

한우의 임신경과에 따른 황체조직의 광학 및 전자현미경적 변화

표병민, 고필옥¹, 양제훈, 원청길¹, 조규완, 강정부¹, 박수동^{1,*}

경상대학교 수의과대학, ¹경상대학교 농업생명과학연구원

(게재승인: 2003년 8월 15일)

Light and Electron Microscopical Changes of Corpus Luteum during the Course of Pregnancy in Korean Native Cows

Byong-min Pyo, Phil-ok Koh¹, Je-hoon Yang, Chung-kil Won¹,
Gyu-wan Cho, Chung-boo Kang¹ and Soo-dong Kwak^{1,*}

College of Veterinary Medicine, Geongsang National University

¹*Institute of Agriculture-Life Sciences, Geongsang National University, Jinju 600-701, Korea*

(Accepted: August 15, 2003)

Abstract: Corpus luteum (CL) is the primary productive organ of progesterone in pregnant cows. Progesterone levels in bovine plasma depend on the volume, weight and shape of the CL. Progesterone productions during the late stages of gestation occur both in the CL and placenta, and placentas produced more progesterone than CL on progesterone production. Because division of progesterone production of these two organs is impossible, the CL function can not be determined by plasma progesterone levels following gestation stages.

This study was carried out to evaluate histological findings on the CL spurium and CL verum, and also on the CL following the pregnant stages by histological and immunohistochemical and electron microscopical methods and then we expect to assume the functions of CL by histological findings.

1. Proliferations of luteal cells occur by day 120 of gestation, vessel hyperplasia occur by day 90 of gestation, and the walls and lumens of vessels developed by day 120 of pregnancy.

2. Sizes of CL cells increased to maximum around day 200 of gestation and similarly maintained by day 240. So these findings indicated that the function of Cl is most active around day 200 of gestation.

3. On parturition day, the number and size of luteal cells were maintained but stain intensity of the luteal cells and vessels are declined or disappeared, and fibrosis of luteal cells increased, and the vessel lumens are emptied. These findings indicate that CL is inactive.

4. In immunohistochemical findings, proliferative positive cells by PCNA antibody appeared more in number during early stages of gestation but appeared less following course of pregnant stages and not nearly appeared on day 120 of gestation. Apoptotic positive cells by TUNEL methods not nearly appeared on the early pregnant stages and a few appeared at late pregnant stages. So developments of CL proceed until day 120 of gestation and regression of CL was occurred by transform of luteal cells into fibrocytes than by luteal cell apoptosis.

본 연구는 한국과학재단(과제번호: R01: 2000-000-00210-0) 지원으로 수행되었다.

* Corresponding author: Soo-dong Kwak

College of Veterinary Medicine, Geongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Tel: +82-55-751-5813, Fax: +82-55-751-5803, E-mail: sdkwak@nongae.gsnu.ac.kr

5. In electron microscopical findings, the size of luteal cells increased more in CL verum than in CL spurium. During gestation stages, the size of luteal cells increased, mitochondria in the luteal cell cytoplasm densely and abundantly developed and also swelled mitochondria increased. The interspace of luteal cells are also dilated, transformation of luteal cells into fibrocytes are more number. The lumens and walls of peripheral capillaries of large luteal cells more broadened and thickened, and transformation of large and small luteal cells to fibrocytes are increased.

The above findings suggest that function of pregnant CL more developed by day 120 of gestation and are most active around day 200 of gestation and similarly maintained by day 240 and are promptly regressed on paturation day.

Key words: Korean native cows, pregnancy, morphology, luteal cells

서 론

황체는 성주기 중에서 형성기에는 서서히 커져서 개화기에 가장 크고 임신이 되지 않으면 퇴행기에 들어가 다시 작아져서 백색체가 되어 소멸되는 등 크기의 변화, 발생 및 소멸의 주기가 반복되는데 이와 같이 성주기 중에 발생과 소멸의 과정을 겪는 황체를 가황체라고 한다 [7, 10, 13, 28].

황체의 크기와 형태의 변화는 progesterone의 생산과 밀접한 관계가 있다. 소의 성주기 중에 progesterone의 농도를 보면 발정후 3-14일까지는 증가하고 16일째부터는 급격히 저하되고 21일째에는 거의 검출되지 않는다. 이와 같이 황체의 크기는 발정 후 13-14일경에 최대 크기가 되고 개체가 임신이 되지 않으면 다음 발정 초기에 완전히 소멸된다 [2, 3, 13, 17, 19, 21].

임신이 되면 임신기의 황체는 성주기의 황체보다 더 크며 기능이 강화되어 소멸되지 않고 임신기간동안 지속되며 태아의 성장 발달에 중요한 역할을 하는 임신황체가 된다 [21]. 그러나 임신 중에도 임신후반기에는 대부분의 동물에서 황체보다 태반이 임신을 지속시키기 위한 기능을 더 많이 하며 황체는 퇴화하여 기능이 약화된다고 한다 [20, 26]. 이와 같이 progesterone의 혈중 농도는 황체의 크기 중량 및 형태와 밀접한 관계가 있고 황체의 활성기는 progesterone치의 증가와 일치한다 [13, 17, 19, 21]. 그러나 임신 후반기에는 태반이 progesterone생산에 더 많은 역할을 한다고 하였으므로 progesterone 측정치는 황체와 태반의 기능의 몫을 구분하기는 불가능하다.

조직학적으로 황체의 구성세포 종류와 세포의 미세구조는 이들의 기능과 관계가 있다 [9, 23, 32]. 또 황체 내 여러 종의 세포종식이나 소멸에 대한 면역조직화학적 소견 [6, 8, 17, 32]이나, 전자현미경적 소견 [5, 7, 10, 11, 13, 22-25, 31-33]은 그 기능의 증대 또는 감퇴를 측정하는 귀중한 자료가 될 것이다. 그리고 이 호르몬 생

산하지 않는 결합조직의 함유비율은 황체기능이 왕성한 임신기에는 가장 낮고 퇴행기에 가장 높아져서 기능이 낮은 퇴행 황체는 탄력성이 없고 견실성이 더 높다 [29].

전자현미경적으로 황체에서 steroid 홀몬의 분비세포인 황체세포는 기능에 대한 미세구조에 대하여 분비과립 intramitochondrial bodies, microperoxisomes 지질과립 apoptotic bodies 등에 대한 출현에 대하여 조사된바 있으나 황체의 출현시기에 대한 차이는 구체적으로 검토된 바가 없다 [4, 5, 7, 9, 10, 12-15, 22-25, 29-31, 33].

