

여포성숙의 대사에 관한 생화학적인 연구 II. 돼지 난소내 중여포액에 존재하는 단백질의 조성 및 동일여포액내 스테로이드 호르몬의 농도

윤용달 · 이창주 · 도병록 · 김종흡 · 김문규

한양대학교 자연과학대학 생물학과

포유류의 난소내 여포의 폐쇄기작을 알아보기 위하여 본 실험을 행하였다. 정상과 폐쇄를 형태적으로 판정한 돼지의 난소내 개개 중여포(지름 3~6 mm)의 여포액내 스테로이드 호르몬과 단백질을 방사면역측정법(RIA)과 SDS-전기영동으로 각각 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

progesterone(P₄)은 여포성숙기(follicular phase)의 여포액내 폐쇄여포에서 높은 농도를 나타내었고 ($p < 0.05$), testosterone(T)의 경우 황체기(luteal phase)의 정상여포 및 여포성숙기의 폐쇄여포에서 높은 농도를 나타내었다. estradiol(E₂)은 여포성숙기의 폐쇄여포에서 정상여포에 비해 현저히 낮았다.

여포액내 존재하는 단백질의 SDS-PAGE 결과, 혈청에 존재하지 않는 4종의 단백질 (20K, 32K, 33K, 38K)을 확인하였다. 난소주기에 따라 112K, 141K의 단백질이 확인되었고, 폐쇄여포액내 특이하게 존재하는 23K, 24K의 단백질도 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 난소주기에 따라 여포액내에 존재하는 스테로이드 호르몬의 농도와 단백질의 조성이 서로 같지 않음을 알 수 있었으며 여포의 폐쇄기작에 있어서도 난소주기에 따라 분명한 차이가 있음을 알 수 있었다. 그러나 이들 폐쇄여포에 존재하는 단백질들의 생리적인 역할을 이해하기 위하여는 많은 연구가 수행되어야 한다고 사료되었다.

KEY WORDS: Follicular atresia, Protein, Steroid, Pid ovary

포유류의 난소내 여포는 극히 일부만이 배란되고 나머지의 대부분은 폐쇄(follicular atresia)되어 소멸된다(Richards, 1980). 여포는 성장의 어느단계에서도 퇴화하며, 뇌하수체 호르몬의 작용 변화와 여포내적인 변화, 즉, 과립세포와 맥락세포에 의한 스테로이드 호르몬들의 분비 변화에 의해서도 폐쇄가 일어난다고 보고되었다(Nicosia *et al.*, 1975). 또한 비스테로이드성 물질(nonsteroidal factor) 등이 관여하는 다양한 생식소내 국부조절 호르몬(local regulatory

hormones)의 작용에 의해 여포가 폐쇄하게 되는 것으로 알려져 왔으나 그 기작에 관하여는 정확히 알려지지 않고 있다(Guraya, 1985).

폐쇄여포가 정상여포에 비해 전체적인 스테로이드의 합성율이 높다고 보고되었는데(Moor *et al.*, 1978; Braw and Tsafiriri, 1980; Terranova *et al.*, 1980; Braw *et al.*, 1981; Lee and Yoon, 1985), 이는 황체가 없는 여포의 과립세포에서 폐쇄가 진행됨에 따라 현저한 스테로이드 합성능력을 갖는 미세구조적 변화를 관찰한 결과에 의해서 뒷받침되고있다(Kim *et al.*, 1987). 반면 황체가 여포의 경우에는 이러한 구조가 관찰되지 않아 황체기 난소내 여포폐쇄와 여포기 난소의 여포폐

이 논문은 1987년도 문교부 자유공모과제 학술연구비에 의하여 연구되었음.

새는 서로 다른 기작에 의해 일어나는 것임이 시사되었다.

