

CHANGES OF THE CONCENTRATIONS OF STEROID HORMONES  
IN THE PORCINE FOLLICULAR FLUIDS ON ATRESIA

돼지여포의 퇴화과정 중 여포액 내  
스테로이드 호르몬 양의 변화

Young-Keun Lee and Yong-Dal Yoon

*Department of Biology, College of Natural Sciences  
Hanyang University, Seoul 133, Korea*

한양대학교 자연과학대학 생물학과

이 영 근 · 윤 용 달

- ABSTRACT -

In order to study the mechanism of follicular atresia, the follicles of the porcine ovary were isolated according to the presence or absence of the corpus luteum and their size, and then classified to the normal- or atretic-follicle on the morphological observation such as the transparency, the vascularization of follicle, the nuclear phase of oocyte, and the homogeneity of the granulosa cell layer. The viability of granulosa cells was examined. The concentrations of progesterone ( $P_4$ ), testosterone (T), and estradiol-17 beta ( $E_2$ ) in each follicular fluid were estimated by the radioimmunoassay.

The viability of granulosa cells in the atretic follicle was much lower than that of the normal one. The concentration of each steroid hormone increased as the follicular size was increased, was not different in quantity between the normal- and the atretic-follicle of which diameter was below 3mm, and were much higher in the atretic follicle than those in the normal one of which diameter was above 7mm. The ratio of the concentration of  $E_2$  to T in the large atretic follicle valued higher than that in the normal one, but smaller in the small and medium atretic follicle than that in the normal one.

The present study suggests that the mechanism of atresia of the large follicle may be different from that of the small and the medium follicle and that the amount of steroid hormones regarded as the one of the criteria for the atretic follicles.

## 서 론

포유동물의 여포는 시상하부-생식소를 잇는 축에 따른 내분비기능조절기작과 여포 내 내분비 환경요인에 의해 성장 성숙하여 배란하거나, 퇴화하여 소멸하게 된다.<sup>4,6,7,28,29,31</sup> 다배란성인 남미의 설치류 vizcacha의 경우는 300-700 개를 배란하나 대부분은 수정이 안되고, 착상이 되지 않거나 착상이 되더라도 재흡수된다.<sup>26</sup> 그러나 사람을 포함한 몇몇 유인원은 생식주기 중 한두 개만을 배란하며 일단 수정이 되면 정상적으로 착상을 한다. 즉 영장류는 출생 시 약 200만 개의 난자 중에서 일생 동안 400여개만이 성숙하여 배란하며, 나머지는 퇴화과정(atresia)을 통해 소멸된다.<sup>1</sup> 태아에서는 많은 난자들이 과립세포(granulosa cell)에 싸여지기 전에 퇴화가 일어나며, 신생아에서 그리고 사춘기(puberty)에 도달하기 전에는 대부분이 강소형성 전의 여포(preantral follicle)시기에서 퇴화가 시작된다.<sup>6,7</sup> 그러나 대부분의 성체 포유동물에서는 작은 antral follicles에서 퇴화가 발생하여 그 중의 일부만이 배란여포(ovulatory follicles)로 선택되어 진다.<sup>18</sup> 그러나 양과 같은 일부 종에서는 배란 직전의 여포(large preovulatory follicle)에서도 퇴화가 일어난다.<sup>8,15</sup> 또한, 퇴화현상은 생식 주기의 어느 상태에서도 발생한다고 보고되고 있다.<sup>4,5,29,31</sup> 그러나 여포의 퇴화가 시작되는 기작과 퇴화여포의 형태학적·기능적인 상호관계에 대한 연구가 미진한 상태이다.

일반적으로 퇴화초기에 여포 강소주위의 과립세포가 핵응축현상(pyknosis)을 일으키며<sup>6,7,8,15</sup>, 기저막 부위에 있는 과립세포(mural granulosa cell)는 염주알(beaded) 배열을 이룬다고 하였고, 이러한 두 부류의 과립세포들이 steroids 합성능력이 있어서 차이가 생겨 강소주위의 과립세포(antral granulosa cell)가 더 빨리 luteal cell로의 분화가 일어난다고 보고하였다.<sup>19</sup> 또한 대여포(large follicles)내의 협막세포(theca cell)가 비대생

장(hypertroph)하여 세포 내 지질함유량이 증가하게 되나, 소여포(small follicles)에서는 과립세포가 억제능력이 있음과 아울러 협막세포층의 기능적인 차이를 나타내어 준다.<sup>6</sup> 그러나 생화학적인 증거는 미비한 상태이다.

퇴화여포 내 난자는 과립세포에서 분리되거나(denuded ovum) 이상분열(fragmentation)되는 것으로 보고되고 있으나 원인은 불명한 상태이다.<sup>16,30</sup>

Louvet 등(1975)은 androgen이 퇴화의 주원인이라고 보고하였는데, 뇌하수체를 제거한 쥐에 androgen을 처리하면 과립세포의 핵응축현상이 증가하고 형태적인 균열을 초래한다고 보고하였다. 이 결과는 협막세포로부터 androgen이 많이 생성되어 과립세포층에 영향을 주는 때문이라고 가정된다.<sup>10,13,24</sup> 이는 배란 직전의 여포에서 일어나는 현상이나, 성장의 초기에 대부분의 여포에서 퇴화가 발생하는 데 그 기작은 불명한 상태에 있다.<sup>6,7</sup>

각각의 여포액 내에 존재하는 steroid hormones 양이 균일하지 않으며<sup>8</sup> 여포액 내의 hormones 환경이 여포의 성장·성숙에 있어서 주요한 요소일 것으로 보고하였다.<sup>3,13,17,21</sup> 위의 결과로 보아 여포액 내 hormones의 변화는 여포의 퇴화에 한 요인 또는 결과가 될 것으로 가정된다.

따라서 본 실험은 육안관찰과 조직학적인 협막세포층, 과립세포층의 형태적 양상, 그리고 난자의 핵상을 기준으로 여포의 퇴화상태를 판정하고 과립세포의 생존률과 여포액 내 steroid hormones 양을 측정하여 퇴화에 따른 형태적·기능적인 변화 양상을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

돼지의 난소를 도살장(서울, 마장동, 우성농역주식회사)에서 도살직 후 적출하여 얼음상자에 넣어 30분~1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소를 4°C 또는 0°C로 유지하면서 황체의 유무에 따라 난소를 구분하고, 각각의 난소로부터 분리해낸 여포를 해부현미경 하

에서 혈관분포, 투명도, 과립세포층의 균일성, 그리고 크기를 기준으로 구분하였다. 즉, 황체가 있는 것 (corpus luteum, CL) 과 없는 것 (non corpus luteum, NCL) 으로 나누고 크기별로 소 (small, 직경 < 3 mm), 중 (medium, 직경 4 ~ 6 mm), 대 (large, 직경 > 7 mm) 여포로 구분하였다. 또한 혈관분포가 왕성하고 여포액이 투명하며 과립세포층이 균일한 경우를 정상 여포군 (normal) 으로, 혈관이 위축되어 있고 여포액이 불투명하며 과립세포층이 불균일한 경우를 퇴화여포군 (atretic) 으로 분류하였으며 구별이 곤란한 중간 상태의 것은 판정에서 제외하였다.