본 연구는 소에서 임신이 안된 성주기 중에 발달한 가 황체와 임신황체인 진황체의 구조적 차이, 진 황체 중에서도 임신 경과일에 따른 황체의 구조적 차이를 조직학적, 면역조직화학적 및 전자현미경적으로 조사하여 황체발달 단계에 따른 기능의 차이를 조사하여 태반의 기능과 공존여부를 조사하였다.

재료 및 방법

재료채취

2002년 1월 - 12월중에 경남도내 김해 도축장에서 도살하는 한빈우를 대상으로 하여 황체를 수집한 후 표 1과 같이 비임신우 2두와 임신우 8두에서 양측난소와 임신된 태자를 채취한 후 10% 중성 포르마린에 함유된 표본병에 넣어 실험실에 운반하였다.

육안적 관찰

임신 일령의 측정은 채취한 태자의 체장, 즉, 두부에서 미부까지 장축의 길이인 두미장(crownrump length, CRL)을 계측계(Mitutoyo Co., Japan)를 이용하여 측정한 후, Schmidt의 태아 체장과 태령간의 계산표에 의하여 임신일령을 산정하였다 [1].

비임신우의 황체의 선택은 우선 자궁내 임신여부를 확인한 후에 난소의 실질내부에 형성된 난포, 황체, 백

색체 등을 대상으로 단면의 내부상태, 크기, 색깔, 팽출도, 견실도 및 황체강의 형성여부 등을 육안적으로 관찰하였다. 이중, 발달중인 중간크기의 황체는 유연성이 있고 연한 황색인 것을, 성숙한 황체는 직경 2cm 정도로 연한 황색인 것을 선택하였다. 채취한 황체는 paraffin 절편을 만들어 통상 방법과 같이 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 실시하여 난포와 황체의 형태관찰에 이용하고, 일부 두수의 paraffin 절편은 Gomori의 도염색법 [27]과 면역조직화학적 염색법에 이용하였다.

광학현미경적 관찰

H-E 표본에서 황체조직에서 나타나는 대·소황체세포와 혈관내피세포 등의 형태를 확인하고 황체당 400배의 10개 시야 (시야당 250 μ m \times 250 μ m)에 나타나는 모든 형의 세포전체의 수와 그 중에 황체세포의 수 (대황체세포와 소황체세포의 수), 황체세포의 크기 및 모세혈관 단면의 수를 각각 조사하였다.

면역조직화학적 관찰

apoptosis양성반응세포는 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL)법 [24]에 따라 In situ apoptosis detection kit (Oncogene, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 황체조직의 paraffin 절편을 proteinase K, 2% H₂O₂, working strength TdT enzyme, anti-digoxigenin-peroxidase를 차례로 적용한 후, DAB로 발색하고 hematoxylin으로 대조염색을 하였고, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)황체의 양성반응세포는 paraffin 절편을 1차항체는 PCNA antibody (Oncogene, Cambridge, MA, USA)를, 2차항체는 Vectastain ABC kit (Vector Lab Inc, CA, USA)를 사용한 후 DAB를 사용하여 발색하고 hematoxylin으로 대조염색을 하여 황갈색으로 발색되는 세포에 대하여 조사하였다.

전자현미경적 관찰

도축장 현지에서 위의 대상우 난소에서 Table 1과 같이 비임신우의 황체는 다시 발달중인 황체와 발달이 완성된 황체 각각 1두에서, 임신우의 황체는 태자의 길이가 가능한 차이가 있는 3두를 선정하여 난소와 황체를 분리한 후, 우선 2-3mm 정도의 크기로 잘라 2.5% glutaraldehyde(0.1M cacodylate buffer (pH 7.4)에 침지하여 실험실에 운반하여 4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관한 후, 다시 1mm 정도로 더 작게 잘라 동일한 고정액에 4 $^{\circ}$ C에 전고 정상태로 보관한 후, 다시 0.2M phosphate buffer (pH 7.2)로 같은 시간 수세한 다음, 1% osmium tetroxide에 1

시간 동안 후 고정하였다. 그리고 alcohol 농도의 단계에 따라 탈수하고 epon 812에 포매하여 ultratome (Reichert-Jung Co.)을 이용하여 70nm 두께의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중염색하여 투과전자현미경(Hitachi H-600)에서 75 KV에서 사진을 촬영하여 관찰하거나 또는 전자현미경하에서 직접관찰하였다.

Table 1. Experimental design for light and electron microscopic observations of corpus luteums in the Korean native cows

Stage of CL	Crown-Rump length of fetus	Fetus age measured	Microscope for observation	
Developing CL of estrum	no pregnancy	no	LM	EM
mature CL of estrum	no pregnancy	no	LM	EM
Pregnant CL	8 cm	65 days	LM	EM
Pregnant CL	12 cm	80 days		EM
Pregnant CL	15 cm	90 days	LM	EM
Pregnant CL	27 cm	120 days	LM	
Pregnant CL	50 cm	180 days		EM
Pregnant CL	56 cm	200 days	LM	
Pregnant CL	80 cm	240 days	LM	
Pregnant CL	neonate	280 days	LM	

CL, corpus luteum; LM, light microscope; EM, electron microscope.

결 과

광학현미경적으로 임신 황체의 소견을 보면 그림 1과 같이 섬유세포와 내피세포는 성장중인 가황체에서는 핵이 좁고 크기가 작았으나 임신되어 경과될수록 더 커지고 핵은 구형으로 되었다(Fig. 1A-C). 대황체세포는 성장중인 가황체에서는 핵과 세포질이 담명하며 원형이지만, 임신이 경과 될수록 핵이 진한 부정형이며 세포질이 짙고 다른 세포사이의 공간에까지 점유하는 형태가 된 세포가 많아졌다. 소황체세포는 임신이 진행될수록 세포가 길어지고 세포질이 짙어지고 섬유세포화하는 세포가 많았다(Fig. 1A-C). 분만직후는 대부분의 황체세포는 세포질이 거의 없고 핵질은 담명하게 잔존하였으나 핵 전체는 축소하여 작아지고 타원형 내지 장방형으로 변하여 섬유세포화 하며 더 조밀하게 밀집하고 있었고, 황체세포의 형태를 유지하고 있는 세포도 핵염색질이 apoptotic bodies가 되어 소실하고 있었으며, 보존된 세포질은 변성 중대되어 염색성이 더 짙거나 다른 세포사의

Table 2. Histological findings of luteal tissue during the course of pregnancy

Pregnant stages	H & E stain			Immunostain		Presumption of function
	Size & closing of luteal cells	No. & width of vessels	No. of fibrocytes	Proliferative cells	Apoptotic cells	
Estrum	27.0~28.0 μm densely	less thin wall	less	++	++	light active
Day 65 and 90	18.5~39.0 μm some densely	many thin wall	some	+++	±	active
Day 120, 200 & 240	39.0~41.8 μm loosely	many thick wall	many	+~++	±~+	most active
Post partum	28.5 μm more loosely many luteal cells into fibrocytes	empty collapse degeneration	many	-	+	inactive

-, not found; ±, rarely observed; +, frequently; ++, moderately; +++, severely.