폐쇄여포는 정상여포에 비해 스테로이드생합성에 관여하는 효소, 특히 aromatase의 기능저하로 인하여(Braw and Tsafiriri, 1980) 여포액 내 androgen과 estrogen이 불균형적으로 생성이 된다(Hillier *et al.*, 1977). 일반적으로 estrogen은 여포성장요인으로 androgen은 여포폐쇄의 주된 요인으로 작용한다고 보고되고 있다(Harman *et al.*, 1975; Haney and Schomberg, 1978; Hillier and Ross, 1979; Tsafiriri and Braw, 1984).

또한 여포액내 단백질은 혈청에 비해 50-100%의 농도로서(Manarang-Pangan and Menge, 1971; Shalgi *et al.*, 1973; Edward, 1974; Kim *et al.*, 1986), 그 조성은 혈청과 유사하지만(Anderson *et al.*, 1976), 개개의 여포액내 단백질의 농도 및 조성은 여포의 성장, 성숙단계와 여포의 상태에 따라 서로 같지않다고 보고되고 있다(McGaughy, 1975; Tsai *et al.*, 1981; Gabrera *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1986). 특히 정상여포의 내 맥락세포의 미세 구조적 관찰결과 단백질합성의 구조를 갖고 있어(Nicosia *et al.*, 1975; Amin *et al.*, 1976; Kim *et al.*, 1987), 난소주기에 따라서도 여포액내 단백질의 조성 및 농도가 같지않을 것임이 시사 되어진다.

그러나 폐쇄에 따라 각각의 여포액내 스테로이드의 농도와 단백질의 구성성분 상호관계에 대한 보고는 극히 적은 상태에 있어 본 연구는 채지난 소내 증여포를 재료로 스테로이드 호르몬의 농도와 단백질의 전기영동적 양상을 비교하기 위하여 시행되었다.

재료 및 방법

서울 마장동의 도살장(우성농역)에서 채취한 돼지난소를 4℃의 얼음상자에 넣어 30분내로 실험실에 운반하였다. 냉장상태(4℃)에서 황체의 존재 유무별로 난소를 구분하여 각각의 난소에서 여포를 분리하였다. 여포의 상태를 판정하기 위해 분리된 여포를 저온 절편기(Histostat, AO, Model 975C)로 8-10 μ M의 두께로 잘라 hema-

toxylin-eosin으로 염색하였다. 염색이 끝난 slide를 현미경하에서 관찰하여 맥락세포층이 비대하지 않으며 과립세포층이 일량하고, 과립세포의 염색질이 이상응축되지 않은 경우를 정상 여포로 판정 하였으며, 그 외의 여포는 폐쇄 여포로 간주 하였다(Ryan, 1981). 이들 여포에서 지름이 3.0-6.0 mm인 증여포만을 선별, 본 실험에 사용 하였다.

여포액내 progesterone (P_4), testosterone (T), estradiol (E_2)의 농도는 기 보고된 방법에 따라 방사면역측정법으로 정량하였다(Yoon, 1981; Lee and Yoon, 1985). Intraassay variation은 P_4 , T, E_2 에서 각각 6.5%, 6.2%, 9.59%로 나타났으며, interassay variation은 각각 6.49%, 1.52%, 18.47%로 나타났다.

여포의 지름을 측정하고 여포액의 부피를 계산 하였다. 즉, 지름이 측정된 여포를 핀셋을 사용하여 시험관안에 터트려 넣고, 1 ml의 생리식염수(0.85%, Merck)를 첨가한 후, 폐용 추적자(약 10,000cpm / 500 μ l)를 넣어 vortex mixer로 교반하였다. 여기에서 500 μ l를 취해 minivial(7 ml capacity)에 넣고 3 ml의 Dioxane-based scintillant를 첨가하여 섞은 후 Beta-ray scintillation counter(Packard, Tri-Carb, Model 4530, counting efficiency, 57%)로 5분씩 측정하여 부피를 계산하였다.

