

## 미성숙 쥐에 이식한 뇌하수체의 경시별제거가 배란유도와 Estrogen 및 Progesterone 수준에 미치는 영향

이장헌 · 김영훈 · 이 완  
서울대학교 수의과대학

## Effects of Removal Times of Transplanted Pituitary Gland on Induction of Ovulation and Levels of Estrogen and Progesterone in Immature Rats

J. H. Lee, Y. H. Kim and W. Lee

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon*

### Summary

The present work was designed to understand the mechanism of superovulation and the cause of early embryo loss and implantation failure in the superovulating immature female rats which were elaborated by a pituitary gland transplantation. A pituitary gland obtained from the orchidectomized rats was transplanted under the right kidney capsule of 28 day old female rats (PGT group) on the starting day of experiment which was designated as Day 2. The grafted pituitary glands were removed at 6h (RPGT 6h group), 12h (RPGT 12h group) and 24h (RPGT 24h group) after the transplantation. Control rats were treated with 4IU PMSG on Day 2 (PMSG group). The estrous cycle and the levels of plasma progesterone and estradiol-17 $\beta$  were observed on Day 0, Day 5, respectively. The implantation sites, the weights of ovary and uterus, and the number of corpora lutea were examined in all group on Day 8. The result obtained were summarized as follows:

1. The percentages of the number of the rats in proestrus and estrus were 93.0%, 82.6%, 0%, 90.7% and 89.5% in PMSG, PGT, RPGT6h, RPGT12h and RPGT24h group, respectively. The synchronization of estrus cycle was achieved in all groups.
2. The mating rates of each group were 80.2, 75.0, 0, 56.4, 57.8% in PMSG, PGT, RPGT6h, RPGT12h, RPGT24h group, respectively.
3. The numbers of corpora lutea on Day 8 were  $47.1 \pm 4.9$ ,  $18.1 \pm 0.5$ ,  $14.1 \pm 0.3$  and  $8.9 \pm 0.3$  in PGT, RPGT24h, RPGT12h and PMSG group, respectively. There were significantly difference between all groups ( $P < 0.05$ ).
4. The numbers of implantation sites ( $18.1 \pm 4.0$ ) in PGT group on Day 8 were higher than those of PMSG ( $8.5 \pm 2.5$ ), RPGT 12h ( $9.8 \pm 0.2$ ) and RPGT 24h group ( $10.8 \pm 0.2$ ) ( $P < 0.05$ ).
5. The ovarian weights in PGT ( $95.2 \pm 14.3\text{mg}/100\text{g BW}$ ), RPGT12h ( $51.7 \pm 0.6\text{mg}/100\text{g BW}$ ), and RPGT24h ( $57.9 \pm 0.9\text{mg}/100\text{g BW}$ ) groups were significantly higher than those of PMSG group ( $30.4 \pm 7.4\text{mg}/100\text{g BW}$ ) ( $P < 0.05$ ).
6. The uterine weights in PMSG ( $672.4 \pm 4.7\text{mg}/100\text{g BW}$ ), and PGT ( $660.7 \pm 7.8\text{mg}/100\text{g BW}$ ) groups were greater than those of RPGT 12h ( $403.0 \pm 1.1\text{mg}/100\text{g BW}$ ) and RPGT 24h ( $490.1 \pm 0.9\text{mg}/100\text{g BW}$ ) group ( $P < 0.05$ ).
7. The plasma progesterone levels in PGT groups (15ng/ml) on Day 5 were higher than those of PMSG (83ng/ml), RPGT 12h (57ng/ml), RPGT24h (81ng/ml) group ( $P < 0.05$ ).
8. The plasma estradiol-17 $\beta$  levels in PMSG group (185pg/ml) on Day 5 were higher than those of RPGT 24h (13pg/ml) group ( $P < 0.05$ ). But estradiol-17 $\beta$  levels in PGT and RPGT 12h group were too low to discuss.

