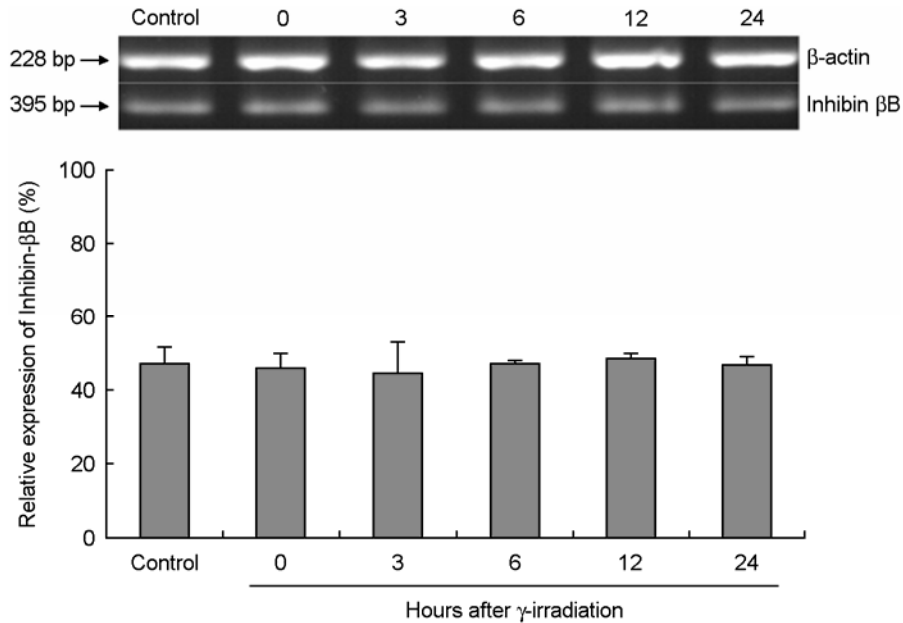


Figure 4. Electrophoretogram and its densitogram of RT-PCR products for inhibin- β B mRNA in the control and γ -irradiated mouse ovaries. The data was expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. The ovarian expression of inhibin- β B mRNAs was not changed according to the time after the irradiation.

질의 발현은 감소되었으며 24시간에서는 약하게 발현됨을 알 수 있었다.

2. RT-PCR

감마선을 조사하기 전 (control), 감마선 조사 직후 (0시간), 조사 후 3, 6, 12, 그리고 24시간 후에 RT-PCR로 확인한 난소 내 인히빈- α 소단위 유전자의 발현 변화를 조사하였다. Figure 2에 나타낸 바와 같이 감마선 조사 후 0, 3, 6, 12, 24시간에서 인히빈- α 유전자는 각각 2.1, 2.9, 4.0, 4.8, 4.5배 증가하였다. 또한 감마선 조사 후 3, 6, 12, 24시간에서의 발현 양은 조사 직후 (0시간)의 발현 양에 비해 1.4, 1.9, 2.3, 2.2배가 증가하였다. 그러나, 각각 Figure 3과 4에 나타낸 바와 같이, 인히빈 β A와 β B 유전자의 발현은 감마선 조사 후 시간에 따라 변화를 보이지 않았다.

고 찰

본 연구는 이온화 방사선인 감마선이 전신 조사된 미성숙 생쥐를 이용 시간에 따라 난소 내 인히빈

유전자와 단백질의 발현 변화를 조사하고자 시행되었다.

포유류에서 대부분의 난포가 배란되지 못하고 폐쇄되는 정확한 기전은 현재까지도 정확하게 규명되지 못한 실정에 있다. 본 실험에서 감마선은 난포의 인위적 폐쇄를 유발하고자 조사되었는데 방사선은 난포의 성장단계에 방사능에 따라 그 영향이 다르다고 알려져 있다.^{11,13,14} 생쥐의 생식세포에 대한 방사선 민감도는 연령에 따라 증가하며 난자 내 염색체의 이상 역시 증가한다.^{15,16} 더욱이 이온화 방사선은 세포자멸사를 유발하며,³⁰ 난소의 생리학적 활성화에 영향을 미친다.³¹ 특히 소아암으로 인해 방사요법을 받은 환자의 경우 난소의 기능부전이 유발되는 것으로 보고되었다.²⁸

FSH 분비를 조절하는 폴리펩티드로서 모두 난포액 내에 존재하는 것으로 확인된 것은 인히빈, 액티빈, 폴리스타틴이 있다. 인히빈은 난포 내 과립층 세포에서 합성되는 이형이량체의 폴리펩티드로서,³² 생식소 및 뇌를 포함하는 여러 조직에 분포하며 특히 난소 및 시상하부 기능에 관여한다.³³ 인히빈은 α 와 β A 혹은 α 와 β B가 결합하여 각각 인히빈 A와

인히빈 B를 구성한다.

