

생식소 자극 호르몬과 NO에 의한 생쥐 여포의 Bad와 Bax 유전자 조절

김외리 · 강한승 · 이석자 · 이채관 · 이병주* · 강해묵** · 강성구

인제대학교 자연과학대학 생물학과

*울산대학교 자연과학대학 생물학과

**청주대학교 유전공학과

Gonadotropins and Nitric Oxide Can Suppress the Expression of Mouse Follicular Bad and Bax Genes

Wae-Lee Kim, Han-Seung Kang, Seok-Ja Lee, Chae Kwan Lee, *Byung-Ju
Lee, **Hae-Mook Kang and Sung-Goo Kang

Department of Biology, College of Natural Sciences, Inje University, Kimhae 621-749

**Department of Biology, College of Natural Sciences, Ulsan University, Ulsan 680-190*

***Department of Genetic Engineering, Chongju University, Chongju 360-764, Korea*

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of gonadotropin and nitric oxide (NO) on the expression of mouse follicular bad and bax genes that are known to induce apoptosis. Large and medium size follicles of immature mice were obtained at 0, 24, and 48 hours time intervals after Pregnant Mare's Serum Gonadotropins (PMSG, 5 I.U.) injection. Preovulatory follicles collected at 24 hrs after PMSG injection were cultured with or without various chemicals such as gonadotropin, Gonadotropin Releasing hormone (GnRH), testosterone, Sodium nitroprusside (SNP) for 24 hrs at 37°C. After 24 hrs culture, the culture media was used for nitrite assay and total RNA was extracted, subjected to RT-PCR for the analyses of bad and bax expression. We found that expression of bad and bax genes in follicles was markedly reduced before and after *in vivo* priming with hCG. When the preovulatory follicles were cultured for 24 hrs in culture media with PMSG and hCG, the expression of bad and bax genes was decreased. Moreover, SNP (NO generating agent) can significantly suppress the expression of bad and bax genes in follicles when apoptosis was induced by GnRH agonist and testosterone. At the same time, nitrite production of culture media was increased in GnRH agonist + SNP, testosterone + SNP and SNP treated groups than control group. These data demonstrated for the first time that peptide hormones and NO may play important roles in the regulation of mouse follicular differentiation and may prevent apoptosis via suppressing the expression of bad and bax genes.

Key words : Apoptosis, Bad, Bax, Mouse follicle, NO.

※ 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (KOSEF-92)와 HRC-96 연구비 일부로 이루어졌음.

서 론

포유동물의 난소는 다양한 크기의 여포들로 구성되어 있으며 성숙된 여포는 과립세포가 몇 개의 층을 이루며 여포액이 채워져 있다 (Hirshfield, 1986; Hsueh *et al.*, 1994). 배란전 여포 (preovulatory follicle)는 생식소 자극 호르몬에 의해 형성되고 과립세포와 여포막층 (theca layer) 세포의 증식과 분화에 의해 이루어진다 (Rugh, 1990; Eppig & O'Brien, 1996). 일단 성장을 시작한 여포는 결국 배란되거나 또는 폐쇄 (atresia)라는 기작을 통하여 소멸하게 된다. 그러나 여포성숙 과정에서 성장이 개시된 여포의 약 0.1% 미만만이 성숙되어 배란되는 반면 99.9% 이상은 atresia라고 불리는 퇴화과정을 통해 죽어간다 (Billig *et al.*, 1994). 여포의 분화와 성숙은 IGF-I, 생식소 자극 호르몬 (gonadotropin), 에스트로젠, 프로게스테론 등의 호르몬에 의해 조절되며 특히 이러한 호르몬은 황체의 형성과 배란될 여포의 선택에 있어서 중요한 기능을 한다 (Chun *et al.*, 1994; Tilly, 1996). 배란될 여포에서는 에스트로젠과 프로게스테론의 합성이 활발하고 생식소 자극 호르몬의 수용체가 발달되어 있으며 그렇지 않은 경우에는 여포가 atresia로 퇴화된다 (Peters *et al.*, 1975; Peters, 1979; Roche, 1996).