## 서 론

과배란의 유도는 배란, 수정 및 초기배의 분화에 대한 실험적 연구에 있어 필요하다. 오늘날에 와서는 사람과 우수한 동물 품종에서 질 좋은 난자를 보다 많이 생산하여 이들 난에 핵치환, 성감별 등 유전자 공학을 적용함으로써 채외수정 및 수정란 이식을 실시하고 있다. 이러한 방식은 불임문제의 해결(Steptoe와 Edwards, 1976; Lopata, Brown, Leeton, Mac Talbot와 Wood, 1978)과 가축의 생산력 증진(Betteridge, 1977) 등에 많이 이용되고 있다.

일반적으로 과배란은 임마형성성선자극호르몬(PMSG)과 임부 용모성 성선 자극호르몬(HCG)을 동시에 투여하거나 각각 단독으로 투여함으로써 유도하고 있다(Zarrow와 Quinn, 1963; De La Lastra, Forcelledo와 Serrano, 1972; Kostyk 등, 1978; Miller와 Armstrong, 1981a; Yun와 Kwun, 1984).

그러나 이러한 외인성성선자극호르몬의 투여에 의해 과배란이 유도되었을 때는 외인성 성선 자극 호르몬이 난소를 과잉 자극함으로써 난포성장이 비정상적으로 급속히 이루어지게 된다. 이러한 경우에는 교미율의 감소, 염색체의 이상 등과 같은 난의 질적 저하현상이 나타날 수도 있고, 또한 배란 전후에 난소로부터 분비되는 호르몬의 분비양상이 변화함으로써 초기 배의 손실, 수정의 실패, 배의 발육지연, 배의 비정상적인 발육, 배의 변성, 난의 비정상적인 자궁내 이동과 착상의 실패 등의 현상이 나타난다. 이와같은 현상은 모체측 환경인자의 변화가 한계성을 가지기 때문이다(Fujimoto 등, 1974; Maudlin와 Fraser, 1977; Miller와 Armstrong, 1981b; Evans와 Armstrong, 1984).

모체측의 이러한 한계성은 너무 많은 배들 사이의 경쟁, 모체측의 영양조달 능력의 한계, progesterone의 결핍 등에 기인한다(Allen와 MacLaren, 1971). 특히 Miller와 Armstrong(1982)은 과배란 처리후에 있어서의 착상실패 등에 대한 주된 원인은 수정후 난소로부터 과량 분비되는 estrogen이 수정란의 이동속도를 촉진시키거나 난관의 괄약근을 수축시켜 초기에 난이 자궁내로 이동하는 것을 지연시킴으로써 수정란과 자궁 사이에서의 수용성이 서로 균형을 이루지 못하게 되는 데에 있다고 시사한 바 있다. 그렇기는 하나 위에서 언급한 것

과 같은 과배란 처리후에 나타나는 여러 문제점에 관해서는 아직까지는 그 원인이 정확하게 구명되어 있지 않다. 한편, 뇌하수체를 미성숙 암쥐의 신장 피막 밑에 이식하였을 때는 PMSG를 처리했을 경우에 있어서와 마찬가지로 조기 질 개구, 첫 배란 시기의 촉진, 사춘기의 조기발현 그리고 과배란 등과 같은 조기 생식능력 획득 현상이 관찰되었다(Seki 등, 1972; Advis와 Ojeda, 1978, 1979; Taya 등, 1983). Advis 등(1978)은 이식된 뇌하수체로부터 분비되는 prolactin이 조기 질 개구 및 조기 사춘기 발현과 밀접한 관계가 있다고 하였다. Taya 등(1983)은 이식된 뇌하수체에 저장되어 있던 성선 자극호르몬 중에서 특히 FSH가 일시적으로 과량 분비되어, 이 FSH가 많은 수효의 난포를 성숙시킴으로써 과배란 현상을 나타나게 한다고 하였다. 그리고 Yang 등(1985)은 뇌하수체 이식에 의해 과배란된 난은 과량의 PMSG 처리로 인한 경우에 있어서 처럼 발육 지연 및 변성 등의 비정상적 현상을 나타내었으며 이러한 현상은 혈중 estrogen 수준과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다.