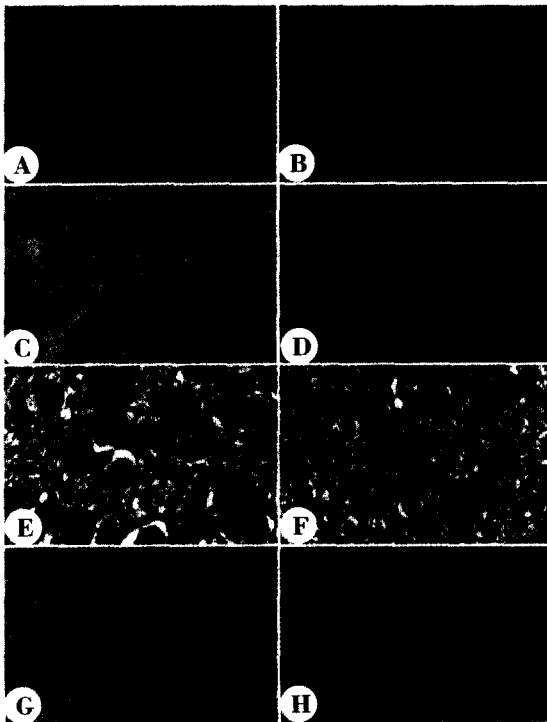


Fig. 1. A. On day 65 of gestation, the luteal cells and other type cells are small and closed, satellite cells and capillaries on the periphery of luteal cells are seen a little. H-E stain, $\times 50$. B. On day 120 of gestation, the luteal cells are more large and loose, Satellite cells and capillaries on the peripheral of luteal cells are seen more number than on day 65 of gestation. H-E stain, $\times 50$.

C. On day 240 of gestation, the luteal cells are most large and the spaces between the cells are broadened. H-E stain, $\times 50$. D. On day 1 postpartum, the stain intensity of the luteal cells and vessels are decreased or disappeared. H-E stain, $\times 50$. E. On day 10-12 after estrum, the connective tissue fibers are fine and a few. Silver stain. $\times 200$. F. On day 65 of gestation, the connective tissue fibers are coarse and more number than on estrus corpus luteum. Silver stain. $\times 50$. G. On day 65 of gestation, numerous positive cells by PCNA antibody appeared. Immunostain, $\times 100$. H. On day 200 of gestation, Apoptotic cells by TUNEL methods appeared a few number. Immunostain, $\times 100$.

간격을 매우며 불규칙한 형태를 하고 있었다(Fig. 1D). 모세혈관은 임신초기에는 관강이 거의 없고 작은 편평상피형의 내피세포만 출현하는 것 같이 작았다(Fig. 1A, B), 임신이 경과할 수록 내피세포가 입방형화으로 커지며 수가 많아지고 혈관의 벽이 두터워 졌으며 일부 혈관은 세동맥형으로 발달하였다(Fig. 1C). 분만직후는 대부분이 공허하고 그 벽이 변성되어 염색성이 소실되고 혈액을 보유한 일부 모세혈관도 혈액의 함유량이 적고 그 수가 현저히 감소하였으나 반대로 세동맥형의 혈관은 벽이 더 두터워 지며 발달하고 증가하였다(Fig. 1D). 도은염색에서는 세망섬유는 임신이 경과함에 따라 황체세포간에서 더 증가하고 굵어지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1E, F).

황체의 기능을 조사하기 위해 조직절편의 단위 면적 당 모든 형의 세포전체의 수와 그 중에 황체세포의 수

(대황체세포와 소황체세포의 수), 대황체세포의 크기 및 모세혈관 단면의 수를 조사하였다. 조사대상 시야의 선택은 결합조직세포가 많고 혈관이 두껍고 발달된 부위는 가급적 피하고 황체세포가 많고 세포질의 크기의 증대로 담명하게 보이고 세포의 밀집이 적어 황체기능이 왕성한 부위를 선택하여 400배의 배율하에서 개체당 10개시야(시야당 250 μm × 250 μm)에 나타나는 세포수를 조사하였고 황체세포의 크기조사에서 소황체세포는 부정형이고 경계가 불명한 예가 많으므로 제외하고, 대황체세포를 대상으로 하여 황체당 50-100개 세포 정도의 직경을 측정하여 그 수치를 평균하였다.

한 시야당 전체 세포의 수는 Fig. 3과 같이 성주기중의 성숙된 가황체는 353.8±27.0개, 임신 65일경에는 242.7±28.3개, 임신 90일경에는 309.3±36.1개, 임신 120일경에는 322.0±30.9개, 임신 200일경에는 284.4±37.6개, 임신 240일경에는 280.6±29.7개, 분만직후는 396.8±52.2개였다. 세포의 크기 증가는 단위면적당 세포수는 감소한다. 황체세포의 크기는 증가하는데도 단위면적당 세포수의 증가를 보였다는 것은 다른 종의 작은 세포(혈관내피세포 결합조직세포)의 증가 즉 세포의 증식을 의미한다.

이러한 소견은 성장중인 임신황체에서는 임신 후 120일경까지 세포수가 증가하고 조직학적으로도 황체세포가 명확히 보존되었으며 이 시기에는 혈관이 더 발달하고 있어 임신후 120일경까지는 세포가 분열하고 황체가 발달하고 있다는 표지를 나타낸 것이다.

성주기의 가황체는 전체세포의 수가 많고 황체세포수와 혈관단면의 수가 적으며 황체를 채취할 때 육안적으로는 성숙황체로 인정되었으나 조직학적으로는 백색체화가 시작되었음을 나타내고 있다.

한시야당 모세혈관 단면의 수(이하 혈관의 수)는 Fig. 3에서와 같이 성숙한 가황체는 82.8±28.6개, 임신 65일경에는 25.3±10.8개, 임신 90일경에는 100.7±19.7개, 임신 120일경에는 71.6±13.1개, 임신 200일경에는 79.4±8.1개, 임신 240일경에는 46.8±17.8개, 분만직후는 16.2±5.0개였다. 임신 65일경에는 황체세포의 수가 혈관의 수보다 많았으나 임신 90일경까지 혈관이 증식하여 황체세포의 수와 비슷한 수치를 하며 분만시까지 유지하고 있었다. 이로 보아 혈관은 임신 90일경까지 가장 발달하고 이후는 더 발달하지 않고 있음을 나타내고 있다.