최근에 apoptosis라는 개념을 atresia에 도입함으로써 그 원인을 밝히려는 새로운 연구들이 다양하게 진행되고 있다 (Ravindranath *et al.*, 1992). Atresia가 일어나면 DNA 합성의 감소와 더불어 여포에서 분비되는 에스트로젠과 생식소 자극 호르몬 수용체의 양이 줄어들고 (Hirshfield, 1988), 세포의 수축과 염색질의 응축이 일어난다. 또한 apoptosis가 일어나면 세포내에 Ca^{2+}/Mg^{2+} 에 의존적인 endonuclease가 활성화되어 185~200 bp의 DNA 절편이 형성된다 (Tilly, 1996). 포유류의 apoptosis는 bcl-2 유전자군의 연구를 통하여 많은 기작이 밝혀졌으며, 둘 또는 그 이상의 유전자간 상호작용에 의해 apoptosis가 조절되고 bad와 bax 유

전자들도 여기에 속한다. Bad 유전자는 apoptosis의 조절자로 작용하며 bcl- X_{long} 과 이형이합체 (heterodimer)로 결합하여 apoptosis를 가속화한다 (Yang *et al.*, 1995). Bax 유전자는 p53에 의하여 전사되며 (Miyashita & Reed, 1995), bcl-2와 이형이합체로 되거나 bax끼리 동형이합체를 이루어 apoptosis를 가속화한다 (Oltvai *et al.*, 1993; Williams & Smith, 1993). NO는 신경전달 (Garthwaite *et al.*, 1988), 혈액응고, 혈압의 조절 (Furchgott & Zawadzki, 1980), 종양세포나 세포내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능 (Nathan & Hibbs, 1991) 등의 기작에 관여한다. 최근의 보고에 의하면 NO는 apoptosis (Mannick *et al.*, 1994), 자궁수축 (Goetz *et al.*, 1994) 그리고 배란 (Shukovski & Trafriri, 1994)에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 이상의 연구들을 종합하여 볼 때 생식소 자극 호르몬과 NO는 여포의 성숙과 배란 그리고 여포의 atresia에 있어 중요한 기능을 하는 것으로 사료된다. 그러나 아직 생쥐여포 성숙에서 apoptosis를 유도하는 bad와 bax유전자 발현기작에 대한 연구결과는 발표되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 생쥐의 난소내에서 생식소 자극 호르몬에 의한 bad와 bax 유전자의 발현조절을 성숙여포 (직경 400~430 μ m) 및 성장중인 여포 (직경 200~230 μ m)에서 조사하였다. 또한 여포의 퇴화를 유도하는 것으로 알려진 GnRH와 testosterone에 의한 bad와 bax 유전자 발현이 NO에 의하여 조절되는지의 여부를 실험하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물과 여포의 배양

본 실험에 사용한 생후 20 일의 ICR생쥐는 (주)대한 실험 동물 센터에서 구입한 것으로 특정병원성 미생물이 없고 몸무게는 12~17 g의 것을 사용하였다. 생후 20 일된 생쥐에 Pregnant mare's serum gonadotropins (PMSG)를 5 IU 주사한 후 시간별 (24 시간, 48

시간)로 난소를 얻어내었다. 난소에서 400~430 μm 또는 200~230 μm 의 직경을 가진 여포를 주사기 바늘 (25 gauge)을 이용하여 뜯어낸 후 total RNA를 추출하기 위하여 -70°C 에 보관하였다. 여포를 배양하기 위하여 생쥐에 PMSG (5 IU)를 주사한 후 24 시간이 경과된 난소에서 직경 400~430 μm 인 배란전 여포를 얻었다. 배양액 (1 ml)이 담긴 배양접시 (4-well multidish, Nunc Co.)에 준비된 여포를 10 개씩을 넣은 후, 37°C 의 온도에서 5% CO_2 , 95%의 습도가 유지되는 CO_2 배양기에서 24 시간 동안 배양하였으며 배양액은 MEM (Sigma)을 사용하였다. 처리한 시약으로는 PMSG (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), hCG (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), GnRH agonist (Sigma, L-2761, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 테스토스테론 (0.03, 0.3, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 SNP (100 μM)이었다. 배양이 끝나면 여포를 -70°C 에 보관하였다.

