2000 춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

감마선에 의한 난포의 형태학적인 퇴화양상

Morphological Evaluation of Follicular Degeneration in g–Irradiated Mouse Ovary

이창주, 김진규, 이병헌, 천기정
한국원자력연구소

요약

감마선은 생쥐의 난포의 급성퇴화를 유발한다. 본 연구는 γ-선에 의하여 유발되는 퇴화 난포의 조직학적인 변화를 규명하고자 시행되었다. 생후 3 주된 ICR 생쥐에 $LD_{50(30)}$ (7.2 Gy)의 γ-선을 조사하였다. 조사 전 0 일, 조사후 1 일, 2일, 3 일에 좌측 난소를 획득하여 조직학적으로 관찰하였다. 방사선 조사 후 2 일 된 난포의 경우, 난포 내 수많은 세포부유물, 세포자연사하는 세포들, 세포자연사 소체들, 그리고 다형다핵백혈구 (호중구) 등을 강소 내에서 찾아볼 수 있었다. 유발된 강소형성 난포와 강소형성전 난포의 퇴화 비율 (%)은 방사선 조사 2 일에 유의하게 증가하였다. 최대 크기의 난소 절편 내 한 개 이상의 호중구가 침윤된 난포의 비율은 방사선 조사 후 유의하게 증가하였다. 따라서, γ-선에 의해 증가된 난포 내 호중구는 난포의 퇴화에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

Abstract

Gamma-ray induces an acute degeneration of the follicles in mice. The present experiment was designed to study the morphological changes in degenerating follicles after irradiation. Three weeks old female mice were γ–irradiated with LD_{50}. Before irradiation (day 0) and at day 1, 2, and 3 after irradiation, the normal and atretic preantral and antral follicles of the left ovaries were morphologically observed. Atretic follicles 2 days after irradiation had numerous cell debris, apoptotic cells and bodies, and polymorphonuclear leukocytes in the antral cavity In severely atretic follicles, numerous polymorphonuclear leukocytes were infiltrated into the follicle. The number of follicles with one or more neutrophils in the largest cross sections was also increased 2 and 3 days after irradiation ($p<0.05$). In conclusion, it can be thought that γ-radiation triggers the recruitment of neutrophils into the follicles during degeneration.

1. 서론

포유류의 경우, 대부분의 난포들은 전 생식기간을 통해 퇴화된다. 퇴화되는 난포는 결국 난소 내에서 소멸되는데, 이러한 퇴화 난포는 과립세포의 세포자연사의 증가, 이상 비대된 협막세포층, 파열되거나 혹은 파상적인 기저막을 갖는 등 형태적인 이상 소견을 보인다[1,2]. 그러나 현재까지 난포 퇴화의 기전은 정확이 규명되지 못한 실정이다.

난포의 퇴화는 내분비학적으로 조절되는 세포자연사의 과정을 통해 이루어지며, 이러한 과정을 통해 난포는 난소 내에서 소멸되는 것으로 알려져 있다[3]. 세포자연사는 정상적인 세포의 항상성 유지에 있어 필수적인 과정으로서 세포자연사의 과정에는 어떠한 면역학적 반응 유발성이 보이지 않는다고 알려져 있다[3]. 난포의 퇴화를 유발하는 병리학적인 자극인자 중에는 방사선이 포함되어 있으며[4], 정상조직이나 종양의 경우 세포자연사는 자연적으로 발생할 뿐 아니라 방사선 조사에 의해 유발될 수 있다[5]. 방사선은 세포의 자연사를 유발할 뿐 아니라[5] 난소의 생리학적 기능을 저해시킨다고 보고되었다[6]. 방사선에 의한 난포의 퇴화에 있어 원시난포와 일차난포[7] 그리고 강소형성전 난포와 강소형성 난포[8] 모두 세포자연사에 의해 매개된다고 보고되었다. 인간의 강소형성 난포에 있어, 협막세포층에 상대적으로 많은 수의 호중구 (neutrophil)가 존재하며 이러한 호중구는 퇴화난포의 경우가 정상난포의 경우 보다 더 많이 존재하는 것이 보고되었다[9]. 이러한 양상은 난포의 탸화가 세포자연사에 의해 매개되는 것 이외에도 염증성 반응에 의하는 것임을 시사한다. 그러므로, 본 연구는 감마선에 조사된 미성숙 생쥐의 난포의 퇴화 양상을 형태학적으로 규명하고자 시행되었다.