성장을 개시한 전동난포에서 인히빈-B가 주로 분비되며 작은 동난포에서는 인히빈-B와 -A 모두가 분비된다.³⁴ 또한 난포기 전반기에 FSH 및 LH에 의해 자극된 모든 동난포에서 인히빈 A가 분비되며 난포기 후기에는 우성난포로부터 분비되는 것으로 알려져 있다.³⁵

인히빈- α 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 실시한 본 실험의 결과 인히빈- α 는 전동난포와 동난포의 과립층세포에서 분비되며 감마선 조사 후 시간에 따라 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 인히빈- β A와 - β B 유전자의 발현은 별다른 변화를 보이지 않은 반면, 인히빈- α 유전자는 감마선 조사 후 시간에 따라 유의하게 증가하였다. 감마선 조사 후 12시간까지는 면역반응성 인히빈- α 단백질의 과립층세포 내 발현 양이 대조군에 비해 별다른 감소를 보이지 않았지만, 24시간에서 인히빈- α 단백질의 발현 양이 감소된 것은 감마선에 의해 대부분의 난포가 퇴화된 때문으로 생각된다. 그러나, 감마선 조사 후 시간에 따른 인히빈- α 유전자의 발현 양은 대조군이나 0시간군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다. 이는 감마선에 의해 인히빈- α 유전자의 발현이 12시간까지 증가하지만 24시간에서 단백질로의 발현이 감소되는 때문으로 생각된다.

한편 혈청 내 인히빈의 농도 증가는 점액종양 (mucinous carcinoma)이나 과립막세포종양 (granulosa cell tumor)의 내 진단 표지로 이용되고 있다.^{26,27} 특히 과립세포암종에서 인히빈 α , β A, β B 소단위에 특이적인 면역조직화학 염색이 관찰되었으며,^{36,37} 혈청 내 인히빈의 양적인 증가가 확인되어³¹ 화학치료 후의 예후 판정에 대한 지표로서 이용되고 있다.^{38,39}

또한, 인히빈은 난포막세포에서의 안드로젠 생합성을 직접적으로 자극하고,⁴⁰ FSH를 선택적으로 저해하므로 혈중 인히빈의 농도가 높은 일부 환자에서 LH/FSH 비율이 증가한다. 이들 환자의 경우, 혈중 인히빈 B의 농도는 난소 기능부전의 정도와 연관을 갖는다.^{41,42}

본 연구에서 인히빈- α 유전자가 감마선 조사 후 시간에 따라 증가된 것은 흥미로운 결과이다. 따라서 감마선에 의한 난포의 퇴화에 인히빈이 생리학적 및 생화학적 역할을 할 것이라는 가능성을 배제

할 수 없다.

참 고 문 헌

1. Hirshfield AN, Midgley AR Jr. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 1978; 19: 597-605.
2. Braw RH, Tsafiriri A. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 267-72.
3. Hughes FM Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991; 129: 2415-22.
4. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 121-55.
5. Johnson AL, Bridgham JT, Witty JP, Tilly JL. Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-xlong gene expression. *Endocrinology* 1996; 137: 2059-66.
6. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
7. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 349-63.
8. Jarrell J, YoungLai EV, McMahon A, Barr R, O'Connell G, Belbeck L. Effects of ionizing radiation and pretreatment with [D-Leu6,des-Gly10] luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on developing rat ovarian follicles. *Cancer Res* 1987; 47: 5005-8.
9. Kim JK, Lee CJ, Song KW, Do BR, Yoon YD. Gamma-radiation accelerates ovarian follicular atresia in immature mice. *In Vivo* 1999; 13: 21-4.
10. Kim JK, Lee CJ. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse. *Mutat Res* 2000; 449: 33-9.
11. Lee CJ, Park HH, Do BR, Yoon Y, Kim JK. Natural