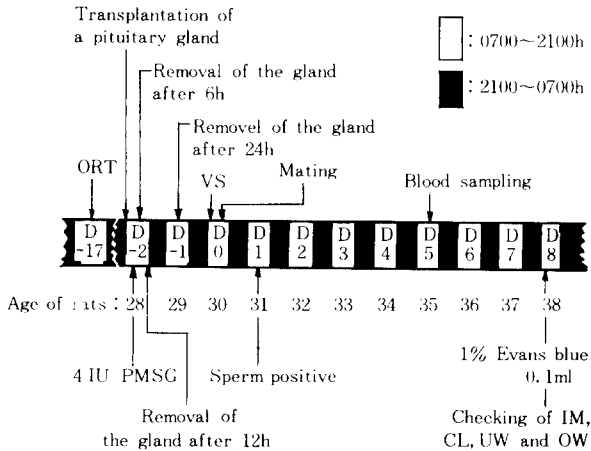
이러한 상황에서 본 실험에서는 미성숙 쥐에 있어서 뇌하수체 이식후 이식된 뇌하수체를 계속 지속시키거나 경시별(6시간후, 12시간후 및 24시간후)로 제거하였을 때의 과배란, 착상정도 그리고 착상시기의 혈중 성 호르몬 수준을 측정하여 그 결과로 서로 비교함으로써 뇌하수체 이식에 의한 과배란 유도 효과와 초기 난의 소실 및 착상실패에 관한 기전과 원인을 밝혀보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에서는 서울대학교 부속 실험동물 사육센터와 주식회사 유한양행 중앙연구소 부설 실험동물 사육장에서 분양받은 생후 21일령 Sprague-Dawley 종 rat를 사용하였다. 본 실험에서는 이들 쥐를 polycarbonate cage(25×40×17cm, 명진기계상사 제품)에 7마리씩 넣어 22±2℃의 실온에서 28~30일령이 될 때까지 예비사육 하였고, 임신이 판정된 후에는 각각 1마리씩 분리하여 사육하였다.

실험동물용 펠리트사료(삼양사료)와 음수는 자유롭게 섭취하게 하였으며, 채광조건은 14시간(0700~2100h)으로 했다.



**Fig. 1.** The schematic representation of the protocol made on the present work. ORT:Orchidectomy;PMSG:Pregnant mare serum gonadotropin;VS:Vaginal smear;IM:Implantation;CL:Cropus luteum;UW:Uterine weight;OW:Ovarian weight.

모든 처치와 약물투여는 Fig. 1에 표시되어 있는 실험진행표 대로 실시하였다.

## 2. 뇌하수체 이식

28~30일령 수쥐 950마리를 1000~1200h에 ether로 경마취하고서 고환제거수술을 실시하였다. 수술 후 15일간의 적응기간을 거친 후(45일령) 뇌하수체 이식 당일의 수술직전(0800~1000h)에 경추탈골법으로 희생시켜 머리피부와 두개골을 제거하고서 대뇌질의 피막으로 둘러싸인 뇌하수체를 노출시키고 이를 핀셋으로 신속히 분리해 내었다. 분리한 뇌하수체는 35~37°C의 멸균식염수가 담겨 있는 petri dish에 옮기고 15 gauge polyethylene tube로 흡입하여 이식에 사용하였다.

30~35일령 미성숙 암쥐 950마리를 ether로 경마취한 후에 양와자세로 고정하고 복측면을 1~1.5cm 정도 절개하여 오른쪽 신장을 조심스럽게 복강외로 노출시켰다. 노출된 신장의 피막에 멸균된 주사기 바늘로 구멍을 내어 피막과 신장실질 사이의 공간에 15 gauge polyethylene tube를 통해 준비된 뇌하수체를 이식하였다. 이식이 끝난 신장은 원래대로 복강내로 수복시킨후 복벽과 피부를 각각 봉합하였다.