2. 재료 및 방법

기 보고된 방법[4]에 의해, 한국원자력연구소에서 생후 3주된 ICR 생쥐에 $LD_{50(30)}$ (7.2 Gy)의 선량으로 1시간동안 조사 (^{60}Co선원, 선원강도: 약 150 TBq, Panoramic Irradiator, AECL)하였다. 조사 전(day 0), 그리고 조사 후 1, 2, 3일 (각 군 당 3마리)에 좌측 난소를 절제하여 2.5 % 의 glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer (pH 7.3)에 전고정하였다. 1 %의 osmium tetraoxide (Sigma Chem. Co. MO)에 후고정한 후 조직학적인 절편을 제작하였다. 초미세박편기 (Leica)를 이용하여 1 μm의 두께로 박절한 후 최대크기의 절편을 toluidine blue 염색한 후, 현미경 (x400, Olympus BX50)하에서 난소의 형태적 변화를 관찰하였다. 한 개 이상의 유사분열 과립세포를 갖고 있으며, 세포자연사는 하는 과립세포가 없고 기저막이 일양한 난포를 정상난포로 구분하였으며, 그 외의 난포는 퇴화난포로 구분하였다[9]. 현미경하에서 계측한 퇴화난포의 수를 전체난포의 수로 나눈 백분율 [(정상 난포의 수/전체 난포의 수) x 100]을 구하여 평균±표준오차로 나타내었다. 통계적 검증은 Student's *t*-test로 실시하여 p값이 0.05보다 작은 경우를 유의한 것을 판정하였다.

3. 결과

3-1. 형태적 변화

. 정상난포는 유사분열중인 과립세포를 가지고 있으며, 난자 및 투명대의 형태가 정상이었다. 방사선 조사 후 2일 된 난포의 경우, 난포 내 수많은 세포부유물, 세포자연사하는 세포들, 세포자연사 소체들, 그리고 다형다핵백혈구 (호중구) 등이 강소 내에서 관찰되었다. 호중구는 기저막을 통해 난포 내로 이입되었으며, 퇴화 난포는 또한 식균세포들도 포함하고 있음이 확인되었다. 퇴화의 정도가 심한 난포의 경우, 많은 수의 호중구가 난포 내에 이입되어 있었다. 이러한 난포는 세포자연사 세포 뿐 아니라 파열된 세포 등도 포함하고 있었다.

3-2. 퇴화율

감마선에 의해 유발된 강소형성난포 (Fig. 1)와 강소형성전 난포 (Fig. 2)의 퇴화 비율은 방사선 조사 2일에 유의하게 증가하였다 ($p<0.05$). 방사선을 조사하기 전의 대조군의 경우 퇴화율은 각각 58.0±8.6과 27.3±11.2을 나타내었으나, 조사 후 2일의 경우 이 비율은 각각 94.0±3.4와 86.9±7.6을 나타내었다.

3-3. 호중구

Table 1에 나타낸 바와 같이, 최대 크기의 난소 절편 내 한 개 이상의 호중구가 침윤된 난포의 비율은 정상 대조군의 경우 29.3±12.0이었으나, 이 비율은 방사선 조사 후 2일과 3일에 각각 65.9±11.5와 57.8±15.4로 유의하게 ($p<0.05$) 증가하였다.