단백질의 농도측정을 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 standard로 하여 분광광도계(Schimadzu spectrophotometer, UV-150-02)로 750nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 변용하여 7-15%의 linear gradient gel을 사용하였다. acrylamide, 7-15%, 1.875M Tris-HCl(pH 8.8), 0.25% ammonium persulfate, 1.5% SDS에 7% gel은 9.3 ml의 water를, 15% gel에는 4.3 ml의 water와 14.6%의 sucrose를 넣어 섞은 후 진공상태에서 30초간 기포를 제거하였다. 여기에 각각 10 μ l의 TEMED를 넣은 후 gradient maker를 사용하여 linear하게 섞으면서 gradient gel을 만들어 굳혔다. stacking gel은 4% acrylamide, 0.6 M Tris-HCl(pH 6.8), 1% SDS, 0.25% ammo-

nium persulfate를 넣어 섞은 후 30초간 진공하에서 기포를 제거하고 10 μl의 TEMED를 넣어 굳혔다. 시료는 단백질을 약 100 μg / 20 μl로 희석하여 loading하였으며, well 당 0.5mA로 stack시키고, well 당 1.0mA로 약 3시간 영동하였다. 영동이 끝난 gel은 Merrill등 (1981)의 방법에 따라 착은 염색 (silver staining)하여 분석하였다.

각 군간의 통계비교는 Student's t-test로 실시하였으며, p값이 0.05 보다 작은 경우를 유의하다고 하였다.

결 과

1. 돼지난소내 여포의 부피계산

여포의 지름(D)과 여포액의 부피(V)사이의 관계는 $V = 0.315 \times D^3$ 의 직을 얻었다.

2. 단백질의 농도

황체가 없는 경우에는 폐쇄여포에서 현저히 높은 농도를 나타내었으나(p < 0.05), 황체가 있는 경우에는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

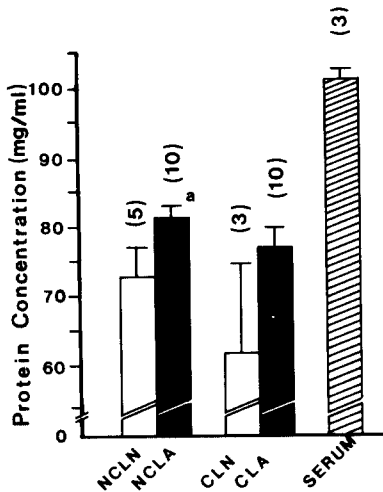


Fig. 1. Protein concentration (mg/ml) in porcine ovarian follicular fluid. Abbreviations are as follows: NCL, follicles in follicular phases; CL, follicles in luteal phases; N and A is normal and atretic follicles, respectively, identified by morphological criteria. Numbers in parentheses represent experimental repeat. a, p < 0.05 significantly different from normal group. Data are presented as mean ± SEM.

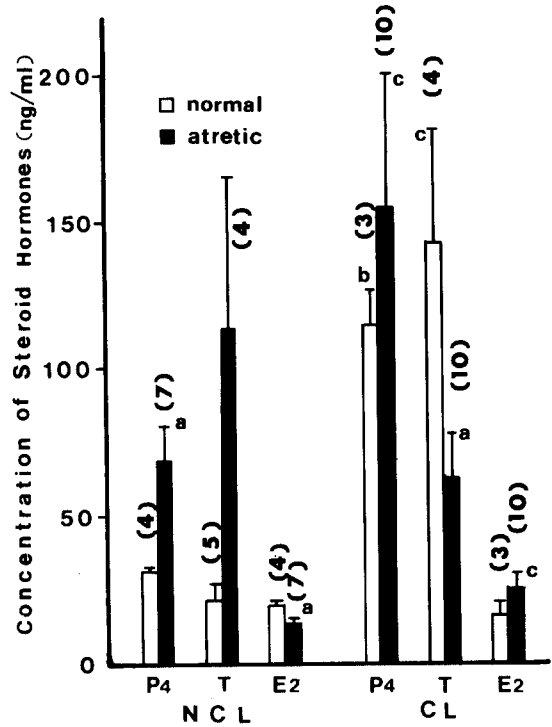


Fig. 2. Concentration of steroid hormones in porcine ovarian follicular fluid. Data are presented as mean ± SEM with the number of experiment in parentheses. a, p < 0.05 significantly different from normal group; b, p < 0.001 and c, p < 0.05 significantly different from NCL group, respectively.