정상과 퇴화여포군을 형태적으로 판정하여 각 여포의 생리학적 차이를 연구하기 위하여 각각의 여포를 1 ml 의 인산완충용액 (assay buffer, pH 7.2 - 7.4) 내에서 터뜨려 난자 (oocyte) 는 핵상을 관찰하였다. 여포액과 인산완충용액에 희석된 과립세포는 1000 X g 에서 10 분간 원심분리시켰다 (Minifuge GL, Heraeus Christ) 침전된 과립세포는 생존율을 측정하였고 상층액은 저온냉동기 (Deep freezer, So-Low Environmental Equip. Co.) 에 -60 °C 로 보관하였다가 steroid hormones 의 정량분석에 사용하였다.

또한, 육안으로 판정한 여포를 저온냉동기에서 급냉동시킨 후 Oxberry and Greenwald (1982) 의 방법을 변경하여 조직절편을 만들었다.<sup>25)</sup> 즉, 냉동절편기 (Histostat, American Optical, Model 1950) 를 이용하여 8 μm 의 두께로 절편을 만들어 slide 에 올린 후 Carnoy 고정액 (glacial acetic acid : ethyl alcohol = 1:3, v/v) 으로 18 ~ 24 시간 동안 고정시켰다.

absolute ethyl alcohol (Merck) 로 1 분간 2 회 처리 후 70 % ethyl alcohol 까지 serial 하게 각각 1 분 동안 처리하여 수화 (hydration) 시키고, hematoxylin (American Products Co.) 으로 3 분간 염색하고 증류수로 세척한 후 다시 eosin (Hartman - Ledd-on Co.) 으로 30 초 동안 염색하였다.

수화과정의 역순으로 탈수 (dehydration) 시킨 후 xylene 으로 5 분간 2 회에 걸쳐 alcohol 과 치환하고 Canada balsam (Wako Pure Chemical Co.) 을 이용하여 영구표본을 만들었다. 여포절편의 외직경에 대한 과립세포층과 접막세포층의 두께의 비율은 쌍안현미경 (Olympus, Model BHA-413) 내에 micrometer 를 장치하여 측정하였다.

난자의 핵상관찰은 난자를 수집한 후 Tsaf-riri 와 Channing (1975) 의 방법을 변용하여 실시하였다.<sup>30)</sup> vaseline (청계약품) 과 paraffin wax (오사카 약리화학공업) 를 9:1 로 혼합한 wax 를 slide (So Young, 26 X 76 mm, thickness No 1; 1 mm) 위에다 정방형으로 4 방울 떨어뜨린 후, 수집한 난자를 slide 위에 올려놓고 cover slip (So Young, 22 X 22 mm, thickness No 1; 0.13-0.17 mm) 을 덮어 눌러 난자가 이동하지 못하도록 압박하였다.

slide 는 고정액 (glacial acetic acid : ethyl alcohol = 1:3, v/v) 이 들어 있는 Coplin jar 에 넣어 19 ~ 24 시간 동안 고정시켰다. 핵상관찰을 위하여 0.5 % lacmoid (Allied Chemical, in 45 % glacial acetic acid) 로 5 분 동안 염색하였다. 45 % 빙초산으로 세척하고 Canada balsam 으로 mounting 한 후 핵상을 관찰하였다. 핵상은 현미경 (Leitz Dialux 20EB, Leitz and Heraeus Christ) 하에서 microfilm (Fuji, ASA 32) 을 이용해 촬영하고 Iifospeed 용액 (Iiford) 으로 5 분 동안 현상한 후 enlarger (Leitz Format IIC) 로 4 배 확대한 후 Iifospeed 인화지로 인화했다.

과립세포의 생존율 측정은 Metcalf (1982) 의 방법을 변용하여 실시하였다.<sup>22)</sup> 즉, 난자를 채취한 후 나머지 여포액을 제거하고 0.8 % NaCl 용액으로 resuspension 시킨 용액에서 20 μl 를 취하여 100 μl 의 nigrosin 용액 (Sigma Chemical Co., 1 % nigrosin:0.85 % NaCl = 1:10, v/v) 으로 5 분간 염색하여, haemocytometer (Neubauer, Superior) 상에서 살아 있는 세포수와 총세포수를 측정하

여 백분율로 환산하였다.

steroid hormones 의 tracer 를 순수하게 분리하기 위하여 column chromatography 를 실시하였다. Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) 6g 을 30ml 의 전개용매 (cyclohexane : chloroform : ethyl alcohol = 15:2:4, v/v) 에 용해해서 하룻밤 방치한 후 colum 에 packing 하여 하룻밤 방치한다.

1, 2, 6, 7 -  $^3\text{H}$ -progesterone (spec. act. 110 Ci/mmol, TRK 413, Batch 29, Amersham) 과 1, 2, 6, 7 -  $^3\text{H}$ -testosterone (spec. act. 88.5 Ci/mmol, TRK 402, Batch 30, Amersham) 및 2, 4, 6, 7 -  $^3\text{H}$ -estradiol (spec. act. 98 Ci/mmol, TRK 322, Batch 52, Amersham) 을 각각 50  $\mu\text{Ci}$  씩 cone tube 에 옮기고 37 °C 정온수조에서 정화된 공기를 공급하면서 증발시켰다. 각 시료는 다시 0.5ml 의 전개용매에 녹인 후 Sephadex LH-20 column (0.9 X 23 cm) 에 적용하여 전개하였다. 각각은 1 혹은 2ml 씩의 분획으로 받고 순수정제된 tracer 분획을 증발시킨 후 90% ethyl alcohol 로 희석하여 보관하였다.

항체는 WHO Matched Reagents Program 에 의해 얻어진 것과 Dr. Aakvaag (Aker Sykehus, Norway) 으로부터 기증된 것을 이용하였다. progesterone, testosterone 그리고 estradiol antibody 등은 최종적으로 1:2000, 1:210000, 그리고 1:10000 으로 희석하였다. assay buffer 는  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (19.6 mM, Merck),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (81.7 mM, Merck),  $\text{NaCl}$  (15.6 mM, Merck), Mertiolate (0.25 mM, Sigma) 그리고 gelatin (1 g, Sigma) 을 혼합하여 제조하였다. 항원·항체결합형과 항원을 분리하기 위하여 Dextran coated charcoal (DCC) 을 사용하였다. DCC 는 Dextran T-70 (Pharmacia) 0.0625g 과 charcoal (Amend Co., 'Norit' A) 0.625g 을 100ml 의 assay buffer 로 용해시켜 제조하였다. scintillation solution 은 22.5g 의 2,5-diphenyl-

xazole (PPO, New England Nuclear) 를 3 l 의 toluene (Merck 혹은 Rots) 에 용해시킨 후 1.5 l 의 Triton X-100 (NEN 혹은 Shinyo) 을 가해 제조하였다.