Table 1 Ratio of the number of follicles with polymorphonuclear leukocyte to the total number of preantral and antral atretic follicles

Group	Control	Radiation
Day 0	29.32±12.03* (12)□	←ϒ
Day 1	↑ϒ	25.48±7.5 (3)
Day 2	↑	65,91±11.49† (3)
Day 3	↑	57.78±15.41 (3)

□Numerals in parenthesis are the number of mice used in the present experiment. At each day, the left ovaries were collected and fixed immediately.

*Data are expressed as mean±SEM.

ϒ Values are the same as in Day 0 of the control group.

†$p<0.05$ significantly different when compared to the value of Day 0 of the control group.

4. 논의

세포자연사는 핵의 응축과 함께 세포의 체적이 감소하는 특징을 갖는다[10]. γ-선에 의한 난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사를 매개로 하는데, 생쥐에 있어 γ-선은 난포의 급성퇴화를 유발하는 것으로 보고되었다[4]. 그러나, 피폭된 γ-선의 선량은 80%의 치사선량 (LD_{80})으로, 이러한 고선량의 방사선에 의해 면역체계의 손상이 유발되었을 가능성이 있다. 본 연구는 동일한 생쥐 체계에서 1 시간동안 7.2Gy [$LD_{50(30)}$]의 선량을 조사하였다. 본 연구의 결과, γ-선에 의한 난포의 퇴화는 세포자연사 뿐 아니라 호중구에 의한 염증성 퇴화도 일익을 담당하는 것임이 밝혀졌다. Chang 등[9]은 발달중인 강소형성 난포의 협막층 내 호중구가 존재하며, 호중구의 수는 난포의 퇴화정도에 따라 증가한다고 보고하였다. 또한 Best 등[10]은 사람의 난소 내 백혈구의 아종들의 존재에 대해 보고한 바 있다. 본 연구의 결과, 방사선 피폭에 의해 증가하는 퇴화난포 내에 침윤된 염증세포의 수가 시간에 따라 증가하는 것이 관찰되었으며, 세포자연사 세포의 수와 호중구의 수가 시간에 따라 증가하였다. 이는 γ-선에 의한 난포의 퇴화는 과립세포의 세포자연사 뿐 아니라 염증성 면역반응에 의해 매개된다는 점을 시사하며, 난포 내 호중구는 기저막을 통해 난포 내로 침윤되는 것으로 생각된다.

퇴화 난포 내 세포부유물 및 세포자연사 소체들은 대식세포 및 인접 과립세포에 의해 제거된다는 보고[11]에 비추어, 본 연구의 결과 확인된 γ-선에 의해 증가된 난포 내 호중구는 난포의 퇴화에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 이상의 결과, γ-선은 난포 내 호중구의 침윤을 증가시킨다는 결론을 얻었으며, 퇴화 난포 내 호중구의 생물학적인 역할은 추후 규명되어야 할 것으로 생각된다.

5. 결론

조사된 반치사선량의 감마선은 미성숙 생쥐의 강소형성 난포 및 강소형성전 난포의 퇴화를 유발한다. 조직학적으로 퇴화되는 난포 내에는 많은 수의 세포자연사 세포 뿐 아니라, 세포자연사 소체, 세포부유물, 그리고 다형다핵백혈구 (호중구)가 존재함이 확인되었다. γ-선에 의한 퇴화비율은 방사선 조사 후 2일에 유의하게 증가하였으며, 난포의 퇴화와 함께, 호중구가 난포 내로 침윤되는 것이 확인되었다. 본 연구의 결과, γ-선은 과립세포의 세포자연사 뿐 아니라 호중구에 의한 염증반응에 의해 매개된다는 결론을 얻었다.