한 시야당 황체세포 수(괄호내는 전체세포에 대한 황

Table 3. Electron microscopical findings of luteal tissue during the course of pregnancy

Pregnant stages	Luteal cells	No. & thickness of vessels	No. of fibrocytes	Prsumption of function
developing	mitochondria +++ vacuoles ± rER ++	+ thin wall	± ~ +	developed
Estrum				
mature	mitochondria ++++ vacuoles + rER ++ fibrocytes +	++ thin wall	+	active
Day 80	mitochondria ++++ IM bodies + vacuoles + rER + fibrocytes +	+++ thin wall	++	active
Day 90	as above	+++ thin wall	++	active
Day 180	mitochondria +++ mitochondria dilatation ++ vacuoles +++ IM bodies ++ whorls ++ fibrocytes +++ lipid droplets +	+++ large lumen many thick walls	+++	active

IM, intramitochondrial.

±, rarely observed; +, frequently; ++, moderately; +++, severely; +++, numerously.

체세포의 비율)와 대황체세포의 직경(크기)은 Fig. 4에서와 같이 성숙한 가황체는 74.9 ± 23.2 개 ($21.2 \pm 6.6\%$)와 $27.0 \pm 4.0 \mu\text{m}$, 임신 65일경에는 159.6 ± 18.1 개 ($65.8 \pm 7.5\%$)개와 $18.5 \pm 4.3 \mu\text{m}$, 임신 90일경에는 120.3 ± 25.2 개 ($38.9 \pm 8.2\%$)와 $26.0 \pm 6.8 \mu\text{m}$, 임신 120일경에는 64.5 ± 14.7 ($38.9 \pm 8.2\%$)개와 $39.0 \pm 6.0 \mu\text{m}$, 임신 200일경에는 84.0 ± 13.3 ($29.5 \pm 4.7\%$)개와 $41.8 \pm 6.5 \mu\text{m}$, 임신 240일경에는 33.4 ± 10.4 개($11.9 \pm 3.7\%$)와 $39 \pm 8.3 \mu\text{m}$, 분만직후는 13.4 ± 7.0 개 ($3.4 \pm 1.8\%$)와 $28.5 \pm 5.3 \mu\text{m}$ 이었다.

황체세포 크기의 증가는 황체의 기능 증대를 의미하는 반면에 단위면적당 그 수의 감소를 나타낼 것이다. 본 조사에서는 황체세포의 크기는 임신 65일경에서부터 120일경까지 계속 증가하였고, 120일경에서 240일경까지에서 뚜렷한 크기의 변화 없이 지속되었고 분만후는 약간 감소하였다. 반면에 황체세포의 수는 임신 65일에서 240일경까지 계속 감소하고 있었다. 이러한 소견은 240일경까지 황체기능이 왕성하게 유지되고 있음을 의미한다. 그러나 조직 소견상 240일경에는 황체세포사이의 간격을 확대되고 섬유세포의 수가 증가하는 소견이 있어 황체기능의 약화 가능성이 있고 분만 후는 황체세포의 크기와 수의 변화는 적었으나 조직학적으로 황체세포와 혈관의 염색성의 감퇴와 변성, 섬유화, 및 혈관의 공허등의 소견(Fig. 1C)은 황체의 기능상실을 의미한다.

면역조직화학적으로 PCNA항체를 이용한 증식세포의 조사는 임신초기에는 다수 출현하였으나 임신기일이 경과할수록 점차 감소하였고 임신 120일경 이후에는 현저히 감소하였다(Fig. 1G). 반대로 TUNEL법에 의한 apoptosis가 일어나는 세포의 조사는 임신초기에는 거의 나타나지 않았고 후기에도 극소수가 나타나서 황체의 소멸은 황체세포의 apoptosis 보다 황체세포가 결합조직 세포로 변화됨을 알 수 있었다(Fig. 1H).

전자현미경적으로는 그림 2와 같이 성주기중에 성장 중인 황체는 모세혈관이 거의 없고 얇은 내피세포만 처처에 하나씩 나타나고 대부분의 조직이 황체세포로 구성되어나 황체세포의 크기는 현저히 작았다. 소기관은 발달된 편이였고 세포사이에는 액체로 차있는 공간이 많았다. 성숙한 가황체는 사립체가 확장되고 소수의 사립체는 공포화 하였고 또 일부 소수의 사립체내에는 치밀원형과립이 출현한 예도 있었고 지방과립이 출현하는 예도 있었고 성장 중인 황체에서 보다 황체세포가 더 크며, 모세혈관 단면이 황체세포 주변에 위상양으로 나타나고 그 내피는 아직 수가 적고 얇았다. 임신 80일경에는 혈관주위에 섬유세포 수가 더 많아졌고 대소황체세포에 지방과립이 출현하였다. 임신 90일경에는 모세혈

관 단면의 수가 많고 모세혈관의 직경이나 내피세포가 더 크다. 대황체세포는 분비과립이 더 커지고 집단화하고 혈관형성과 관련된 내피세포가 더 많고 공포가 많았다(Fig. 2A, B). 임신 180일경에는 모든 황체세포 주위에