steroid hormones 분석은 윤 (1981) 이 개발한 방사면역측정법 (radioimmunoassay) 으로 시행하였다.<sup>33)</sup> 여포액 50 - 500  $\mu\text{l}$  와 recovery 용 steroid tracer (약 1000 cpm) 100  $\mu\text{l}$  를 시험관 (15 X 160 mm) 에서 혼합하고 diethyl ether (Squibb and Sons) 5ml 을 첨가하였다. 이들 시험관들을 교반기 (Lab-shaker, Model C-SGM) 30분 간 250 rpm 으로 흔들어 섞은 후 실온에서 10분 간 방치하여 수용액층과 ether 층을 분리시켰다. 이를 dry ice - acetone bath 나 저온냉동기 (-60 °C) 에서 얼려 상층액을 cone tube (15 X 120 mm) 에 옮기고 37 °C 항온수조에서 ether 를 증발시켰다. 증발되어 건조한 추출물에 다시 4 ml 의 assay buffer 를 첨가하고 1분 간 vortex mix 하여 10분 간 방치하였다. 이 중에서 progesterone, testosterone, estradiol 그리고 recovery collection 의 분석용으로 각각 500  $\mu\text{l}$  를 사용하였으며 nonspecific binding (NSB) 과 total count (Tc) 시험관에는 각각 600  $\mu\text{l}$  와 800  $\mu\text{l}$  의 assay buffer 를 첨가하였고, 다른 모든 시험관에는 100  $\mu\text{l}$  의 항체와 100  $\mu\text{l}$  의 steroid tracer 를 첨가하였다. 모든 시험관을 충분히 vortex mix 하여 16 - 20 시간 동안 냉장실 (4 °C) 에서 항원항체반응을 유발시켰다. 항원항체의 결합형을 분리하기 위하여 Tc 를 제외한 모든 시험관에 200  $\mu\text{l}$  의 DCC 를 첨가하고 충분히 vortex mix 하여 냉장실 (4 °C) 에 15분 간 방치한 후 2000 X g, 4 °C 에서 5분 동안 원심분리시켰다. 상층액 일정량을 10ml 의 scintillation solution 이 들어 있는 counting vial 에 옮겨서 beta counter (Packard, Tri-Carb Scintillation Spectrophotometer, Model 4530, counting efficiency: 57%) 로 방사능을 측정 하였다.

progesterone 의 cross reactivity 는 다음

과 같았다.

cortisol, 0.001% : testosterone, 0.2% : 17 - alpha - hydroxy - progesterone, 3.0% : 5 - alpha - dihydroprogesterone, 7% : 20 - alpha - dihydroprogesterone, 3.0%. testosterone의 cross reactivity는 다음과 같았다. 5 - alpha - dihydrotestosterone, 14% : delta - 4 - androstenedione, 0.8% : cortisol, 0.0001% : 5 - alpha - androstenediol, 6% : delta - 5 - androstenediol, 2.1%. estradiol의 cross reactivity는 다음과 같았다. estrone, 1.7% : testosterone, 0.0003% : cortisol, 0.0001%.

본 실험의 결과에 대한 유의성 검정은 student's - *t* - test 방법에 따랐다.

본 실험에 사용할 progesterone, testosterone 그리고 estradiol 등의 추적자를 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용해 순수 분리한 결과를 Fig.1에 나타내었다.

## 결 과

본 실험에 사용할 progesterone, testosterone 그리고 estradiol 등의 추적자를 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용해 순수 분리한 결과를 Fig.1에 나타내었다.

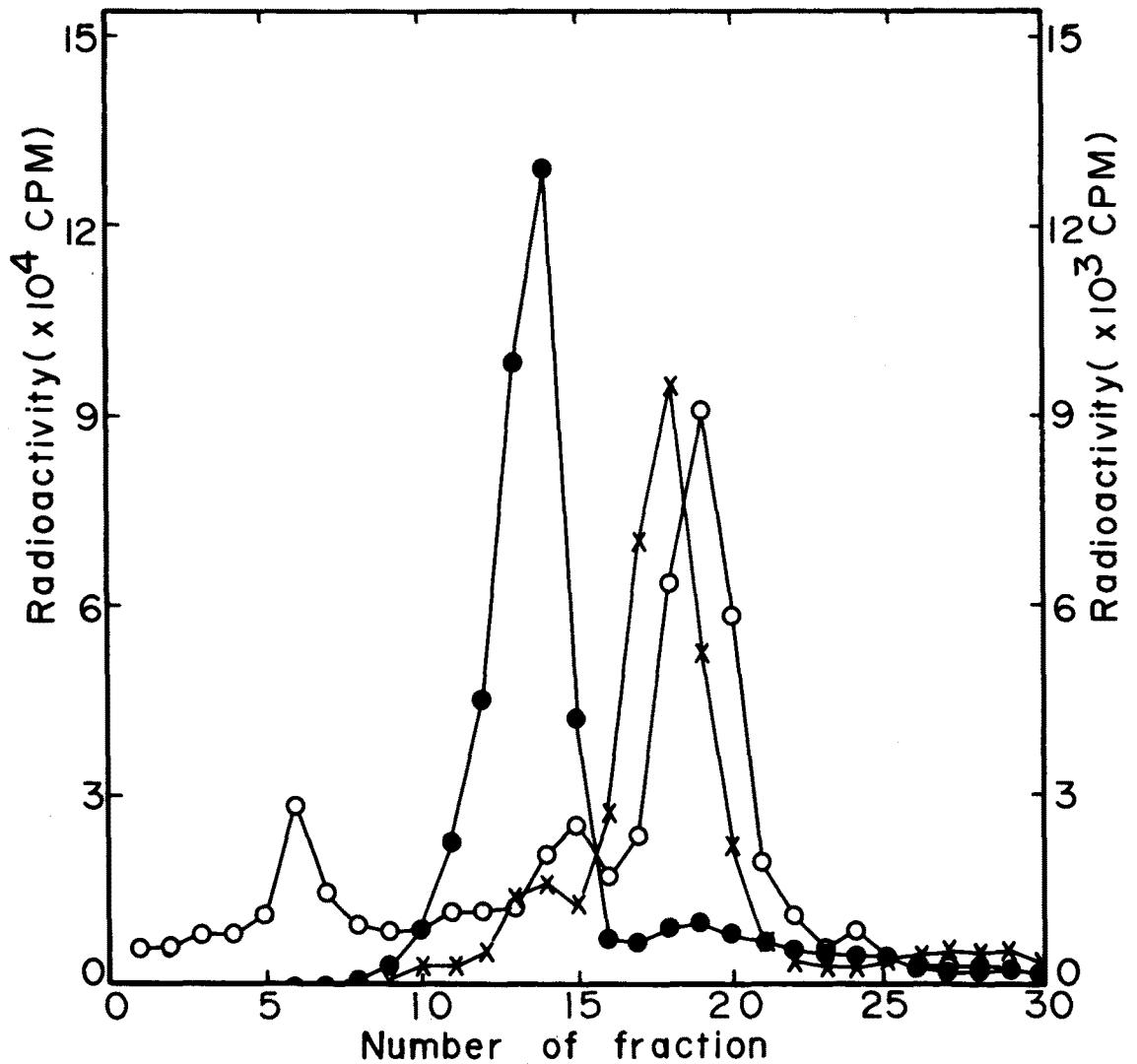


Fig.1. Elution patterns of steroid tracers with LH-20 liquid column chromatography. Steroid tracers were applied to the Sephadex LH-20 column (0.9 x 23cm) and collected by 1 ml (1,2,6,7-<sup>3</sup>H-progesterone, ●—●, and 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-testosterone, X—X) or 2 ml (2,4,6,7-<sup>3</sup>H-estradiol, ○—○) of each fraction. The radioactivity of right column represents that of estradiol-17 beta.