6. 감사의 말씀

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

7. 인용문헌

1. A. N. Hirshfield and A. R. Midgley. "Morphometric analysis of follicular development in the rat" *Biol. Reprod*. **19**, 606, (1978).
2. R. H. Braw and A. Tsafriri. "Follicles explants from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia" *J. Reprod. Fertil*. **59**, 259, (1980).
3. J. F. Kerr, C. M. Winterford and B. V. Harmon. "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy" *Cancer* **73**, 2013, (1994).
4. J K. Kim, C. J. Lee, K. W. Song, B. R. Do and Y-. D. Yoon. "λ-Radiation accelerates ovarian follicular atresia in immature mice" *In Vivo* **13**, 21, (1999). .
5. J. H. Hendry and C. M. West. "Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response" *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 709, (1997).
6. R. M. Chapman. "Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function" *Semin. Oncol*. **9**, 84, (1982).
7. C. J. Lee, H. H. Park, B. R. Do, Y-. D. Yoon and J. K. Kim. "Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in moue ovary" *Ani. Rep. Sci*., (2000, in press).
8. J. K. Kim and C. J. Lee CJ. "Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in λ-irradiated mouse" *Mut. Res*. **449**, 33, (2000).
9. R. J. Chang, A. Gougeon and G. F. Erickson GF. "Evidence for a neutrophil-interleukin-8 system in human folliculogenesis" *Am. J. Obstet. Gynecol*. **178**, 650, (1998).
10. J. L. Tilly. "Apoptosis and ovarian function" D*ev. Reprod.* **1**, 162, (1996).
11. C. L. Best, J. Pudney, W. R. Welch, N. Burger and J. A. Hill. "Localization and characterization of white blood cell populations within the human ovary throughout the menstrual cycle and menopause" *Hum. Reprod*. **11**, 790, (1996).
12. J. Kuryszko and R. T. Adamski. "Macrophages in atretic process of maturing ovarian follicles in mouse." *Z. mikrosk. Anat. Forsch. Leipzig.* **101**, 212, (1987).