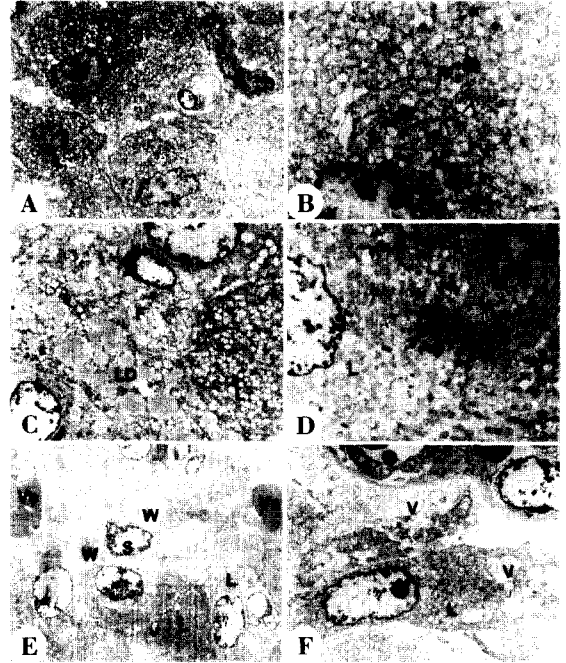


Fig. 1. A. Three large luteal cells (L), a fibrocyte (F) and a transforming luteal cell to fibrocyte are seen in a bovine corpus luteum of day 90 of gestation. The large luteal cells contain numerous mitochondria in cytoplasm. TEM, $\times 3,400$. B. High magnification of Fig 1. Many mitochondria (M) and a few secretory granules in mitochondria are seen. TEM, $\times 17,000$. C. Many lipid droplets (LD) and numerous mitochondria are seen in some large luteal cells (L) of mature spurium corpus luteum of estrous cycle. TEM, $\times 5,950$. D. A large luteal cell (L) contained a cluster of several intramitochondrial bodies (IMB) and a fibrocyte (F) are seen in a bovine corpus luteum of day 90 of gestation. TEM, $\times 8,500$. E. Three lumens (Ve) and endothelial cells of vessels (three corners) and transforming small luteal cells (S) with whorls (W) and large luteal cells (L) to fibrocytes are seen in a bovine corpus luteum of day 180 of gestation. TEM, $\times 3,400$. F. A large luteal cell (L) with some vacuoles (V) and some intramitochondrial bodies and numerous mitochondria are seen in a long luteal cell of day 80 of gestation. TEM, $\times 5,950$.

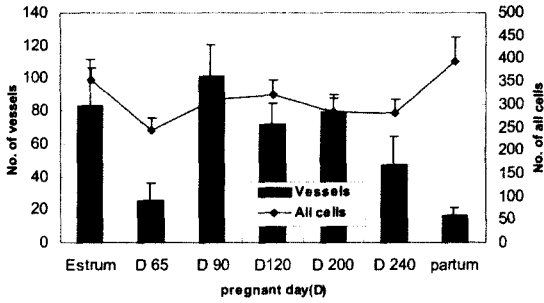


Fig. 3. Comparison of all the cell and vessel number per microscopic field during corpus luteum stages.

모세혈관이 나타나는 것 같이 혈관이 많고 혈관벽이 두터워졌고 혈관형성 중인 내피세포가 크고 많다. 세포질이 넓은 대황체세포는 사립체로 증만되었고 소황체세포는 섬유세포화가 많았다(Fig. 2A-F).

이상에서 임신경과에 따라 가황체 보다 임신황체세포 크기의 증가, 세포주변부 경계 불명확, 변성하는 세포의 증가, 섬유화하는 세포수의 증가, 대황체세포 주변에 혈관은 임신초기에는 관강이 좁았으나 임신이 경과할수록 세포가 크고 세포간에 간격이 넓어지고 혈관벽이 두터워졌으며 혈관 주변부는 결합조직세포로 변하는 대·소황체세포 수가 많아지는 변화가 있었다(Fig. 2E). 또 황체세포의 사립체의 공포화 증가 사립체내 bodies의 증가 등의 소견으로 경과단계의 구별이 가능하였다. 이상에서 황체는 임신기간 중에 기능이 유지되었고 임신 200일경을 전후해서 기능이 가장 왕성하고 임신 240일까지는 약간 감소하는 것으로 추정되었고 분만시는 급격히 퇴축되었다.

대·소황체세포의 결합조직세포화 과정은 대황체세포는 핵과 핵주변부의 세포질만이 잔존하게되고 핵에서 다소 먼 세포질에서부터 사립체의 중대 공포화가 일어나서 세포질이 질게 염색되고 변성확장되어 원래의 형태를 잃게되어 다른 이웃 세포간을 증만하고 있었다(Fig. 2E). 소황체세포는 원래의 세포질을 보존하면서 결합조직세포로 변화하는 현상으로 나타났고, 황체세포의 결합조직세포화는 소황체세포에서 더 많이, 더 초기에 일어나고 있었다.

고 찰

광학현미경적으로 대·소황체세포의 구별에 관하여 Vaughan *et al* [32]은 대황체세포는 원형 또는 난원형이며 세포질은 창백하고 핵은 크며 중심부에 위치하고 염색질이 희박하고 소포상이며 핵소체가 발달하였고, 소

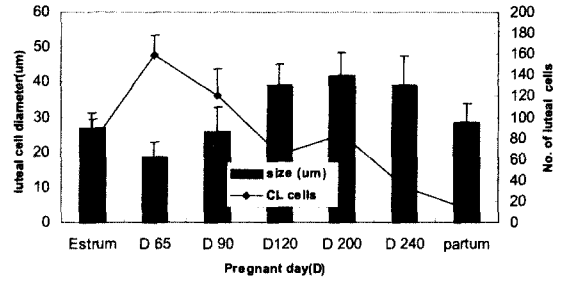


Fig. 4. Comparison of diameter and number of luteal cells per microscopic field during CL stages.

황체세포는 세포질이 질게 염색되고 경계가 불규칙하여 성상이고 핵은 치밀한 염색질을 가졌다고 하였다. 위치에 관하여 소황체세포는 주변부 또는 수주 주변 위를 점유한다고 하였고 [10], 기원에 관하여 대황체세포는 과립막세포에서, 소황체세포는 난포막에서 기원되었다고 하였다 [7, 10].

본 조사에서 광학현미경적으로는 소황체세포 세포질이 질고 형태가 불일정하며 주로 혈관의 주변부를 점유하고 있었고 결합조직세포로 먼저 변화하고 있어 주로 소황체세포에 의하여 임신경과에 따라 섬유화하는 세포수가 많아지고 있었다.

황체세포의 크기에 대하여서는 대황체세포는 30 μm [7], 또는 40 μm 이라고 하였고 [10], 소황체세포는 공히 15 μm 라고 하였다. Fields *et al* [14]은 소에서 대황체세포는 직경이 25-50 μm 이고 소황체세포는 10-15 μm 라고 범위의 폭을 넓게 제시하였고, Dellamann과 Eurell [10]은 황체의 증대는 대황체세포에 의하고 대황체세포가 주기능을 한다고 하였다

본 조사에서 황체의 기능은 대황체세포가 주이므로 측정의 대상을 대황체세포로 하여 직경을 측정하였던바, 임신의 경과에 따라 차이가 있었으나 그 범위는 최저는 임신 65일경에 18.5 \pm 4. μm 에서 최대 임신 200일경에 41.8 \pm 6.5 μm 과 임신 240일경에 39.0 \pm 8.3 μm 로 임신경과에 따라 임신 200일경에 최대로 증대되어 황체기능이 최고에 도달했다. 이후 분만시까지 조금씩 하강하며 지속되는 것으로 생각되었다.