3. Steroid hormone의 농도

중여포를 황체의 존재유무에 따라 구분한 후 중여포내 스테로이드 호르몬의 농도를 측정할 결과를 Fig. 2로 요약하였다.

Progesterone(P₄)의 경우 황체가 존재하지 않는 난소내 폐쇄여포에서 현저히 높은 농도를 나타내었다(p < 0.05). 황체기의 여포에서는 폐쇄와 정상간의 차이를 보이지 않았으나 여포기에 비해 현저히 높은 농도로 존재하였다(p < 0.001). Testosterone(T)의 경우에는 황체기의 정상여포에서 여포기의 정상여포에 비해 현저히 높은 농도로 존재하였으나 폐쇄여포군과는 유의한 차이를 보이지 않았다. Estradiol(E₂)은 황체가 없는 경우의 정상여포가 폐쇄여포에 비해 현저히 높았으며 황체기 여포의 경우에는 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 황체기의 폐쇄여포가 여포기의 폐쇄여포에 비해 현저히 높은 농도를 보였다(p <

0.05).

4. SDS-PAGE의 결과

중여포액내에 존재하는 단백질의 영동양상은 혈청과 조상면에서 큰차이를 보이지 않았지만 28K, 32K, 33K, 38K의 단백질이 혈청에서는 보이지 않은 것으로 보아 여포액에만 존재하는 특이 단백질이라고 판단되었다(Fig. 3).

난소내 황체의 존재유무에 따라 112K의 단백질

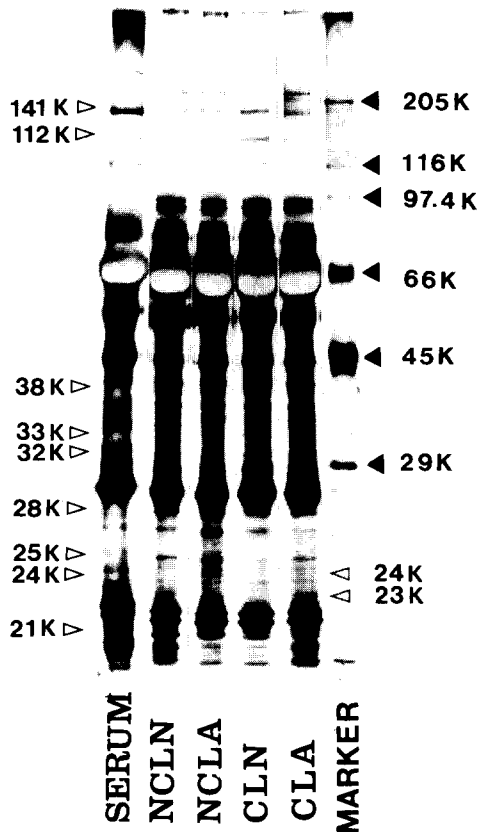


Fig. 3. Electrophoretogram of proteins in the ovarian follicular fluid in pig. Abbreviations are explained in the legend of Fig. 1. for details, see Text.

이 황체의 정상여포에서 뚜렷이 보였으며, 141K의 단백질은 황체가 없는 난소의 여포액내 정상군에서 폐쇄군 그리고 황체의 정상군까지 높아져서 황체의 폐쇄여포에서 낮아지는 양상을 보였다. 또한 분자량이 25K정도의 두 단백질의 band가 황체가 없는 난소내 여포액에 더 높은

농도로 존재함을 볼 수 있었다.

정상군에 비해 폐쇄군에서만 특이하게 보이는 23K와 24K의 두 band를 확인할 수 있었다. 특히 32K의 단백질은 정상군에서 더 높은 농도로 존재하였다.