progesterone 은 14 분획에서 정점을 이루었는데 본 실험에 사용한 12 - 15 분획의 회수율은 78.88 %이었다. 또한, testosterone 은 18 분획에서 정점을 보였으며 본 실험에는 제17-19분획을 사용하였는데 회수율은 58.72 % 이었다. estradiol 은 제 19 분획에서 정점이 나타났으며 본 실험에서는 제 18 - 20 분획을 이용하였는데 회수율은 43.76 %이었다.

Table 1. The ratio of the thickness of each follicular cell layer to that of whole follicle fragment.

Cell Layer		Atretic Follicles		
		Small	Medium	Large
Theca Externa	Thick	3.00 ± 0.30	2.50 ± 0.28	4.14 ± 0.53
	Thin	1.40 ± 0.12	1.53 ± 0.17	1.09 ± 0.13
Theca Interna	Thick	4.34 ± 0.44	2.83 ± 0.38	2.75 ± 0.30
	Thin	3.40 ± 0.32	1.42 ± 0.14	0.98 ± 0.11
GC Layer	Thick	7.61 ± 0.44	4.32 ± 0.38	5.97 ± 0.60
	Thin	4.26 ± 0.37	2.17 ± 0.19	1.89 ± 0.20

The thickness of theca interna, theca externa and granulosa cell layer is divided by that of total diameter of follicle fragment. Thick (thin) represents the width of follicle cell layers and data Mean ± SEM (μm).

퇴화여포를 냉동하여 자른 절편을 관찰한 결과를 Table 1 로 나타내었다. 대여포 (직경이 7mm 이상인 여포)에서는 여포절편의 외직경에 대한 외협막층 (TE, theca externa)의 비율이 중여포(직경 4-6mm인 여포)보다 1.4 배 높았다. 그리고 여포절편의 외직경에 대한 내협막층 (TI, theca interna)의 두께의 비율은 대

여포와 중여포에서는 같았으나 소여포에서 보다는 1.6 배 낮았다. 또한 여포절편의 외직경에 대한 과립세포층의 두께의 비율도 소여포에서보다 대여포에서 0.78 배로 감소하였다. 그러나 퇴화군의 대여포에서는 정상군에 비해 외협막층이 0.65 배로, 중여포에서는 0.79 배, 소여포에서는 0.73 배로 감소되는 경향을 보였다.

Table 2. Comparison of the viability of the granulosa cell in the normal and the atretic follicles.

Group	Counting Number	Viability (%)
Corpus luteum absent		
Normal		
Small (NSN)	54	74.48 ± 1.26
Medium (NMN)	25	71.48 ± 1.40
Large (NLN)	36	73.36 ± 1.22
Atretic		
Small (NSA)	59	69.26 ± 1.33
Medium (NMA)	54	63.81 ± 1.31
Large (NLA)	46	65.22 ± 1.46
Corpus luteum present		
Normal		
Medium (CMN)	20	57.45 ± 2.35
Large (CLN)	20	66.71 ± 1.75
Atretic		
Medium (CMA)	18	49.66 ± 3.16
Large (CLA)	20	43.20 ± 1.62

The viability of the granulosa cells was examined by staining with 0.1% of nigrosin for 5 min.. The ratio of the number of viable cell to that of total cell was measured by the haemocytometer (NEUBAUER, Superior). Data represent Mean ± SEM.

과립세포의 생존율은 table 2로 요약하였다. 황체가 없는 여포에서는 여포의 성장에 따른 차이가 없으나 대체적으로 퇴화여포군의 과립세포 생존률이 현저하게 저하되었고 대여포의 퇴화군에서는 현격한 생존률의 감소를 보였다 (P < 0.01). 또한, 여포의 상태와 무관하게 황체가 있는 여포군에서 보다 황체가 없는 여포군에서 월등히 높은 생존률을 나타내었다 (P < 0.05).

각 군의 여포액 내 progesterone 의 농도를 Fig. 2로 나타내었다. 황체가 없는 정상여포군에서는 여포의 크기에 따라 현저히 증가하였으나 황체가 있는 정상여포군에서는 퇴화여포군과 차이가 없었다. 황체가 없는 퇴화여포군에서도 여포의 크기가 커짐에 따라 증가하는 양상을 보였으나 황체가 있는 퇴화여포군에서는 크기에 따라 변하지 않았다.

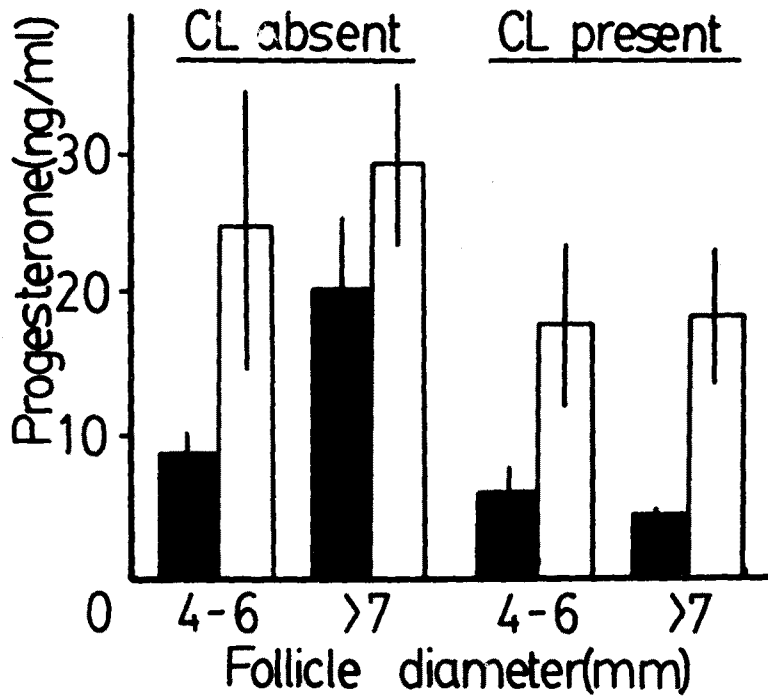
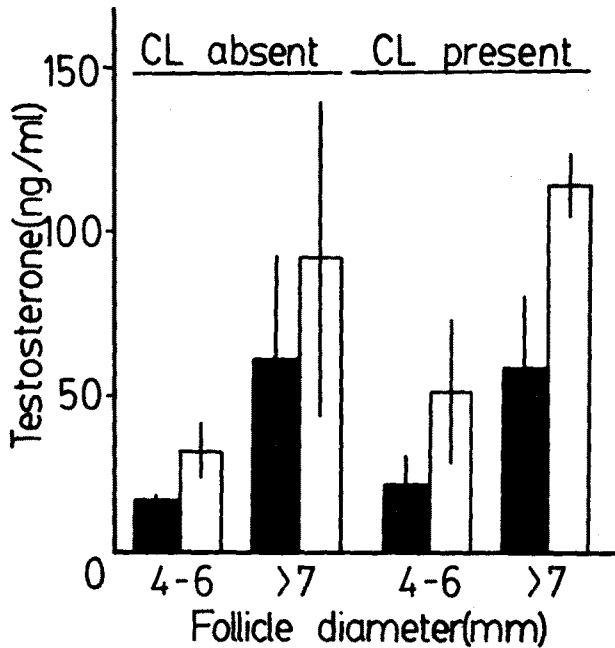