황체의 조직에서 세포의 구성에 대하여 Friedman *et al* [16]은 대·소황체세포가 전체세포의 40%이고 그 외는 내피세포가 50%이상이라고 하였고, 대·소황체의 구성비율에 대하여 Chegini *et al* [9] 등은 소황체세포수는 85%, 대황체세포수는 8~12%라고 하였고, 구성용적에 대하여서는 O'Shea *et al* [23]은 대황체세포는 전체 황체조직 용적의 40.2 \pm 6.3%를, 소황체세포는 22.7 \pm 6.3%

를 점유한다고 하였다. Sawyer [29]는 반추가축에서 발정기의 중기에 황체의 약 60%가 steroidogenic cells이 점유하였고 임신기간 중에도 이들 세포는 존속되었고 구조적 변화는 발정기 말기나 분만 후에 황체가 퇴축 할 때 일어났다고 하였다. 이와 같이 대·소황체세포의 구성비율에 대하여 보고자에 따라 차이가 많거나 상반된 결과를 나타내고 있다. 이러한 결과는 대·소황체세포의 구별의 불확실성에서 온 경우가 많을 것으로 생각된다.

본 조사에서 전체세포수와 황체세포의 수의 비율을 조사한 바 임신 65일경에는 단위 면적당 전체세포수에서 황체세포는 $65.8\% \pm 7.5\%$ 에서 임신 240일 경에는 $11.9 \pm 3.7\%$ 였고 이때 황체세포의 크기는 임신 65일령에는 직경이 $18.5 \pm 4.3 \mu\text{m}$ 에서 임신 240일령에는 $39.0 \pm 8.3 \mu\text{m}$ 로 비대되어 단위면적당 수는 감소가 되었으므로 황체 기능은 더 왕성함을 나타내고 있다.

황체 기능과 그 시기에 대하여서 Gaytan *et al* [17]은 rat에서 임신 12-15일째의 증식작용이 있었는데 이때 세포의 크기와 progesterone 농도의 증가와 일치한다고 하였고, 반대로 Glock *et al* [18]은 사람에서 황체의 빠른 증가는 steroid 생산의 증가와 병행해서 일어나지는 않는데 이는 hormone을 생산하지 않는 세포의 증식 때문이라고 하였다. O'shea *et al* [23]은 양에서 황체는 임신 50일까지는 임신에 중요한 역할을 하고 그 후는 태반이 progesterone의 중요공급원이며, 황체의 무게는 임신 40일까지는 발정기동안과 비슷하고 그 후 분만시까지 작아지며 형태의 변화는 30일과 100일 사이는 거의 없고 142일째는 퇴행성 변화와 괴사된 세포출현, 림프구침윤 등이 있었다고 하였다. 임신기간 150일을 3기로 나누어 볼 때 1기 이후는 황체의 기능이 약화되고 또 분만 10 일경의 전부터 황체의 변화가 시작된 것으로 정리할 수 있다. 그러나 Gunther *et al* [19]은 말에서 혈장내 progesterone의 농도는 분만후와 발정기에는 0.51과 0.53 ng/ml였고 황체기는 3.88과 임신기는 4.22 ng/ml라고 하여 임신기에 황체의 기능이 가장 높다고 하였다. Sawyer [29]는 반추가축에서 발정기의 중기에 황체의 약 60%가 steroidogenic cells이 점유하였고 임신기간 중에도 이들 세포는 존속되었고 구조적 변화는 발정기 말기나 분만 후에 일어났다고 하였고 조직학적 변화는 내피세포의 소멸 모세혈관관강내 세포잔재와 apoptotic body에 의한 폐쇄, 호산구 대식구의 출현, 실질세포의 용해 등의 소견이 있었고, 분만후 35일째에 황체가 백체로 완전히 변했다고 하였다.

황체는 기능이 왕성하면 크기가 증대되는데 이는 황체세포는 다른 세포보다 월등히 커서 단위면적 당 전체 세포수는 오히려 감소한다. 반면에 기능이 감퇴되면 황

체세포는 결합조직세포로 변화하거나 모세혈관과 같이 소멸되어 수가 적어지고 결합조직세포는 증식하므로 단위 면적당 전체세포수는 많아진다.

본 연구에서 단위 면적당 전체세포수를 조사한바 임신 65일경에서 분만시까지 황체세포의 증대로 인하여 단위 면적당 황체세포의 수는 감소하였다. 황체세포가 커지면 기능이 증대되고 있는 것으로 생각되는 것으로 생각되나 임신 240일 경에는 황체세포간의 간격이 넓어지고 섬유화세포는 더 증가되어 황체의 기능은 임신 200일경을 전후해서 가장 왕성한 것으로 간주되었고 분만직후에는 조직학적으로 황체의 퇴행이 현저하였다.

Norman과 Litwack [20]는 임신말기는 황체보다 태반에서 progesterone을 더 많이 분비한다고 한 바와 같이 임신 200일경을 전후해서 가장 기능이 왕성하고 240일 경에도 커서 황체의 기능이 태반과 같이 임신말기까지 왕성하게 진행됨을 알 수 있었다.

면역조직화학적 염색에서 황체에서 황체세포의 증식은 황체의 발달을, 결합조직세포의 증식은 백색체화를 의미한다. Gaytan *et al* [17]은 rat에서 임신 1-3일째의 비분비세포인 혈관내피세포가 증가하였고 임신 12~15일과 21일에 두 회에 걸쳐 유사분열이 일어나는 세포들이 관찰되고 12-15일째의 증식작용은 세포의 크기와 progesterone농도의 증가와 병행하였다고 하였다.

본 조사에서는 PCNA 황체를 이용하여 면역조직화학적으로 증식세포를 조사한바 임신초기에 다수 출현하고 임신 120일경 이후는 현저히 감소하여 임신 120일경까지 세포수의 증가에 의해 발달하고있음을 나타내고 있었다.

황체에서 Apoptosis가 일어나는 세포가 증식세포보다 많으면 황체의 퇴축을 의미한다. Vaughan *et al* [32]은 과배란 유기 소에서 황체의 apoptosis 황체와 난포의 퇴축에 기여한다고 하였고, Yuan과 Giudice [34]는 황체와 난포의 기능은 apoptosis소견에 의하여 평가되며 양성반응은 세포가 변성하고 있음을 나타내는데 주로 대황체 세포에서 나타난다고 하였다. 본 조사에서는 TUNEL법을 이용한 바 극소수만 나타냈으므로 퇴축은 소멸보다 결합조직화하여 백색체화 하는 것으로 알 수 추정되었다.