고 찰

포유류 난소내 여포의 폐쇄에 관해 그동안 많은 보고가 있어 왔지만 현재까지 그 정확한 폐쇄의 기작은 알려지고 있지 않다(Guraya, 1985).

본 연구에서는 돼지 난소내 중여포(지름 3.0-6.0mm)를 형태학적으로 판정하여 정상군과 폐쇄군으로 구분하고 각개여포의 여포액내 단백질의 양과 스테로이드 호르몬의 양 그리고 단백질의 SDS-PAGE상을 비교함으로써 정확히 판정된 폐쇄여포내 이들의 변화를 추구하고자 하였다.

여포의 지름(D)과 여포액의 부피(V)사이의 관계는 rat의 경우($\frac{1}{8} \times \pi D^3$) (Page and Buchter, 1982), 양의 경우 $V = 0.52 \times D^{2.7}$ (Carson *et al.*, 1981), 소의 경우 $V = 0.3 \times D^3$ (Henderson *et al.*, 1982), 사람의 경우 ($\frac{3}{4} \times (\frac{D}{2})^3$) (Bayer *et al.*, 1988)의 공식을 사용하여왔는데 폐쇄의 경우에 있어서 본 실험에서 얻은 결과는 $V = 0.315 \times D^3$ 으로 나타나 단순히 구의 체적공식을 이용하여 여포액의 부피를 구하는 rat와 사람의 경우를 제외하고는 위의 결과들과 일치함으로 알 수 있었다.

스테로이드의 농도를 보면 생식주기에 따라 P_4 는 황체의 여포내에서 현저히 높은 농도를 보였는데 ($p < 0.001$) 이는 활성을 가진 황체에서 분비되어오는 P_4 가 다량유입되었거나 혹은 폐쇄여포의 주요분비 steroid가 progesterone이라는 것을 의미 하였다(Moor *et al.*, 1978; Braw and Tsafirri, 1980; Terranova, 1981; Terranova *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1989).

T의 농도가 여포기에 비해 황체의 정상여포에서 현저히 높은 것은 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD)의 활성이 증가한 때문으로 여겨지며(Braw and Tsafirri, 1980), 황체의 존재유무에 따라 농도의 양상이 바뀌는 것은 여포의 폐쇄기작이 여포의 생식주기에 따라 서로 같지

않음을 의미한다고 사료되었다(Yoon *et al.*, 1989). 이는 폐쇄된 과립세포가 steroidogenic한 미세구조를 갖는데(Schwall and Erickson, 1981) 비해 난소내에 황체가 존재하는 경우에는 이러한 현상이 관찰되지않아 난소내 황체의 존재 유무에 의해서도 여포 폐쇄의 기작이 서로 같지 않을 것이라는 보고(Kim *et al.*, 1987)에 의해 뒷받침된다. 또한 이들 증가한 T가 조직학적으로 정상으로 판정된 여포들의 폐쇄를 유발시키는 원인물질로 작용하는 것으로 생각된다(Tsafirri and Braw, 1984; Guraya, 1985).

E₂의 농도가 황체가 없는 난소내 여포의 경우에 폐쇄군에서 현저히 감소한 것은 Peluso 등(1980)의 보고와 일치하였으며 황체기의 폐쇄여포군에서는 높은 경향을 보여 폐쇄에 대한 E의 작용기작이 생식주기에 따라 각기 다를 것이라고 사료되었다(Dierschke *et al.*, 1985).

폐쇄여포는 조직학적으로 단백질합성의 미세구조적 특징을 갖지 않는다고 보고되었는데(Nicosia *et al.*, 1975; O'Shea *et al.*, 1978; Schwall and Erickson, 1981; Kim *et al.*, 1987), 본 실험결과 오히려 폐쇄여포가 정상여포에 비해 단백질의 농도가 높은 결과를 보였다. 이는 alkaline phosphatase가 폐쇄여포에서 강한 활성을 보인다는 보고(Ryan, 1981)에 미루어 혈청으로부터 많은 단백질이 유입되었을 것으로 사료된다.