Fig. 2. The concentration of progesterone in the follicular fluid of the healthy and the atretic follicles of the porcine ovaries. The ovaries were grouped by the presence or absence of corpus luteum (CL) and then the isolated follicles were classified by the

largest diameter as medium (4-6 mm) or large (above 7 mm) follicle. The progesterone levels were determined in the normal (black column) and in the atretic (white column) follicle. The vertical bars show the standard errors of the means.

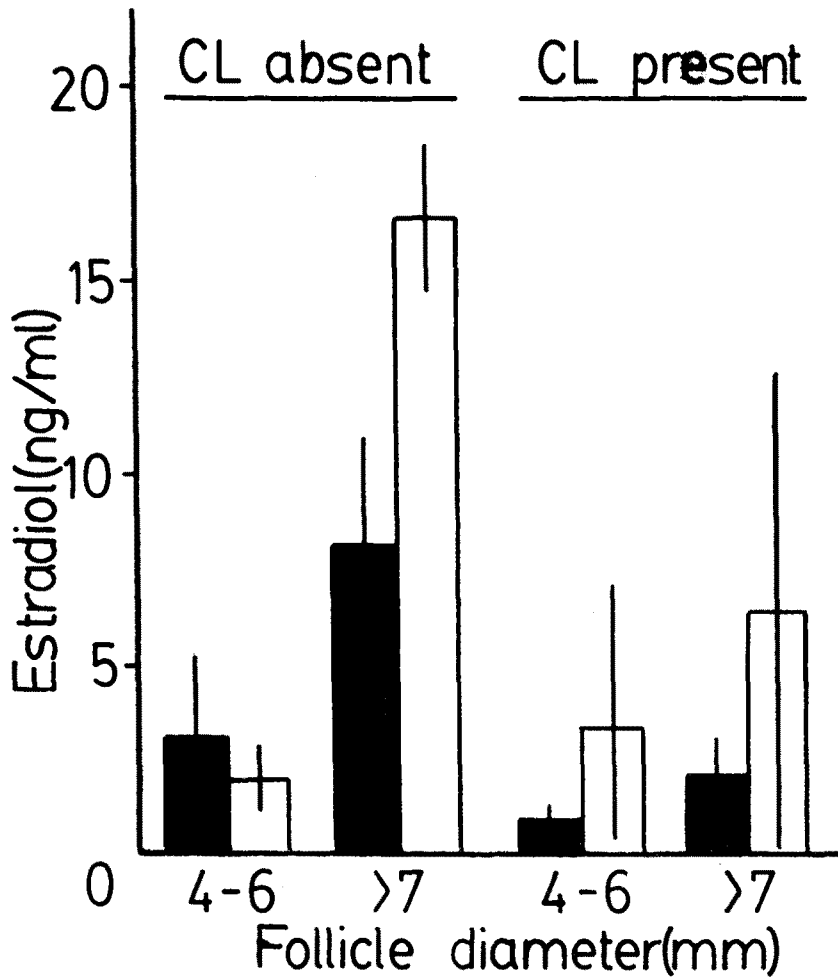




**Fig.3.** The concentration of testosterone in the follicular fluid of the healthy and the atretic follicles of the porcine ovaries. Legends are the same ones described in Fig.2. Black columns in the histogram, the values in normal follicle; white columns, those in atretic follicle.

커짐에 따라 증가하였는 데 황체가 없는 경우, 중여포( $16.4 \pm 2.8 \text{ ng/ml}$ )에 비하여 대여포는 3.6배 증가하였고, 황체가 있는 경우 대여포( $56.4 \pm 24.0 \text{ ng/ml}$ )는 중여포의 2.6배 증가된 것을 관찰하였다. 또한 퇴화여포군에서도 여포의 크기에 따라 증가하는 양상을 보였다. 특히 황체가 없는 각각의 여포에서 보다 황체가 있는 각각의 여포에서 현저히 높은 농도를 함유하고 있었다.

여포액 내 testosterone 의 농도를 Fig.3로 나타내었다. 정상인 여포에서는 여포의 크기가



**Fig.4.** The concentration of estradiol in the follicular fluid of the healthy and the

atretic follicles of the porcine ovaries. Legends are described in Fig.7.

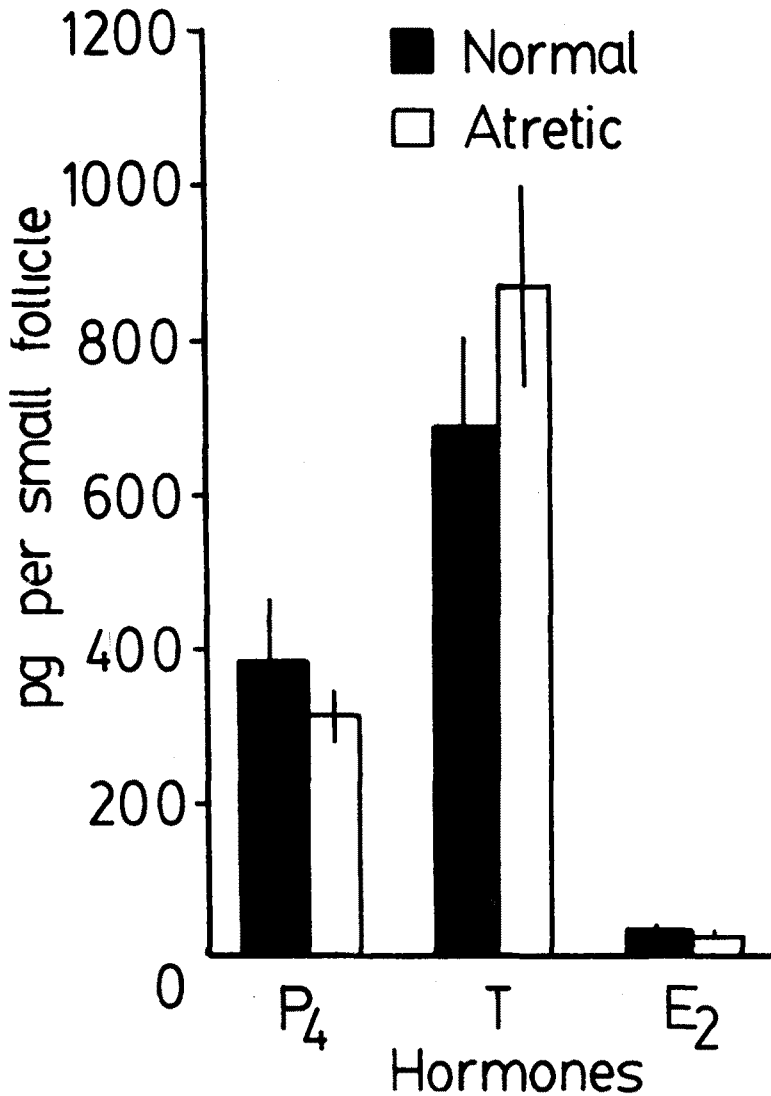


Fig.5. The concentration of steroid hormones in small follicles of healthy or atretic follicles.