전자현미경적으로 대·소황체세포의 구별에 대하여서는 대황체세포는 핵이 소포성구형이고, 다양한 크기의 포말의 집단이 불 일정하게 존재하며 사립체는 많고 밀집되나 짧고 많은 sER이 있고, 지질과립은 임신 3기 중에 가장 수가 많다고 하였으며 이 시기에는 사립체내에 막으로 경계된 치밀한 150-300 nm 크기의 과립들이 Golgi 장치내에 또는 핵근처에 축적되었는데 이들 과립은 임신 45일에 처음 관찰되고 200일째는 수가 가장 많

고, 소황체세포 보다 더 많은 사립체, 지질과립, 용해소체, 치밀과립 등을 가졌으며 whorls 구조는 없다고 하였고, 소황체세포는 크기가 작고 rER의 집단, sER의 whorls, 포함체양의 crystalline을 포함한 긴 사립체를 가졌고, lipids가 많고 소기관이 적고 포말 및 주름과 짧은 미세융모를 가졌다고 하였다 [9, 10, 13].

본 조사에서 대황체세포에서 짧은 사립체의 밀집과 소황체세포의 sER의 whorls의 소견은 가장 용의한 구별점이고 핵의 형태와 과립의 형태와 유무로는 명확한 한계를 제기하기가 곤란하였다.

Paavola와 Boyd [24]에서 guinea pig의 황체세포에서 임신여부와 관계없이 분비과립과 혼재해 있는 세 가지 형인 microperoxisomes(0.2 μ m), 용해소체(0.5 μ m), multi-vesicular bodies(0.4 μ m)과립이 있었는데 임신기 또는 성주기의 황체활동기에는 황체세포에서 73-80%가 microperoxysomes이었다고 하였고, Parry *et al* [25]은 황체세포에 3가지 과립 즉 microperoxisomes, 일차용해소체 및 분비과립의 농도는 성주기 중의 progesterone의 분비와 관련이 있고 성주기중의 중간에 대황체세포에서 현저히 나타난다고 하였고, Takehana *et al* [31]은 임신황체의 대황체세포내 사립체내에 intramitochondrial bodies (IMB, 200-900 nm)는 임신이 경과할수록 증가한다고 하였고, Yamada *et al* [33]은 임신한 소의 대황체세포는 steroid 생산세포의 특징인 IMB는 구형 또는 난원형이고 직경이 0.1-1.5 μ m이라고 하였다.

본 조사에서 전자현미경적으로 가능한 IMB만을 조사한바, 임신한 황체에서 나타나서 임신경과에 따라 증가하였으나 황체기능을 비교하기에는 그 수나 보유세포가 적어 임신경과의 지표로는 가치가 적었고 황체세포의 크기와 사립체의 발달정도, 섬유화 정도, 내피세포의 크기 등이 가장 황체의 기능을 나타내는 소견으로 추정되었다.

결 론

소에서 progesterone의 혈중농도는 황체의 크기, 중량, 형태와 밀접한 관계가 있다. 그러나 임신후반기에는 황체가 그대로 존속하고 있으나 태반이 progesterone생산에 더 많은 역할을 한다고 하였으므로 progesterone 측정치는 황체와 태반의 몫의 기능을 구분하기는 불가능하다.

본 연구는 소에서 성주기 중에 발달한 가황체와 임신황체인 진황체의 구조적 차이, 진 황체 중에서도 임신경과일에 따른 구조적 차이를 조사하여 임신경과에 따른 난소의 기능의 변화를 조직학적, 면역조직화학적 및 전자현미경적으로 조사하여 황체구조에 의한 임신여부

의 차이, 임신중의 황체의 기능 여부 등을 조사하였다.

1. 임신 120일경까지 황체내 단위 면적당 세포수가 증가하고 있고 황체내 모세혈관은 임신 90일까지 증식하고 있고 그 후는 관강과 벽의 증대가 있어 임신 120일경까지는 황체가 더 발달하고 있음을 나타내었다.

2. 황체세포의 크기는 임신 65일경에서부터 200일경까지 증가하여 임신 200일 전후에 기능이 가장 왕성함을 나타내었고 임신 240일경도 황체기능이 왕성하게 유지되고 있었다.

3. 분만후는 황체세포의 크기와 수의 변화는 적었으나 황체세포와 혈관의 염색성의 감퇴와 변성, 섬유화, 및 혈관의 공허등의 소견이 있어 기능이 상실됨을 나타내었다.

4. 면역조직화학적으로 PCNA항체를 이용한 증식세포의 조사는 임신초기에는 다수 출현하였으나 임신일이 경과할수록 점차 감소하였고 임신 120일경 이후에는 현저히 감소하였다. 반대로 TUNEL법에 의한 apoptosis가 일어나는 세포의 조사는 임신초기에는 거의 나타나지 않았고 후기에도 극소수가 나타나서 황체의 증대는 임신 120일까지 많이 일어나며, 황체의 퇴축은 황체세포의 apoptosis화 보다 황체세포의 결합조직세포화로 인함을 알 수 있었다.

5. 전자현미경적으로는 가황체 보다 임신황체가 또 임신경과에 따라 황체세포 크기가 증가하고 세포질에는 사립체가 더 밀집하고 종대화 하는 수도 더 증가되었고, 임신황체에서는 임신경과에 따라 황체세포간의 간격의 증대와 섬유화하는 세포수의 증가, 대황체세포 주변의 모세혈관의 관강의 증가, 혈관벽의 비후, 혈관의 주변부에 결합조직세포로 변하는 대·소황체세포 수가 많아졌다.

이상에서 황체는 임신기간내 기능이 유지되었고 임신 200일경 전후에 기능이 가장 왕성하였고 그 후 임신 240일경까지도 기능이 왕성하게 유지되고 있었고, 임신 분만시는 급격히 퇴축되었다.