뇌하수체 분리에서 이식까지에 소요되는 시간은

5분을 넘지 않게 하였으며 이식당일을 Day 2로 정하였다.

## 3. 이식된 뇌하수체의 경시별(6시간후, 12시간 후 및 24시간후) 제거

뇌하수체를 이식한 시간을 기준으로 6시간후, 12시간후 및 24시간후에 각 처치군을 ether로 경마취하고서 이식할 때와 동일한 방법으로 신장을 노출시켜 핀셋으로 조심스럽게 뇌하수체를 제거했다. 그리고서 복벽과 피부를 각각 봉합하였다. 제거시에 소요되는 시간은 5분이내로 하였으며 수술후 6시간내에 기력을 완전히 회복한 것만을 실험에 사용하였다.

대조군에 대해서는 뇌하수체 이식 당일(0800~0900h)에 생리식염수로 희석된 PMSG(Intervet사 제품) 4 IU씩을 피하주사한 후 앞에 기술한 뇌하수체 이식과 동일한 절차로 가짜수술을 실시했다. PMSG 주사 당일을 Day 2로 하였다.

## 4. 교미와 임신 확인

뇌하수체를 이식한 쥐, 이식된 뇌하수체를 경시별(6시간후, 12시간후 및 24시간후)로 제거한 쥐 및 4 IU씩의 PMSG를 주사한 모든 쥐에 대해서는 이식 또는 주사후 48시간이 지났을때, 즉 Day 0 1400~1600h에 질도말법을 실시하여 발정전기 proestrus와 발정기 estrus에 있는 암컷만을 골라 교미시켰다. 교미당일을 Day 0로 정하였다.

교미는 번식능력이 있는 Sprague-Dawley종 수컷 1마리당 암컷 2마리를 합사함으로써 이루어지게 했다. 교미 다음날 1000~1100h에 질내의 copulatory plug를 확인할 수 있거나 질도말법으로 정자를 확인할 수 있는 암컷만을 골라내어 실험에 사용하였다. 이 날을 임신 1일(Day 1)로 정하였다.

## 5. 착상수, 황체수, 난소무게 및 자궁무게의 측정

임신 8일(Day 8)째 1400~1500h에 실험군과 대조군을 다같이 ether로 경마취한 후 경정맥을 통해 생리식염수로 희석된 1% Evans blue 염색액(Sigma사 제품) 0.1ml를 주입했고 그후 10분이 지나면 경추탈골법으로 희생시켜 복강을 절개하고서 난소와 자궁을 적출하였다. 잘라낸 난소와 자궁의 주위에 붙어 있는 지방조직과 인대를 깨끗이 제거하고

서 자궁내의 착상수를 육안으로 관찰하였다. 착상수를 관찰하고 난 후 난소와 자궁의 수분을 티슈페이퍼로 제거하고 토션밸런스로 난소와 자궁무게를 각기  $10^{-3}g$ 까지 측정하였다. 무게 측정이 끝난 난소는 다시 0.6ml의 생리식염수가 담긴 petri dish에 옮기고서 양인입체 현미경(AO사 제품)으로 40배율하에서 황체수를 측정하였다.

이식후 경시별 제거군에서는 복강을 절개하였을 때 이식된 뇌하수체가 완전히 제거되어 있지 않은 것, 난소가 부벽과 유착되어 있는 개체, 그리고 뇌하수체 이식군에서는 이식된 뇌하수체에서의 혈관 분포가 빈약한 것은 모두 실험에서 제외하였다.

### 6. Estradiol-17 $\beta$ 와 Progesterone의 수준측정

임신 5일(Day 5)째 1100~1300h에 각 처치군과 대조군에서 각각 107마리와 21마리의 실험동물을 무작위로 선택하여 ether로 경마취한 후 우측 경정맥을 노출시키고서 heparin(Sigma사 제품)으로 항응고 처리한 1회용 주사기를 사용하여 혈액 약 3ml를 채취하였다. 채취한 혈액은 3000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층의 혈장만을 분리 회수했다. 이 혈장은 radioimmunoassay(RIA)를 실시할 때까지  $-20^{\circ}C$ 의 냉동상태에서 보관하였다.