2. RNA 추출

여포로부터 RNA를 추출하기 위하여 phenol과 guanidine thiocyanate 성분이 들어있는 Tri reagent (Sigma, T-9424)를 사용하였다. 시료에 500 μl 의 Tri reagent를 가하고 분쇄한 후 5 분간 실온에 둔 후 chloroform을 100 μl 넣고 섞었다. 이것을 소형 원심분리기 (Eppendorf, Centrifuge 5402)로 4°C 에서 12,000 \times g, 15 분간 원심 분리하여 상층액을 수거한 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침전시켰다. RNA pellet은 20 μl diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 처리된 증류수에 녹였다.

3. RT-PCR

RT-PCR kit (Perkin Elmer)를 이용하여 total RNA에서 bad, bax 유전자 발현을 조사하였다. 100 ng의 total RNA를 90°C 에서 5 분간 처리한 후, oligo d(T)₁₆ primer를 이용하여 역전사 반응을 수행하였다. 역전사 반응 혼합용액에는 5 mM MgCl_2 , 1 \times PCR buffer, 2.5 μM oligo d(T), 1 mM dNTP, 1 U/ μl RNase-inhibitor와 2.5 U/ μl MuLV reverse

transcriptase를 포함시켰으며, 반응조건은 42°C 에서 60 분, 99°C 에서 5 분간 반응시켰다. 합성된 cDNA를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 혼합용액의 조성은 2 mM MgCl_2 , 1 \times PCR buffer, 2.5 U/100 μl Ampli Taq DNA polymerase, end-labeling된 positive primer 0.5 pmol 과 negative primer 4 pmol이었다. Primer 표지는 DNA 5'end-labeling system (Promega, M410A)을 사용하였으며, 10 pmol의 [γ - ^{32}P] ATP, 10 pmol의 primer, 1 \times T4 polynucleotide kinase buffer, 5 U T4 polynucleotide kinase를 섞고, 37°C 에서 30 분간 반응시킨 후, 90°C 에서 2 분간 열을 가하고 원심 분리하였다. 실험에 사용한 primer는 생쥐 bad의 경우, positive primer가 5'-GAAGGATGAGCGATGAGT-3', negative primer는 5'-ACAGGAGAGGGAAAACAG-3'였다. 생쥐 bax의 경우, positive primer는 5'-GGATCGAGCGGGAGAT-3', negative primer는 5'-GCGAGGCGGTGAGGACTC-3'였다. 그리고, β -actin primer 중 positive는 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3', negative primer는 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3'였다. PCR은 95°C 에서 5 분, 57°C 에서 5 분, 72°C 에서 5분간을 1회 수행한 후, 95°C 에서 1분, 57°C 에서 1분, 72°C 에서 1분간을 35회 반복하였으며 마지막으로 72°C 에서 10분간 진행시켰다. PCR 수행후 5 μl 의 PCR 산물을 2% agarose gel에서 80 V로 70분 동안 전기영동한 후, gel dryer에서 건조시켰다. 건조시킨 gel은 X-ray film을 덮어 2 일 동안 감광 후 X-ray film을 densitometer를 이용하여 정량분석하였으며 β -actin의 mRNA양을 기준으로 각 유전자의 발현 정도를 보정하였다.

4. Nitrite assay

여포 배양액 중에 함유된 nitrite를 분석하기 위하여 실험직전에 0.1% naphthylethylenediamine-dihydrochloride와 1% sulphanimide/5% concentrated H_3PO_4 를 동량으로 섞어 Griess reagent를 만들었다.

이 시료를 동량의 배양액과 실온에서 10 분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite 농도는 sodium nitrite standard 곡선을 이용하여 계산하였다.

5. 통계검증

각 실험은 적어도 3회 이상 실시하였으며 각 군간의 통계적 유의성은 Student's t-test를 실시하였다.

결 과

1 생식소 자극 호르몬을 처리한 생쥐에서 시간의 경과에 따른 난소내 여포에서의 bad 및 bax 유전자 발현의 변이

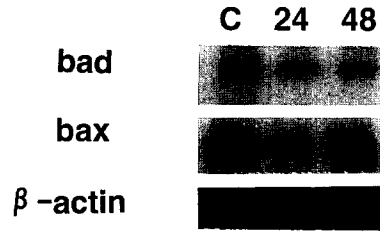
직경이 400~430 μm 인 배란 직전의 여포에서 bad 유전자는 PMSG를 24 시간동안 처리했을 경우 대조군에 비하여 30% 정도 발현이 억제된 채로 되어 48 시간 경과시에도 큰 변화가 없었다. 그러나, bax 유전자는 PMSG를 주사한 후 24 시간이 경과되었을 때는 대조군에 비하여 68%나 크게 감소하였으며, 그 이후로 증가되어 48 시간 경과시 대조군에 비해 35% 발현이 감소되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 1).