- and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary. *Anim Reprod Sci* 2000; 59: 109-17.
12. Lee CJ, Yoon YD. Gamma-radiation-induced follicular degeneration in the prepubertal mouse ovary. *Mutat Res* 2005; 578: 247-55.
 13. Ataya K, Pydyn E, Ramahi-Ataya A, Orton CG. Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists?: Preliminary observations. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 790-5.
 14. Jacquet P, Vankerkom J, Lambiet-Collier M. The female guinea pig, a useful model for the genetic hazard of radiation in man; preliminary results on germ cell radiosensitivity in foetal, neonatal and adult animals. *Int J Radiat Biol* 1994; 65: 357-67.
 15. Ronnback C. The age dependence of radiation sensitivity of the gonads of female mice. *Acta Oncol* 1988; 27: 399-405.
 16. Tease C, Fisher G. The influence of maternal age on radiation-induced chromosome aberrations in mouse oocytes. *Mutat Res* 1991; 262: 57-62.
 17. De Jong FH. Inhibin. *Physiol Rev* 1988; 68: 555-607.
 18. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8: 133-46.
 19. Burger HG, Farnworth PG, Findlay JK, Gurusinge CJ, Healy DL, Mamers P, Mason A, Robertson DM. Aspects of current and future inhibin research. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 997-1002.
 20. Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, et al. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 1988; 44: 1-34
 21. Illingworth PJ, Groome NP, Duncan WC, Grant V, Tovnanabutra S, Baird DT, McNeilly AS. Measurement of circulating inhibin forms during the establishment of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1471-5.
 22. Mather JP, Woodruff TK, Krummen LA. Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 201: 1-5.
 23. Findlay JK. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 1993; 48: 15-23.
 24. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; 360: 313-9.
 25. Matzuk MM, Kumar TR, Shou W, Coerver KA, Lau AL, Behringer RR, Finegold MJ. Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51: 123-54.
 26. Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J. Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinology* 1996; 137: 5463-7.
 27. Robertson DM, Stephenson T, Pruyers E, Burger HG, McCloud P, Tsigos A, et al. Inhibins/activins as diagnostic markers for ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 191: 97-103.
 28. Kumanov P, Nandipati KC, Tomova A, Robeva R, Agarwal A. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 786-812.
 29. Albano RM, Groome N, Smith JC. Activins are expressed in preimplantation mouse embryos and in ES and EC cells and are regulated on their differentiation. *Development* 1993; 117: 711-23.
 30. Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5307-14.
 31. Hendry JH, West CM. Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol* 1997; 71: 709-19.

32. Chapman RM. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. *Semin Oncol* 1982; 9: 84-94.
33. Schumer ST, Cannistra SA. Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1180-9.
34. Murata T, Takizawa T, Funaba M, Fujimura H, Murata E, Takahashi M, Torii K. Quantitative RT-PCR for inhibin/activin subunits: measurements of rat hypothalamic and ovarian inhibin/activin subunit mRNAs during the estrous cycle. *Endocr J* 1997; 44: 35-42.
35. Welt CK, Schneyer AL. Differential regulation of inhibin B and inhibin A by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 330-6.
36. Welt CK, Adams JM, Sluss PM, Hall JE. Inhibin A and inhibin B responses to gonadotropin withdrawal depends on stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2163-9.
37. McCluggage WG, Maxwell P, Sloan JM. Immunohistochemical staining of ovarian granulosa cell tumors with monoclonal antibody against inhibin. *Hum Pathol* 1997; 28: 1034-8.
38. Ala-Fossi SL, Aine R, Punnonen R, Maenpaa J. Is potential to produce inhibins related to prognosis in ovarian granulosa cell tumors? *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 21: 187-9.
39. Boggess JF, Soules MR, Goff BA, Greer BE, Cain JM, Tamimi HK. Serum inhibin and disease status in women with ovarian granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 64-9.
40. Stuart GC, Dawson LM. Update on granulosa cell tumours of the ovary. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15: 33-7.
41. Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwallier RH, Mason AJ. Effect of recombinant activin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 1206-11.
42. Hughesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet Gynecol Surv* 1982; 37: 59-77.
43. Pache TD, Chadha S, Gooren LJ, Hop WC, Jaarsma KW, Dommerholt HB, Fauser BC. Ovarian morphology in long-term androgen-treated female to male transsexuals. A human model for the study of polycystic ovarian syndrome? *Histopathology* 1991; 19: 445-52.

= 국문초록 =

목적: 본 연구의 목적은 난소 내 인히빈- α 단백질 발현과 인히빈 α , βA , 그리고 βB 유전자의 발현에 감마선이 미치는 효과를 연구하는 것이다.

연구방법: 미성숙 생쥐에 감마선을 치사량의 25% 효과로 전신 조사하였다. 감마선 조사 후, 0, 3, 6, 12, 24시간이 지나서 난소를 적출하였다. 적출한 난소를 이용하여, 인히빈 α 에 대한 면역조직화학 염색과 인히빈 α , βA , 그리고 βB 에 대한 RT-PCR을 수행하였다.

결과: 인히빈 α 면역양성반응성은 12시간 방사선 조사 후까지 유지가 되었고, 이후에 감소하였다. 인히빈 α mRNA의 발현은 방사선 처리 후에 유의하게 증가하였다. 그러나, 인히빈 βA 와 βB 의 mRNA의 발현은 유의한 변화가 나타나지 않았다.

결론: 인히빈은 감마선 조사로 유도된 생쥐난포 폐쇄에 조절적 요소로 작용하는 것으로 사료된다.

중심단어: 생쥐 난소, 난포, 인히빈, 방사선