혈장중의 estradiol-17 $\beta$ 과 progesterone의 수준을 측정할 때는 steroid 호르몬 측정용 RIA kits인 Coat-A-Count Estradiol과 Coat-A-Count Progesterone(Diagnostic Product사 제품)을 사용하였다.

## 결 과

### 1. 발정주기와 교미율

뇌하수체를 이식한 군(PGT군), 뇌하수체를 이식한 후 6시간만에 제거한 군(RPGT 6h군), 12시간만에 제거한 군(RPGT 12h군)과 24시간만에 제거한 군(RPGT 24h군) 및 4 IU의 PMSG를 투여한 대조군(PMSG군)의 5개 실험군에서 처치 2일후(Day 0)에 질도말법을 실시하여 발정주기를 살펴본 결과 RPGT 6h군을 제외한 각 군에서 각기 64.7%, 76.7%, 68.1% 및 71.1%가 발정전기 proestrus 상태였고, 각기 17.9%, 14.0%, 21.4% 및 21.9%가 발정기 estrus에 있었으므로 발정주기가 거의 동기화되어 있는 것을 모두 관찰할 수 있었으나 이식후 6시간만에 제거한 군에서는 모두가 anestrus를 나타내고 있었다(Table 1). 그리고 교미율은 PGT군, RPGT 12h군, RPGT 24h군 및 PMSG군에서 각각 75.0%, 56.4%, 57.8% 및 80.2%를 나타내고 있는 것으로 보아 미성숙 암쥐에서 뇌하수체를 이식한 후 그 뇌하수체가 동물 체내에 6시간 이상 존재하였을 때는 6시간 이후의 제거 여부에 관계없이 48시간이 지나면 첫 발정이 유도되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 2). 그리고 교미가 성공한 전 실험동물에 있어서 자궁각이 정액에 의해 팽대되었으나 임신을 확인하는 과정에서 경시별 제거군(RPGT 12h군과 RPGT 24h군)에서는 PGT군

**Table 1.** Number of Rats in Each Estrus Cycle in the Immature Rats transplanted a Pituitary Gland and the Rats removed the Gland at 6h, 12h and 24h after Transplantation, and the Rats administered 4 IU PMSG on Day 0

Treatment	No. of rats used	Estrus cycle on Day 0							
		Diestrus		Proestrus		Estrus		Metestrus	
		No. of rats	%	No. of rats	%	No. of rats	%	No. of rats	%
PGT	207	36	17.3	134	64.7	37	17.9	0	0
RPGT 6h	100	0	0	0	0	0	0	0	0
RPGT 12h	308	29	9.3	236	76.7	43	14.0	0	0
RPGT 24h	309	33	10.5	210	68.1	66	21.4	0	0
4 IU PMSG	129	9	7.0	92	71.1	28	21.9	0	0
Total No. of rats	1,053	107		672		174		0	

PGT: Pituitary gland transplantation; RPGT: Removal of the pituitary gland transplanted; PMSG: Pregnant mare serum gonadotropin.

과 PMSG군에 비해 copulatory plug를 거의 확인 할 수 없었으며, 질 도말법에 의해 정자를 확인함으로써만 임신을 확인할 수 있었다.

**Table 2.** Mating Rate in the Immature Rats transplanted a Pituitary Gland and the Rats removed the Glands at 6h, 12h and 24h after Transplantation, and the Rats administered 4 IU PMSG on Day 1

Treatment	No. of rats in proestrus and estrus	Mating rate	
		%	No. of rats
PGT	171	75.0	128
RPGT 6h	0	0	0
RPGT 12h	239	56.4	135
RPGT 24h	276	57.8	159
4 IU PMSG	120	80.2	96
Total No. of rats	806	—	518

PGT: Pituitary gland transplantation; RPGT: Removal of the pituitary gland transplanted; PMSG: Pregnant mare serum gonadotropin.