The concentration of steroid hormones such

as progesterone (P<sub>4</sub>), testosterone(T), and estradiol-17 beta(E<sub>2</sub>) in the normal (black column) and the atretic (white column) follicles were determined by radioimmunoassay.

estradiol의 농도는 황체가 없는 난소에서 여포의 크기가 증가함에 따라 중여포에 비하여 대여포가 2.7 배 증가하였으며, 황체가 있는 난소 내 여포에서는 변동이 없었다 (Fig.4). 황체가 없는 난소에서 퇴화여포군의 여포액 내 estradiol 양이 현저히 높아지는 경향을 보였다. 소여포의 정상과 퇴화군 내의 hormones 의

농도를 Fig.5 로 요약하였다. 소여포 내 T의 농도는 정상여포군 (687.1 ± 127.7 pg/follicle)에 비해 퇴화여포군이 1.3 배 높았으나 P<sub>4</sub>의 농도는 퇴화여포군이 정상여포군에 비해 낮은 농도를 나타내었다. 한편 E<sub>2</sub>의 농도는 큰 차이를 나타내지 않았다.

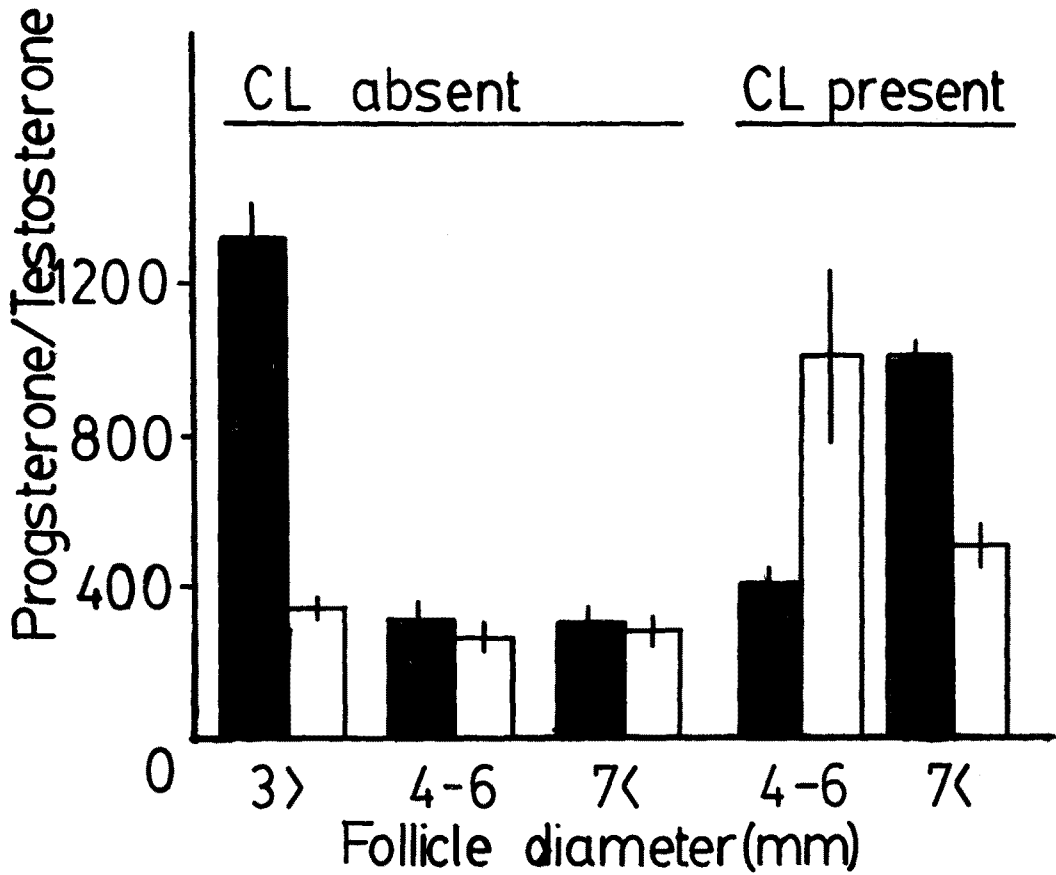


Fig.6. The ratio of the concentration of progesterone to testosterone in the follicular fluid of the healthy and the atretic

follicles.

Legends are described in Fig.2.

황체가 있는 여포에서는 중여포의 퇴화군의 비율이 정상여포군보다 현저히 높은 반면 대여포에서는 반대현상을 나타내었다.

$E_2$  와  $P_4$  농도의 비율 ( $100 \times E_2 / P_4$ ) 은 Fig. 7에 나타내었다. 황체가 없는 여포군에서 황체가 있는 난소 내 여포에 비해 높게 나타났으며 특히 정상군에서 4배 이상 높았다. 황체가

$P_4$  와 T의 농도와의 비율 ( $100 \times P_4 / T$ ) 은 황체가 없는 여포군 내의 비율이 황체가 있는 여포군 내의 비율보다 월등히 낮았다(Fig.6).

없는 중여포의 퇴화군에서는 정상군이 높은 것으로 나타났다.

$E_2$  와 T 농도와의 비율 ( $100 \times E_2 / T$ ) 을 Fig.8로 나타내었다. 황체의 유무에는 관계없이 여포의 성장에 따라 증가하였는데 중여포군에서는 정상여포군의 비율이 퇴화여포군의 비율보다 높은 반면 대여포군에서는 특히 황체가 있는 난소의 퇴화여포군 내의 비율이 높은 양상을 보였다.