참고문헌

1. 강중구, 박수동, 김무강, 김성호, 신태균. 태아태령 측정. 가축발생학. 대구, 경북대학교 출판부. 2001, 79-83.
2. 박수동, 표병민, 양재훈, 김철호, 서득록, 고필욱, 강정부. 경남지방의 도태우에 불임과 관련된 난소의 형태학적 관찰. 2. 난소낭종의 발생과 낭종형태에 대하여. J. Vet. Clin. 2002, 19(2), 153-158.
3. 양재훈, 표병민, 서득록, 고필욱, 강정부, 김종섭,

- 곽수동. 경남지방의 도태우에 불임과 관련된 난소의 형태학적 관찰. 1. 난포와 황체의 출현에 대하여. *J. Vet. Clin.* 2002, **19(2)**, 147-152.
4. **Al-Zi'abi, M. O., Fraser, H. M. and Watson, E. D.** Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduc.* 2002, **123(1)**, 67-77.
 5. **Anderson, M. B., Vaupel, M. R. and Sherwood, O. D.** Pregnant mouse corpora lutea: Immunohistochemical localization of relaxin and ultrastructure. *Biol. Reprod.* 1984, **31**, 391-397.
 6. **Bacci, M. L., Barazzoni, A. M., Forni, M. and Costerbosa, G. L.** In situ detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: evidence of an early presence of DNA fragmentation. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1996, **13(4)**, 361-372.
 7. **Bloom, W. and Fawcett, D. W.** Formation of the corpus luteum in "Textbook of Histology". pp. 871-873, 10th ed., W. B. Saunder Co., Philadelphia. 1975.
 8. **Bruce, N. W., Hisheh, S. and Dharmarajan, A. M.** Patterns of apoptosis in the corpora lutea of the rat during the oestrous cycle, pregnancy and in vitro culture. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001, **13**, 105-109.
 9. **Chegini, N., Ramani, N., and Rao, C. V.** Morphological and biochemical characterization of small and large bovine luteal cells during pregnancy. *Mol. Cell Endocrinol.* 1984, **37(1)**, 89-102.
 10. **Dellmann, H. D. and Eurell, J. A.** Female reproductive system in "Textbook of veterinary histology". pp. 247-269, 5th ed, Lippincott Williams, Philadelphia. 1998.
 11. **Dharmarajan, A. M., Bruce, N. W., and Waddell, B. J.** Quantitative changes in steroidogenic organelles in the corpus luteum of the pregnant rat in relation to progesterin secretion on day 16 and in the morning and afternoon of day 22. *Am. J. Anatom.* 1991, **190**, 273-278.
 12. **Dilys, M., Parry, D. L., Willcox, D. L. and Thorburn, G. D.** Ultrastructural and cytochemical study of the bovine corpus luteum. *J. Reprod. Fert.* 1980, 349-357.
 13. **Fields, M. J., Barros, C. M., Watkins, W. B. and Fields P. A.** Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow. *Biol. Reprod.* 1992, **46(4)**, 535-545.
 14. **Fields, M. J., Dubois, W., and Fields, P. A.** Dynamic features of luteal secretory granules: Ultrastructural changes during the course of pregnancy in the cow. *Endocrinol.* **117**, 1675-1682.
 15. **Fields, P. A. and Fields, M. J.** Ultrastructural localization of relaxin in the corpus luteum of the nonpregnant, and pregnant pig. *Biol. Reprod.* **32**, 1169-1179.
 16. **Friedman, A., Weiss, S., Levy, N. and Meidan, R.** Role of tumor necrosis factor α and its type 1 receptor in luteal regression: Induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. *Biol. Reprod.* 2000, **63**, 1905-101.
 17. **Gaytan, F., Morales, C., Bellido, C. and Aguilar, E.** Proliferative activity in the different ovarian compartments in cycling rat estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique. *Biol. Reprod.* 1996, **54(6)**, 1356-1365.
 18. **Glock, J. L., Nakajima, S. T., Stewart, D. R. and Brunsted, J. R.** The relationship of corpus luteum volume to relaxin, estradiol, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and human chorionic gonadotropin levels in early normal pregnancy. *Early Pregnan.* 1995, **1(3)**, 206-211.
 19. **Gunther, J. D., Foley, C. W., Gaverick, H. A. and Plotka, E. D.** Comparison of milk and blood plasma progesterone concentrations in cycling and pregnant mares. *J. Anim. Sci.* 1980, **51(5)**, 1131-1138.
 20. **Norman, A. W. and Litwack, G.** Steroid hormone in Hormones. Academic Press INC, Orlando. 1987, pp. 578-583.
 21. **Okuda, K., Sato, K., Ono, H. and Miyake, M.** Die beziehung zwischen den morphologischen eigenschaften des corpus luteum und dem progesteronehalt im bluteserum bei Kuehen. *Obihiro Univ. Report.* 1981, **12**, 115-124.
 22. **O'Shea, J. D. and McCoy, K.** Weight, composition, mitosis, cell death and content of progesterone and DNA in the corpus luteum of pregnancy in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 1988, **83**, 107-117.
 23. **O'shea, J. D., Rodgers, R. J. and D'Occhio, M. J.** Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *J. Reprod. Fert.* 1989, 483-487.
 24. **Paavola, L. G. and Boyd, C. O.** Cytoplasmic granules in luteal cells of pregnant and non-pregnant guinea pigs. A cytochemical study. *Anatomical Record*, 1981, **201**, 127-140.
 25. **Parry, D. M., and Willcox Thorburn, G. D.** Ultrastructural and cytochemical study of the bovine

- corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 1997, **60(2)**, 349-357.
26. **Patel, O. V., Hirako, M., Takahashi, T. and Domeki, I.** Hirato Sex steroid levels throughout gestation in cow carrying normal and malformed fetuses, *J. Vet. Med. Sci.* 1995, **57(4)**, 659-663.
27. **Rashael, S. S.** Gomori's silver impregnation stain for reticulum in "Lynch's medical laboratory technology". 3th, WB Saunders, Philadelphia. 1976, pp. 994-995.
28. **Rodgers, R. J., Rodgers, H. F., Waterman, M. R. and Simpson, E. R.** Immunolocalization of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and ultrastructural studies of bovine corpus lutea. *J. Reprod. Fert.* 1986, **78**, 639-652.
29. **Sawyer, H. R.** Structural and functional properties of the corpus luteum of pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1995, **49**, 97-110.
30. **Stoelk, E., Chegini, N., Lei, Z. M., Rao, C. H. and Bryant-Greenwood, G.** Immunocytochemical localization of relaxin in human corpora lutea: Cellular and Subcellular distribution and dependence on reproductive state. *Biology of Reproduction*, 1991, **44**, 1140-1147.
31. **Takehana, K., Abe, M., Yamada, O. Lida-Abe, M., and Iwasa, K.** Morphological study of bovine pregnant corpus luteum cells. *Anat. Histol. Embryol.* 1997, **26(3)**, 231-235.
32. **Vaughan, L., Fitzpatrick, E., and Boland, M. P.** 1996. A histological study of corpus lutea from superovulated beef heifers. *An. Reprod. Sci.* 1996, **43**, 1-14.
33. **Yamada, O., Abe, M., Takehanam, K., Iwasa, K. and Haraga, T.** Scanning Electron microscopical observation of the intramitochondrial body in the bovine corpus luteum during pregnancy and after parturition. *J. Vet. Med. Sci.*, 1994, **56(3)**, 459-464.
34. **Yuan, W. and Giudice, L. C.** Programed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, **82(9)**, 3148-55.