## 2. 배란과 착상율

임신 8일 (Day 8)째 1400~1500h에 착상수와 황체수를 측정 한 결과 Table 3에서와 같은 결과를 얻었다.

PGT군에서는 47.1±4.9개의 황체를 관찰할 수 있어 확실한 과배란 사실을 확인할 수 있었으나 나머지 처치군 (RPGT 12h군, RPGT 24h군 및 PMSG군)에서는 각각 14.1±0.3, 18.1±0.5 그리고

8.9±0.3개의 황체를 관찰할 수 있어 PGT군에 비해 확실한 과배란 효과를 관찰할 수 없었다 ( $P < 0.05$ ). PMSG군에 비해 RPGT 12h군, RPGT 24h군 그리고 PGT군의 순서로 각각에 대해 유의성 있게 현저히 증가하였다 ( $P < 0.05$ ).

착상수에 있어서는 PGT군, RPGT 12h군, RPGT 24h군 및 PMSG군에서 각각 18.1±4.0, 10.8±0.2, 9.8±0.2 및 8.5±2.5개를 나타내었다. 대조군 (PMSG군)에 비해 PGT군만이 유의성 있게 증가하였다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 RPGT 12h군과 RPGT 24h군의 경우는 대조군에 비해 모두 유의성을 관찰할 수 없었다 ( $P < 0.05$ ).

착상율에 관해서는 Table 3에서와 같이 PMSG군에 비해 각각의 처치군은 RPGT 12h군, RPGT 24h군, PGT군의 순서로 유의성 있게 감소하였으며 ( $P < 0.05$ ), RPGT 12h군이 그중에서 가장 높은 착상율을 나타내었다.

## 3. 난소무게 및 자궁무게

임신 8일 (Day 8)째에 자궁무게를 측정했던 바 Table 4와 같이 PGT군 (660.7±7.8)의 경우 PMSG군 (672.4±4.7)에 비해 별 차이가 없었으며, RPGT 12h군 (403.0±1.1)과 RPGT 24h군 (490.1±0.9)도 서로 유의성을 나타내지 않았다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 대조군 (672.4±4.7)과 RPGT 12h군 (403.0±1.1)의 경우는 현저한 차이를 보였다.

또한 임신 8일 (Day 8)째의 난소무게는 PMSG군 (30.4±7.4)에 비해 PGT군 (95.2±14.3), RPGT 12h군 (51.7±0.6) 및 RPGT 24h군 (57.9±0.9)은 모

**Table 3.** Effects on the Implantation Rate of the Transplantation of a Pituitary Gland and the Removal of the Gland at 12h and 24h after the Transplantation, and the Administration of 4 IU PMSG on Day 8

Treatment	No. of rats used	No. of CL (mean±SE)	No. of IM sites (mean±SE)	IM rates (%) (No. of IM/No. of CL)
PGT	50	47.1±4.9 <sup>a</sup>	18.1±4.0 <sup>a</sup>	38.4
RPGT 12h	53	14.1±0.3 <sup>b</sup>	10.8±0.2 <sup>b</sup>	76.9
RPGT 24h	55	18.1±0.5 <sup>c</sup>	9.8±0.2 <sup>b</sup>	54.1
4 IU PMSG	35	8.9±0.3 <sup>d</sup>	8.5±2.5 <sup>b</sup>	95.5
Total No. of rats	193	—	—	—

PGT: Pituitary gland transplantation; RPGT: Removal of a pituitary gland transplanted; PMSG: Pregnant mare serum gonadotropin; CL: Corpora lutea; IM: Implantation.

a, b, c, d The different superscript means significant difference from each other ( $P < 0.05$ ).