현재까지 개개의 여포액내 단백질의 분석에 있어 대부분 여포액을 pooling하여 연구하였으므로 전기영동적양상의 변화를 파악하는 데 곤란하였다(Guraya, 1985). 그러나 조직학적으로 여포의 상태가 판정이 된 정상군과 폐쇄군의 중여포액내 단백질을 전기영동으로 분리한 결과 여포의 상태별로 혈청과 다른 특이단백질 4종(28K, 32K, 33K, 38K)를 확인할 수 있었다. 이 중 32K의 특이단백질은 여포액내에 존재하는 inhibin의 분자량과 일치하였다(DeJong, 1988).

특히 32K의 단백질은 비록 면역학적으로 확인하는 실험은 행하지 않았지만 정상군에서 더 높은 농도로 유지되고 있음을 볼 때 여포가 폐쇄되면서 inhibin의 분비가 감소한다는 보고(Henderson *et al.*, 1984)로 보아 32K의 단백질이 inhibin일 것으로 사료된다.

23K와 24K의 단백질은 폐쇄여포액내에 존재하는 특이 단백질로서 gonadotropin-mediated follicular maturation을 저해함에 의해 일어나는 폐쇄의 원인물질 혹은 결과물질이라는 점을 시사하였다(DiZerega *et al.*, 1983; Vale *et al.*, 1986). 본 실험의 결과에서 분자량 25K 정도의 두 단백질과 125K, 141K의 단백질은 난소내 황체의 존재유무에 따라 차이를 보여 이들이 폐쇄에 관여하는 단백질로 생각되며 이들로 보아 여포폐쇄에 있어 그 기작이 난소주기에 따라 서로 같지 않음을 의미하였다.

이상의 결과로 보아 돼지 난소내 여포의 폐쇄는 황체의 존재유무 즉, 난소주기에 따라 개개 여포액내 스테로이드의 농도 및 단백질의 전기영동적인 양상에 있어서도 서로 차이가 있다고 사료된다. 특히 23K, 24K의 단백질의 생리, 생화학적인 역할이 밝혀지고 inhibin으로 보이는 32K 단백질의 여포내 역할이 스테로이드생합성능과 관련하여 밝혀진다면 여포의 폐쇄기작에 대해 많은 자료를 제공할 것으로 사료되어 이들의 생화학적인 역할에 관한 연구가 진행되어야 할 것이다.

인용문헌

- Amin, H., R. F. M. Richart, and A. O. Brinson, 1976. Preovulatory granulosa cells and steroidogenesis. *Obstet. Gynecol.* **47**: 303-304.
- Anderson, M. M., J. Krøll, A. G. Byskov, and M. Faber, 1976. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J. Reprod. Fert.* **48**: 109-118.
- Bayer, S. R., D. R. Armant, A. M. Dlugi, and M. M. Seibel, 1988. Spectrophotometric absorbance of follicular fluid: A predictor of oocyte fertilizing capability. *Fertil. Steril.* **49**: 442-446.
- Braw, R. H. and A. Tsafirri, 1980. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fert.* **59**: 267-272.
- Carson, R. S., J. K. Findlay, I. J. Clarke, and H. G. Burger, 1981. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* **24**: 105-113.
- DeJong, F. H., 1988. Inhibin. *Physiol. Rev.* **68**: 555-609.
- Dierschke, D. J., R. J. Hutz, and R. C. Wolf, 1985. In-