여포의 발달 단계 중 직경이 중간 크기인 200~230 μm 인 여포에서는 PMSG를 24 시간 처리하면 bad와 bax 유전자의 발현은 대조군에 비해 각각 60%, 70% 감소하였으나 ($P < 0.05$) 처리 후 48 시간에는 발현율이 이보다 약간 증가하여 대조군에 비해 각각 20%, 40%의 발현이 감소되었다 (Fig. 2). 생식소 자극 호르몬에 의한 여포에서의 bad 및 bax 유전자의 발현은 시간이 지남에 따라 감소하다가 증가하는 경향을 보였다.

2 생식소 자극 호르몬이 배양된 여포의 bad 및 bax 유전자 발현에 미치는 영향

400~430 μm 크기의 배란직전 여포를 PMSG (3 $\mu\text{g/ml}$), hCG (3 $\mu\text{g/ml}$) 처리하여 24 시간 동안 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Bad 유전자는 단순 배양액에서 배양한 대조군에 비하여 PMSG 처리시 15%,

A.



B.

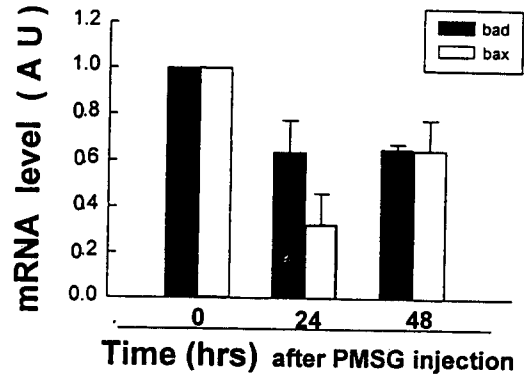


Fig. 1. Effects of *in vivo* PMSG treatment on bad and bax mRNA levels of large size follicle.

A) Representative autoradiogram of bad and bax mRNA levels. Total RNA samples prepared from large size follicles (400~430 μm in diameter) of mouse ovaries treated with PMSG (5 IU) were analyzed by RT-PCR with ^{32}P -labelled primer. B) Quantitative analysis of the relative amounts of bad and bax mRNA levels. The graph represents the mean \pm SEM ($n=3$) of densitometric scanning results after normalization of the data against β -actin mRNA levels in each sample. AU, artificial unit.

hCG 처리시 38% 낮게 발현되었다. Bax 유전자는 대조군에 비해 PMSG 처리시는 50%, hCG 처리시 70% 정도 낮게 발현되었다 ($P < 0.05$).

3. NO가 여포 atresia와 bad 및 bax 유전자 발현에 미치는 영향

여포분화 동안에 NO 유도물질인 sodium nitroprusside (SNP)와 호르몬의 길항효과를 알아보기 위해 GnRH agonist (Sigma, L-2761, 3 $\mu\text{g/ml}$) + SNP (100 μM), testosterone (3 $\mu\text{g/ml}$) + SNP

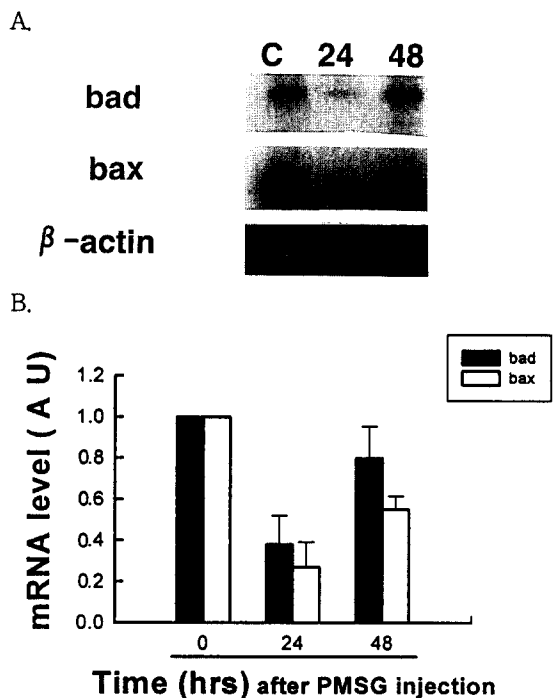


Fig. 2. Effects of PMSG treatment *in vivo* on medium size follicular bad and bax mRNA levels.