**Table 4.** Effects on Uterine and Ovarian Weight of the Transplantation of a Pituitary Gland and the Removal of the Gland at 12h and 24h after Transplantation and the Administration of 4 IU PMSG on Day 8

Treatment	No. of rats used	Ovarian weight (mg/100g BW) (mean ± SE)	Uterine weight (mg/100g BW) (mean ± SE)
PGT	51	95.2 ± 14.3 <sup>a</sup>	660.7 ± 7.8 <sup>a</sup>
RPGT 12h	52	51.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	403.0 ± 1.1 <sup>b</sup>
RPGT 24h	56	57.9 ± 0.9 <sup>b</sup>	490.1 ± 0.9 <sup>a</sup>
4 IU PMSG	32	30.4 ± 7.4 <sup>c</sup>	672.4 ± 4.7 <sup>b</sup>
Total No. of rats	191	—	—

PGT: Pituitary gland transplantation; RPGT: Removal of a pituitary gland transplanted; PMSG: Pregnant mare serum gonadotropin.

a, b, c The different superscript means significant difference from each other ( $P < 0.05$ ).

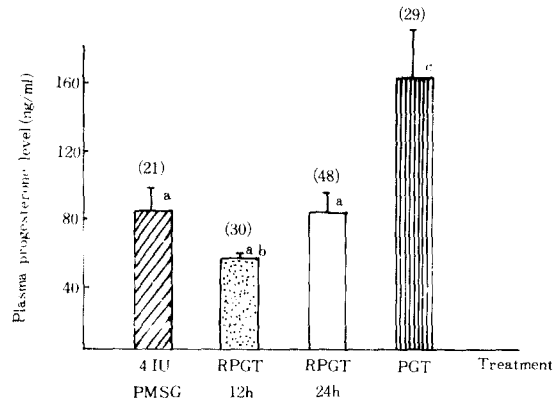
두 증가하였다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 RPGT 12h 군과 RPGT 24h 군은 차이를 나타내지 않았다 ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 혈장내 progesterone과 estradiol-17 $\beta$ 의 수준

임신 5일 (Day 5) 쯤의 1100~1300h 사이에 각 처치 동물중에서 일부를 골라 채혈하고서 혈장내 progesterone 수치를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 2와 같다.

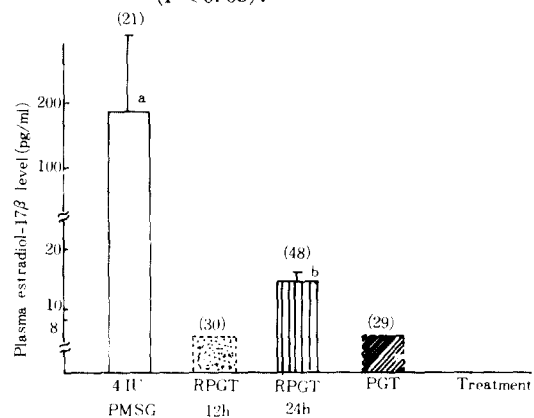
PGT 군의 혈장내 progesterone 수준은 다른 처치군에 비해 높게 나타났으며 (151ng/ml,  $P < 0.05$ ), RPTG 24h 군의 경우에는 81ng/ml로 대조군의 83ng/ml과 큰 차이가 없었다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 RPGT 12h 군에서는 progesterone 수준은 57ng/ml로 나타나 다른 처치군에 비해 상당히 낮은 수준을 나타내었다 ( $P < 0.05$ ).

Estradiol-17 $\beta$ 의 혈장내 수준은 RPGT 12h 군과 PGT 군에서는 본 실험에 사용한 estradiol-17 $\beta$ RIA kits의 감도한계인 8 pg/ml 이하로 나타나 매우 낮은 농도였다. 그러나 PMSG 군의 경우는 185 pg/ml로 나타나 높은 수준을 보였으며 RPGT 24h 군의 13 pg에 비해 뚜렷한 차이를 나타내었다 (Fig. 3,  $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Plasma progesterone levels on Day 5 of pregnancy, in the immature rats transplanted a pituitary gland (PGT) and the rats removed the gland at 12h (RPGT 12h) and 24h (RPGT 24h) after the transplantation, and the rats administered 4 IU PMSG.