- duced follicular atresia in rhesus monkeys: Strength-duration relationships of the oestrogen stimulus. *Endocrinology* **117**: 1397-1403.
- DiZerega, G. S., R. P. Mars, P. C. Roche, J. D. Campeau, and R. King, 1983. Identification of proteins in pooled human follicular fluid with suppress follicular response to gonadotrophins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **56**: 35-41.
- Edward, R. G., 1974. Follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* **37**: 180-219.
- Gabrera, V. O., N. V. Andino, and O. M. D. Acosta, 1985. Protein electrophoretic patterns of bovine and porcine ovarian follicular fluid. *J. Endocrinol. Invest.* **8**: 489-493.
- Guraya, S. S., 1985. Follicular Atresia. In: *Biology of Ovarian Follicles in Mammals*(Guraya, ed.). Springer-Verlan. New York, pp 228-275.
- Haney, A. G. and D. W. Schomberg, 1978. Steroidal modulation of progesterone secretion by granulosa cells from large porcine follicles: A role for androgens and estrogens in controlling steroidogenesis. *Biol. Reprod.* **19**: 242-248.
- Harman, S. M., J. P. Louvet, and G. T. Ross, 1975. Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia. *Endocrinology* **96**: 1145-1152.
- Henderson, K. M., A. S. McNeilly, and J. A. Scoanton, 1982. Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size. *J. Reprod. Fert.* **65**: 467-473.
- Henderson, K. M., P. Franchimont, C. H. Charlet-Renard, and K. P. McNatty, 1984. Effect of follicular atresia on inhibin production by bovine granulosa cells *in vitro* and inhibin concentration in the follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* **72**: 1-8.
- Hillier, S. G. and G. T. Ross, 1979. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature rats. *Biol. Reprod.* **20**: 261-268.
- Hillier, S. G., R. A. Knazek, and G. T. Ross, 1977. Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: Further *in vitro* studies using replicate cell cultures. *Endocrinology* **100**: 1539-1548.
- Kim, J. H., Y.-D. Yoon, and M. K. Kim, 1986. A study on the pattern of proteins on electrophoresis in the porcine follicular fluid during atresia. *Kor. J. Fertil. Steril.* **13**: 39-51.
- Kim, M. K., Y. H. Lee, J. H. Kim, and Y. D. Yoon, 1987. A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia. *Korean J. Zool.* **30**: 351-370.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, C. J., Y.-D. Yoon, J. H. Kim, and M. K. Kim, 1989. The relationship between the pyknosis of granulosa cell and steroid concentrations in porcine ovarian follicles. *Kor. J. Fertil. Steril.* **16**: 35-40.
- Lee, Y. K. and Y. D. Yoon, 1985. Changes of the concentrations of steroid hormones in the porcine follicular fluids on atresia. *Kor. J. Fertil. Steril.* **12**: 83-98.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrouch, A. L. Farr, and R. J. Randal, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Manarang-Pangan, S. and A. C. Menge. 1971. Immunologic studies on human follicular fluid. *Fertil. Steril.* **22**: 367-372.
- McGaughey, R. M., 1975. A comparison of the fluid from small and large ovarian follicles of the pig. *Biol. Reprod.* **13**: 147-153.
- Merril, C. R., D. Goldman, S. A. Sedman, and M. H. Ebert, 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**: 1437-1438.
- Moor, R. M., M. F. Hay, H. M. Dott, and D. C. Cran, 1978. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J. Endocr.* **77**: 309-318.
- Nicosia, S. V., I. Evangelista, and S. K. Batter, 1975. Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization of different stages of development. *Biol. Reprod.* **13**: 423-447.
- O' Shea, J. D., D. G. Cran, M. F. Hay, and R. M. Moor, 1978. Ultrastructure of the theca interna of ovarian follicles in sheep. *Cell Tissue Res.* **187**: 457-472.
- Page, R. D. and R. L. Butcher, 1982. Follicular and plasma patterns of steroids in young and old rats during normal and prolonged estrous cycles. *Biol. Reprod.* **27**: 383-392.
- Peluso, J. J., C. England-Charlesworth, D. L. Bolender, and R. W. Steger, 1980. Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia. *Cell Tiss. Res.* **211**: 105-115.
- Richards, J. S., 1980. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* **60**: 51-89.
- Ryan, R. J., 1981. Follicular Atresia: Some Speculation of Biochemical Markers and Mechanisms. In: *Dynamics of Ovarian Function* (Schwartz, N. B. and M. Hunzicker-Dunn, eds.), Raven Press, New York, pp. 1-11.
- Schwall, R. and G. F. Erickson, 1981. Functional and