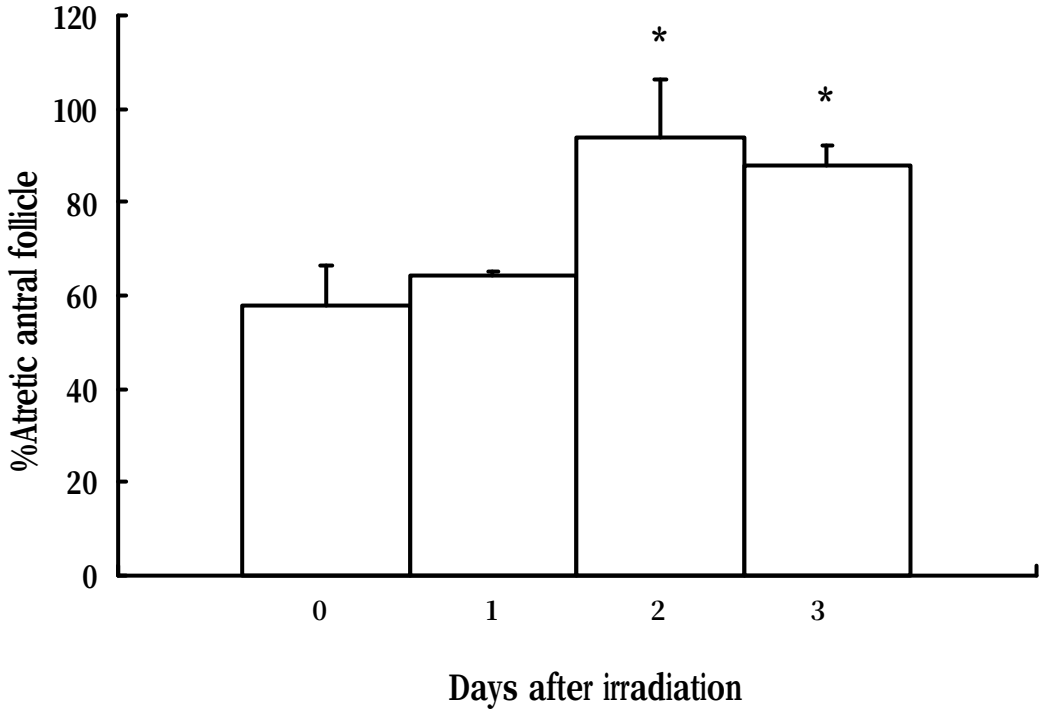

Fig. 1. Atretic ratio of antral follicles in mouse ovary. The immature mice were γ-irradiated with a dose of 7,2Gy (LD_{50}) for 1 hour. Before irradiation and 1, 2, 3 days after irradiation, histological changes of left ovaries were observed. In the largest cross sections, the atretic follicles were counted under a microscope. The atretic ratio was obtained by dividing the number with the total follicle number and presented as mean ± SEM. The number of mice a group was 3. *, $p<0.05$ significantly different from that of day 0.

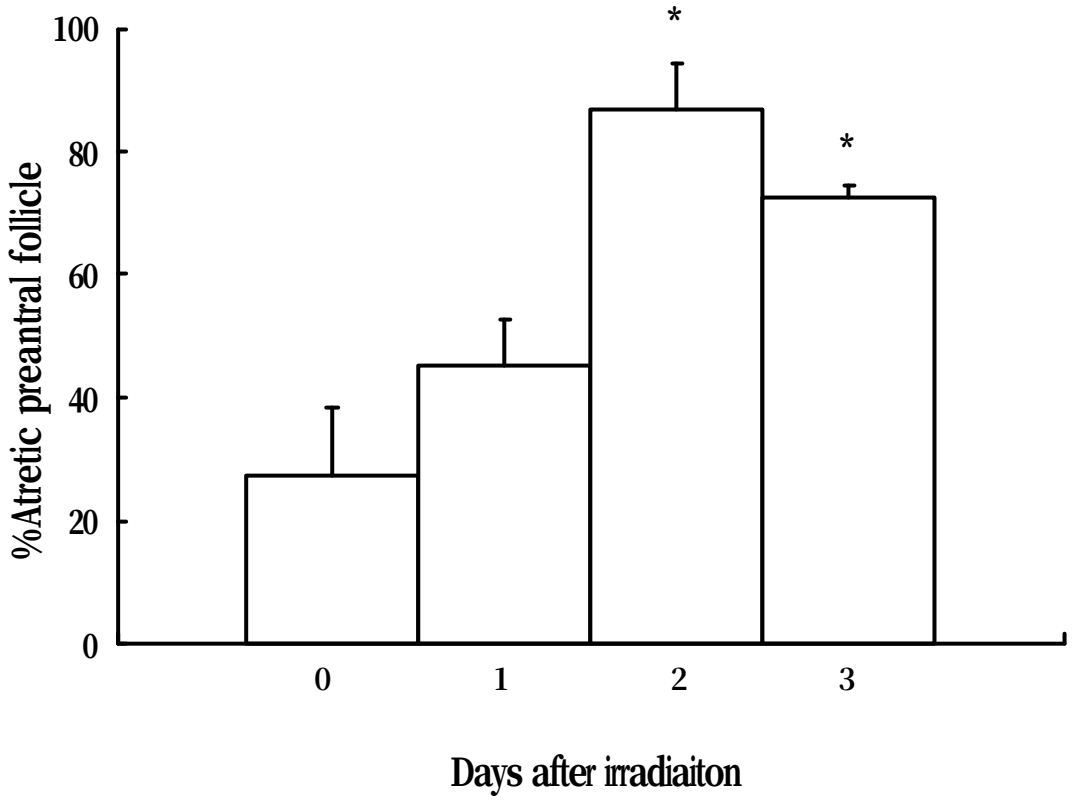

Fig. 2. Change of atretic ratio in I-irradiated mouse ovavarian preantral follicles. Preantral follicles were identified by comparison of the serial sections. Follicles with one or more apoptotic granulosa cells and bodies were classified into atretic ones. The number of mice a group was 3. *, $p<0.05$ significantly different from that of day 0.