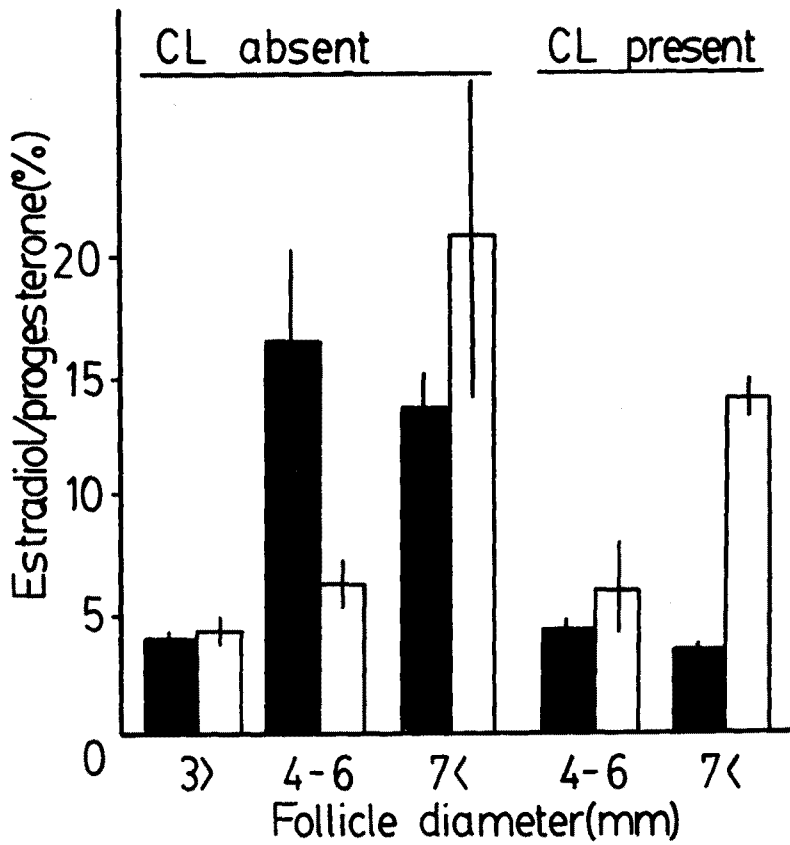


Fig.7. The ratio of the concentration of estradiol to progesterone in the follicular fluid of the healthy and the atretic

follicles. Legends are the same ones as those of Fig. 2.

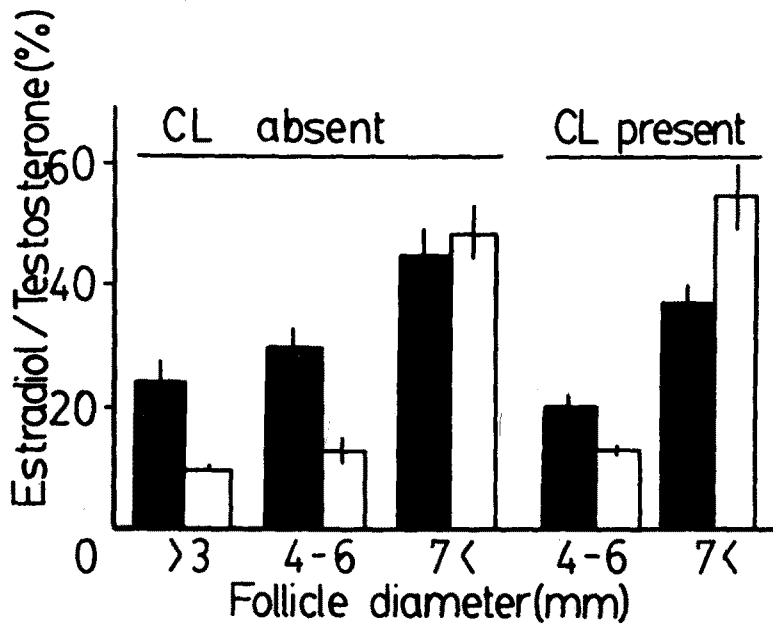


Fig.8. The ratio of the concentration of estradiol to testosterone in the follicular fluid of the healthy and the atretic

follicles. Legends are the same ones as those of Fig. 2 .

## 논 의

크기와 성장 상태가 서로 다른 여포에서 과립세포의 생존율을 조사하는 것은 여포의 성장·성숙에 수반되는 생리적 기능과의 연관성을 알아보는 데 유익한 방법이 된다. McNatty등(1979)은 사람의 여포의 크기에 따른 과립세포수의 변화를 조사하였는데 월경이 시작된 후부터 배란 전 시기에 이를 때까지 직경은 6배가 증가되며 과립세포의 수는 약 50배 가량 증가한다고 하였다. 그러나 본 실험결과 여포의 성장에 따른 생존률의 변화가 없는 것으로 보아 여포액 내 hormone 이 과립세포의 생존률에 직접 관여하지 않는 것으로 추론된다. 또한 여포의 크기가 성장함에 따라 외직경에 대한 과립세포층의 두께가 감소하는 것으로 보아 단위체적당 과립세포의 농도는 오히려 성장에 따라 감소되는 것으로 사료된다. 그리고 퇴화여포의 과립세포 생존률이 현저히 감소하는 반면 hormones 의 농도는 대체적으로 증가하는 것으로 보아 이들은 퇴화여포의 외협막세포층에서 생성되어 여포액 내로 유입되어진 것으로 추정된다.

Falck(1959)는 과립세포, 협막세포, 간층세포(interstitial cell) 그리고 황체세포(luteal cell)를 안전방(eye chamber)에 이식시킨 결과 협막세포 혹은 간층세포는 과립세포 혹은 황체세포와 함께 이식하였을 때에만 estrogen을 생성한다는 것을 보고하였다.<sup>12)</sup> 그리고 Bjersing(1978)과 Dorrington등(1975)은 testosterone 이 협막세포로부터 생성 유리된 후 확산되어져 과립세포에서 estradiol 로 aromatization 된다는 가설을 제시하였다.<sup>2,9)</sup> 그러나 Haney and Schomberg(1981)는 preovulatory follicle 에서 과립세포를 흡입해 내 버리고(aspiration) in vitro 에서 배양했을 때 estrogen 이 생성되는 것을 관찰하고 협

막세포만이 estradiol 의 생성장소임을 주장하였다.<sup>14)</sup>

또한, Moon(1978)과 Erickson and Hsueh(1978)은 배양액 속에 testosterone 과 FSH를 첨가하면 과립세포에서도 estrogen이 생성됨을 발견함으로써 협막세포 과립세포가 공히 estradiol 을 합성할 능력이 있을 것이라고 밝혔다.<sup>10,23)</sup> 일반적으로 퇴화의 주원인은 androgen이 estrogen으로 전환되지 않고 여포액 내 축적되는 것으로 보고되어 왔다.<sup>2,9,20)</sup> 또한 협막세포에서 생성된 androgen이 직접적으로 과립세포층에 영향을 줄 것으로 알려져 왔다. 그러나 본 실험의 결과에서 퇴화여포에서 여포절편 총길이에 대한 과립세포층의 두께 비율이 감소하고 외협막세포층의 두께 역시 감소하는 반면 P<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub> 각 hormones 의 농도가 높은 것은 위의 결과들과 일치하지 않는다. 그리고 P<sub>4</sub>에서 T로의 전환을 보면 소·대여포에서는 P<sub>4</sub>/T의 생성이 상대적으로 많이 감소하였다. 그리고 E<sub>2</sub>/T 비율은 대여포를 제외하고 전부 낮은 것으로 보아 T에서 E<sub>2</sub> 로의 전환이 느리게 이루어진다는 것으로 가정된다.