- Morphological Changes in Rat Theca Cells During Atresia. *In: Dynamics of Ovarian Function* (Schwartz, H. B. and M. Hunzicker-Dunn, eds.), Raven Press, New York. pp 29-34.
- Shalgi, R., P. Kraicer, A. Rimon, M. Pinto, and N. Soferman, 1973. Proteins of human follicular fluid: The blood-follicle barrier. *Fertil. Steril.* **24**: 429-434.
- Terranova, P. F., 1981. Steroidogenesis in experimentally induced atretic follicles of the hamster: A shift from estradiol to progesterone synthesis. *Endocrinology* **108**: 1885-1890.
- Terranova, P. F., N. C. Martin, and S. Chien, 1982. Theca is the source of progesterone in experimentally induced atretic follicles of the hamster. *Biol. Reprod.* **26**: 721-727.
- Tsafiriri, A. and R. H. Braw, 1984. Experimental Approaches to Atresia in Mammals. *In: Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Vol. 6. Oxford Univ. Press, pp. 226-265.
- Tsai, B. S., Y.-D. Yoon, J. H. Han, P. G. Suh, and E. I. Kim, 1981. Biochemical studies on the metabolism of follicular maturation (I): On the basic components and steroid hormones in the follicular fluid. *Korean Biochem. J.* **13**: 7-21.
- Vale, W., J. Rivier, J. Vaughan, R. McClintock, A. Corrigan, W. Woo, D. Karr, and J. Spiess, 1986. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine follicular fluid. *Nature* **321**: 776-779.
- Yoon, Y.-D., 1981. The hormonal levels of the short luteal phases in Korean Women: (1) LH, FSH, estradiol-17 β and progesterone. *Journal of Basic Sciences* (Hanyang Univ.) **1**: 154-166.
- Yoon, Y.-D., C. J. Lee, E. H. Chun, and J. Y. Lee, 1989. Changes of steroid receptor number of and bioactivity of gonadotropin in the follicular fluid of porcine ovarian atretic follicles (I): Bioavailable testosterone. *Korean J. Zool.* **32**: 281-289.

(Accepted November 20, 1989)

Biochemical studies on the metabolism of follicular maturation II. Protein composition and steroid concentration in individually isolated medium-sized follicular fluid of pig ovary

Yong-Dal Yoon, Chang Joo Lee, Byung Rok Do, Jong Heup Kim, and Moon Kyoo Kim
(Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

To study the follicular atretic mechanism in mammalian ovary, the medium-sized (3.0-6.0mm) follicles of porcine ovary were morphologically classified as normal and atretic. Steroid concentrations in the follicular fluid were analyzed by radioimmunoassay, and the proteins in that fluid were electrophoretically separated.

Concentrations of progesterone in the atretic follicular fluid of follicular phases were higher than those of normal ones ($p < 0.05$). Concentrations of testosterone were high in normal luteal and atretic follicular-phases follicles. The concentrations of estradiol remained significantly lower in atretic follicular-phases follicles than normal.

After sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of follicular fluid proteins, four kinds of proteins (20K, 32K, 33K, 38K) were detected, and those proteins were not present in sera. According to the ovarian cycle, proteins of MW of 112K and 141K were identified. In atretic follicular fluids, MW of 23K and 24K were specifically detected.

From the above results, we can conclude that, as ovarian cycle changes, steroid contents and protein composition in atretic follicular fluid are different from the normal developing follicular fluid. To further understand the physiologic roles of the proteins present in the atretic follicular fluids, these proteins need to be characterized and identified.