A) Representative autoradiogram derived from RT-PCR using ³²P-labelled primer analysis of bad and bax mRNA levels, in medium size follicles (200~230 μm in diameter) collected from mouse ovaries after PMSG injection. B) Quantitative estimate of the relative levels of bad and bax mRNA in medium size follicles, following normalization of densitometric data against β-actin mRNA levels in each sample (mean ± SEM, n=5).

(100 μM)과 SNP (100 μM)를 각각 처리하여 24 시간 동안 배양한 후, 배양액내의 NO 함량을 측정하였다. 그 결과, nitrite 함량은 대조군에 비해 GnRH agonist + SNP 처리시 1.6배, testosterone + SNP 처리시 2.2 배 그리고 SNP 단독처리시 1.9배 정도 증가됨을 알 수 있었다 (P<0.05) (Fig. 4A). Bad와 bax 유전자의 발현은 대조군에 비하여 낮은 발현양상을 보였다 (P<0.05). Bad 유전자의 경우 GnRH agonist + SNP 처리군은 50%, testosterone + SNP 처리군은 63% 그리고 SNP 처리군은 56% 낮게 발현되었다. 한편 bax 유

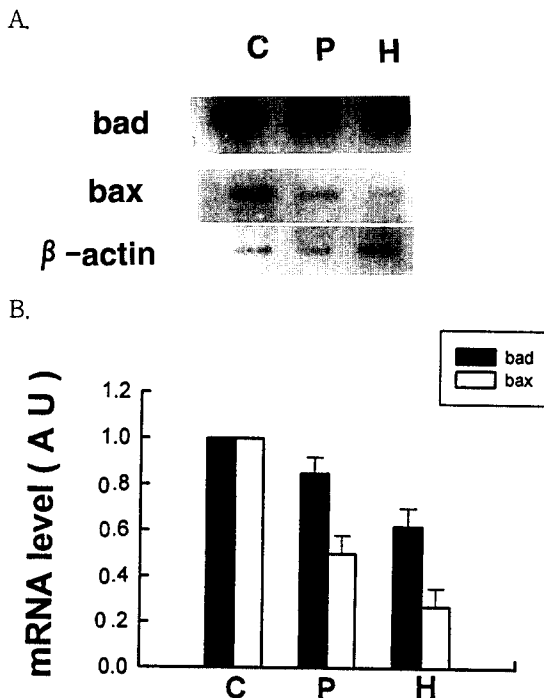


Fig. 3. Changes in bad and bax mRNA levels in large follicles incubated with PMSG or hCG.

A) Representative autoradiogram derived from RT-PCR analysis using ³²P-labelled primer of bad and bax mRNA levels in large size follicles incubated without (C) or with PMSG (3 μg/ml, P) and hCG (3 μg/ml, H) for 24 hrs. B) Quantitative changes in the relative level of bad and bax mRNA, following normalization of densitometric data against β-actin mRNA levels in each sample (mean ± SEM, n=3).

전자는 GnRH agonist + SNP 처리군에서 45%, testosterone + SNP 처리군에서 38% 그리고 SNP 처리군에서 20% 정도 낮은 발현양상을 보였다 (Fig. 4B).