대여포의 퇴화군에서 과립세포의 생존율은 정상군에 비해 감소하나 E<sub>2</sub>/T의 비율이 높은 것으로 보아 과립세포 내에서만 E<sub>2</sub> 를 생성하여 여포액 내로 배출하지는 않고 협막세포에서 생성된다는 가정이 가능할 것으로 생각된다.<sup>11,14)</sup> 그러나 중·소여포의 퇴화군에서 과립세포의 생존률은 정상에 비해 감소하나 E<sub>2</sub>/T의 비율은 감소하며 T의 농도가 높은 경향을 띠는 것으로 보아 E<sub>2</sub> 에로의 전환이 느리게 진행되는 것으로 생각된다. 이는 여포가 성장·성숙함에 따라서 생식소자극 hormones 에 대한 협막세포 내의 수용체의 변화에 의해 초래된다는 가정을 가능하게 한다.<sup>27,32)</sup> 그러므로 대여포와 중·소여포와의 기능적인 퇴화양상이 다르다고 생각되는

바  $E_2/T$  비율이 높은 대여포는 퇴화 상태의 여포라고 판정할 수 있으나 중·소여포에서는 퇴화군을 선별하는 데 또 다른 요소가 있을 것으로 사료된다.

본 실험의 결과로 분리 여포의 육안 관찰, 여포 난자의 핵상 관찰, 과립세포의 생존률, 그리고

여포액 내 steroid hormones 농도측정을 종합하는 것은 퇴화 상태의 여포를 선별하는 데 유익할 것으로 사료되며 수반된 퇴화요소와 퇴화기작에 대한 전반적인 연구가 진전되어야 할 것이다.

## REFERENCES

1. Baker, TG: *A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. Proc. R. Soc. Lond (Biol) 158: 417-433, 1963.*
2. Bjersing, L: *Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In "The vertebrate ovary" (ed) JE Jonse. New York: Plenum, P.181-214, 1978.*
3. Brailly, S, A Gougeon, E Milgrom, O Bomsel-helmreigh and E Papiernik: *Androgens and progestins in the human ovarian follicle: differences in the evolution of preovulatory, healthy nonovulatory, and atretic follicles. J. Clin. Endocr. Metab. 53: 128-134, 1981.*
4. Brand, A and WHR deJong: *Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrous cycle of the sheep. J. Reprod. Fertil. 33: 431-439, 1973.*
5. Braw, HR, AG Byskov, H Peters and M Faber: *Follicular atresia in the infant human ovary. J. Reprod. Fert. 46: 55-59, 1976.*
6. Byskov, AG: *Follicular atresia. In "The vertebrate ovary" (ed) RE Jones. New York: Plenum, P.533-562, 1978.*
7. Byskov, AG: *Atresia. In "Ovarian follicular development and function" (eds) AR Midgley, Jr., and WA Sadler. New York: Plenum, p.41-58, 1979.*
8. Carson, RS, JK Findlay, IJ Clarke and HG Burger: *Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. Biol. Reprod. 24: 105-113, 1981.*
9. Dorrington, JH, YS Moon, and DT Armstrong: *Estradiol-17 beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. Endocrinology. 97: 1328-1331, 1975.*
10. Erickson, GF and AJ Hsueh: *Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. Endocrinology. 102: 1275-1282, 1978.*
11. Evans, G, M Eobis, GJ King and T Armstrong: *Estrogen, androgen, and progesterone biosynthesis by theca and granulosa of preovulatory follicles in the pig. Biol. Reprod. 25: 673-682, 1981.*
12. Falck, B: *Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. Acta. Physiol. Scand. (Suppl) 163, 47: 1, 1959.*
13. Fortune, JE and ET Armstrong: *Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. Endocrinology. 100: 134-1347, 1977.*
14. Haney, AF and DW Schomberg: *Estrogen and progesterone production by developing porcine follicles in vitro: evidence for estrogen formation by theca. Endo-*

- crinology. 109: 971-977, 1981.
15. Hay, MF, DG Cran and RM Moor: *Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. Cell Tissue Res. 169: 515-529, 1976.*
  16. Hillensjo, T, A Schwartz-Kripner, SH Pomerantz and CP Channing: *Action of porcine oocyte maturation inhibitor in vitro: possible role of the cummulus cells. In "Workshop on ovarian follicular and corpus luteum function" (eds) Channing, CP, J Marsh, and WA Sadler. New York: Plenum, p.283-292, 1978.*
  17. Hiller, SG, LE Reichert and EV Van Hall: *Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. J. Clin. Endocr. Metab. 52: 847-856, 1981.*
  18. Hirshfield, AN and AR Midgley, Jr.: *The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. Biol. Reprod. 19: 606-611, 1978.*
  19. Lahteenmaki, P, R Lobo, RP Marrs, WE Gibbons, RM Nakamura and GS diZerega: *Characterization of porcine granulosa cells by isopychnic gradient centrifugation. Biol. Reprod. 27: 633-640, 1982.*
  20. Louvet, JP, SM Harman, JR Schreiber and GT Ross: *Evidence for a role of androgens in follicular maturation. Endocrinology. 97: 366-372, 1975.*
  21. McNatty, KP, DM Smith, A Makris, R Osathanondh and KJ Ryan: *The micro-environment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and vitro. J. Clin. Endocr. Metab. 49: 851-860, 1979.*
  22. Metcalf, MG: *Estimation of viability of bovine granulosa cells. J. Reprod. Fert. 65: 425-429, 1982.*
  23. Moon, YS, BK Tsang, C Simpson and DT Armstrong: *.17-beta-estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle-stimulating hormone. J. Clin. Endocr. Metab. 47: 263-267, 1978.*
  24. Moor, RM and AO Trounson: *Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert. 49: 101-109, 1977.*
  25. Oxberry, BA and GS Greenwald: *An autoradiographic study of the binding of 125I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. Biol. Reprod. 27: 505-516, 1982.*
  26. Richards, JS: *Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. Physiol. Reviews. 60:51-89, 1980.*
  27. Richards, JS and KA Kersey: *Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 beta. Biol. Reprod. 21: 1185-1201, 1979.*
  28. Ryan, RJ: *Follicular atresia: Some speculations on biochemical markers and mechanism. In "Dynamics of Ovarian Function". (eds) NB Schwartz and M Hunzicker-Dunn. Raven press, NY. p.1-11, 1981.*
  29. Tsafiriri, A and RH Braw: *Experimental approaches to atresia in mammals. In "Oxford Reviews of Reproductive Biology". vol.6: p.226-265, Oxford University Press, 1984.*
  30. Tsafiriri, A and CP Channing: *An inhibitory*

- influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. Endocrinology. 96: 922-927, 1975.*
31. Turnbull, KE, AWH Braden and PE Mattner: *The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. Aust. J. Biol. Sci. 30: 229-241, 1977.*
32. Webb, R and BG England: *Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and in-vivo and in-vitro steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. J. Reprod. Fert. 66: 169-180, 1982.*
33. Yoon, YD: *The hormonal levels of the short luteal phase in Korean women (1) LH, FSH, Estradiol and Progesterone. J. Basic Scien. Vol.1: 154-166, 1981.*