고찰

본 실험의 결과로부터 PMSG를 주사한 생쥐의 난소 내에 있는 여포 중 배란 직전의 직경이 400~430 μm인 크기가 큰 여포에서의 시간의 경과에 따른 bad 유전자의 발현은 24, 48 시간이 경과되었을 때 대조군에 비해

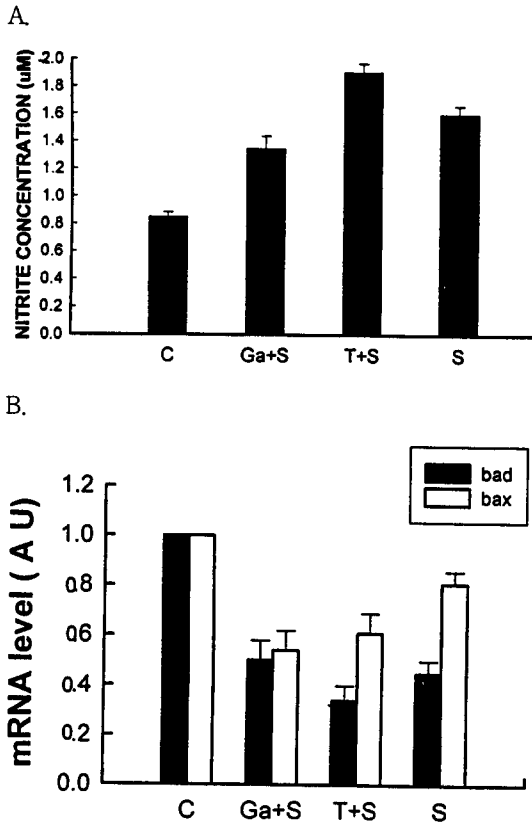


Fig. 4. Nitrite concentration in culture media (A) and expression of bad and bax genes in large-size follicles cultured with GnRH agonist (Ga)+Sodium nitroprusside (S), testosterone+S and S (B).

Large follicles collected from ovaries of 20 day-old mice were incubated with Ga (3 µg/ml) + S (100 µM), T (3 µg/ml)+S (100 µM) and S (100 µM). After 24 hrs incubation, nitrite was measured in culture media mixing with an equal volume of Griess reagent (1 part 0.1% NED to 1 part 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid). The absorbance at 540 nM was measured and nitrite concentration was determined using a curve calibrated from sodium nitrite standards (A). Quantitative estimate of the relative levels of bad and bax mRNA was derived from RT-PCR autoradiogram.

여 30% 정도 억제되었으며, bax 유전자의 발현은 24 시간이 경과되었을 때 낮아졌다가 48 시간이 경과되었을 때는 다시 높아지는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 여포가 형성된 직후의 직경이 200~230 µm인 여포에서

PMSG가 bad와 bax 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. 그 결과 bad와 bax 유전자의 발현이 24 시간이 경과했을 때 대조군에 비해 60%, 70%의 낮은 발현을 보이다가 48시간이 경과되면 발현이 차츰 높아져 대조군에 비해 각각 20%, 40%의 발현 감소를 나타내는 양상을 보였다 (Fig. 2). 이러한 결과는 배란직전의 직경 400~430 µm 여포의 경우와 비슷한 결과이다. Hirshfield (1986)와 Lim 등 (1997)은 PMSG를 투여하면 배란전 여포가 형성됨을 확인하였다. 본 실험에서의 결과는 여포가 성장하면 apoptosis를 유도하는 bax와 bad 유전자가 억제됨을 보여주고 있다. 여포 성숙 호르몬은 여포에 작용하여 atresia가 되는 것을 막아 배란시기까지 여포의 성장을 유지시켜 준다고 볼 수 있다 (Billig *et al.*, 1993). 따라서 여포의 성장에는 bad와 bax 유전자를 억제하는 물질이 존재할 것으로 추측된다.

여포를 *in vitro*에서 여포성장에 관련된 물질없이 배양을 하면 atresia가 일어난다. 본 실험에서는 여포의 성장과 atresia에 PMSG와 hCG를 처리하여 *in vitro* 배양을 한 후 bad와 bax 유전자의 발현양상을 살펴보았다. 그 결과 PMSG와 hCG는 여포의 atresia를 억제하여 대조군에 비해 bad와 bax 유전자의 발현을 감소시켰다. 그리고 bad, bax 두 유전자는 PMSG 처리군보다 hCG 처리군에서 더욱 낮은 발현양상을 보였고 bad 유전자보다 bax 유전자의 발현율이 낮았다 (Fig. 3). 이러한 결과는 쥐에 PMSG를 주사하여 여포의 atresia가 억제됨을 보고한 Hirshfield (1986)의 보고와 생식소 자극 호르몬을 쥐에서 얻은 배란전 여포에 처리하면 DNA의 절편화가 억제되고 생식소 자극 호르몬이 apoptosis를 억제한다는 Chun 등 (1994)의 보고와 부합한다. hCG 처리군에서 bad와 bax 유전자의 발현율이 PMSG 처리군보다 더욱 낮은 발현율을 보인 것은 hCG 호르몬에 의해 여포가 황체화되어 일정기간 가임 상태를 유지하기 위해 steroid hormone의 분비를 증가시키기 때문이라 생각된다.

생체내 신호전달물질로 알려진 nitric oxide (NO)는

nitric oxide synthase (NOS) 효소에 의해서 L-arginine에서 유도된 물질이다. 최근의 보고에 의하면 NO는 apoptosis와 배란에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며 nitrite 생성이 많을수록 apoptosis가 억제됨이 알려졌다. 본 실험에서는 여포 성숙에 대한 nitrite 생성을 알아보기 위하여 apoptosis를 촉진하는 호르몬으로 알려진 GnRH agonist, testosterone과 NO 유도물질인 Sodium nitroprusside (SNP)를 함께 처리하여 nitrite 생성과 호르몬의 길항효과를 살펴보았다. 실험결과 apoptosis를 촉진하는 GnRH agonist와 testosterone은 SNP와의 길항작용으로 대조군에 비해서 nitrite 생성이 현저히 증가하였다 (Fig. 4). 위의 실험결과로 미루어 여포 성숙 과정에 NO가 관여할 것으로 추측되어진다. 세포질에서 NO는 산화, 환원 반응 경로에 의해 조절되는 신호경로를 통해 oxidant stress를 해소시키고 apoptosis를 방어한다는 보고도 있다 (Sandstrom *et al*, 1994). NO가 apoptosis를 조절하는 분자적 기작은 아직 밝혀지지 않았지만 본 실험의 결과로 보면 NO가 직접 혹은 간접으로 apoptosis 관련 유전자를 조절하여 여포 퇴화를 억제하는 기능이 있음을 알 수 있으며 추후 NO 기작에 대한 연구가 더 필요하다.

인용문헌

- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW (1993): Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133: 2204-2211.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW (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.
- Chun SY, Billig H, Tilly JL (1994): Suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 125: 1845-1852.
- Eppig JJ, O'Brien MJ (1996): Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 54: 197-207.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988): Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388.
- Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, Holtz J (1994): Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Comm* 205:905-910.
- Hirshfield AN (1986): Effect of a low dose of pregnant mare's serum gonadotropin on follicular recruitment and atresia in cycling rats. *Biol Reprod* 35: 113-118.
- Hirshfield AN (1988): Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol Reprod* 38: 1181-1188.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafiri A (1994): Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15: 707-724.
- Lim CK, Kim JW, Lee HJ, Yoon YD (1997): Ovulation rate and early embryonic development of mouse atretic follicular oocytes induced by high dose gonadotropin. *Dev Reprod* 1: 67-77.
- Mannick JB, Koichiro A, Kenneth I (1994): Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reac-

- tivation, *Cell* 79: 1137-1146.
- Miyashita T, Reed JC (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299.
- Nathan CF, Hibbs J (1991): Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opin Immunol* 3: 65-70.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993): Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
- Peters H (1979): Some aspects of early follicular development. In: Midgley AR, Sadler WA (ed) *Ovarian Follicular Development and Function*. New York : Raven Press, pp 1-13.
- Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M (1975): Follicular growth: The basic event in mouse and human ovary. *J Reprod Fert* 45: 559-566.
- Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ (1992): Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 131: 254-259.
- Roche JF (1996): Control and regulation of folliculogenesis-A symposium in perspective. *Rev Reprod* 1: 19-27.
- Rugh R (1990): *The Mouse*, New York: Oxford University, pp 24-35.
- Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM (1994): Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukocyte Biol* 55: 221-226.
- Shukovski L, Tsafiri A (1994): The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 135: 2287-2290.
- Tilly JL (1996): Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod Fertil* 1: 162-172.
- Williams GT, Smith CA (1993): Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. *Cell* 74: 777-779.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995): Bad, a heterodimeric partner for bcl-xL and bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291.