Values in parenthesis are number of rats. a, b, c The different superscript means significant difference from each other ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Plasma estradiol-17 $\beta$  levels on Day 5 of pregnancy, in the immature rats transplanted a pituitary gland (PGT) and the rats removed the glands at 12h (RPGT 12h) and 24h (RPGT 24h) after the transplantation and the rats administered 4 IU PMSG. Values in parenthesis are number of rats.

a, b The different superscript means significant difference between two treatments ( $P < 0.05$ ).

## 고 찰

Dölher 등(1977)은 뇌하수체 제공동물로서 이용되는 쥐 rat에 있어서는 성숙 수컷의 뇌하수체가 성숙 암컷의 뇌하수체 보다 뇌하수체 내의 FSH수준이 현저히 높아서 그 이식 효과가 보다 확실하다고 하였다. 성숙 수컷의 뇌하수체내의 FSH 수준은 생후 10일부터 증가하기 시작하여 생후 40일령에 이르게 되면 약 300 $\mu$ g/ml 정도의 높은 수준을 유지하게 된다(Kragt와 Ganong, 1968).

Goldman 등(1971)과 Taya 등(1983)은 고환을 제거한 수컷에 있어서는 고환을 제거하지 않은 수컷의 경우에 비해 뇌하수체 내에 FSH를 비롯한 여러가지 호르몬 농도가 보다 급격히 증가하며 따라서 고환이 제거된 동물의 뇌하수체를 이식할 경우에는 뇌하수체 이식에 의한 배란 효과가 촉진된다고 하였다. 그리고 이러한 뇌하수체를 이식할 경우 혈중에 높게 증가하는 FSH, LH 및 prolactin은, 근육조직으로 가져 수술을 실시한 대조군의 경우를 감안할 때 수술과정중에 발생하는 stress에 기인한 것이 아니라 이식된 뇌하수체에서의 분비에 기인함이 확실한 것으로 알려져 있다(Advis와 Ojeda, 1979).

한편 쥐에서는 prolactin이 황체 형성촉진 작용이 있기 때문에 이식된 뇌하수체로부터 분비되는 prolactin은 이식받은 쥐의 시상하부에 작용하여 FSH와 LH의 분비와 관련된 일련의 신경 내분비학적 과정을 촉진시키는 것으로 보고되어 있다(Voogt 등, 1969). 또한 쥐에서 prolactin은 난포내의 과립막세포(granulosa cell)에 작용하여 LH수용기의 수효를 증가시켜 배란전 성선자극 호르몬의 자극에 대한 sensitivity를 높이게 되며 그 결과로서 조기 사춘기가 발현하게 되는 것으로 추측된다(Advis와 Ojeda, 1978; Advis 등, 1981). 따라서 본 실험은 Taya 등(1983)의 방법에 따라서 뇌하수체 이식을 실시했다. 즉, 생후 30일령의 수컷에서 고환을 제거하고서 뇌하수체내 gonadotropin 수준이 가장 높은 수술후 15일(45일령)에 이 수컷의 뇌하수체를 적출하여 이식에 사용하였다. 그런데 이식부위는 뇌하수체내의 gonadotropin의 흡수가 가장 잘되며 이식수술에 따른 손상이 가장 적은 것으로 알려져 있는 신장 피막 밑을 택하였다(Sameshima 등, 1982). 또한 Nequin 등(1975)은 수술에 의한 stress가 adrenal gla-

nd에서의 progesterone과 estrogen 분비를 촉진시키며, 특히 proestrus 아침이 수술에 대한 sensitivity가 높다고 보고하였으므로, 이식후 48시간째(proestrus 시기)의 뇌하수체 제거군은 본 실험에서 제외하였다.

Table 1에시와 같이 RPGT 6h군을 제외한 모든 처치군과 대조군에서 처치후 54시간만에 첫 발정을 관찰할 수 있었지만 RPGT 6h군에서는 뇌하수체 이식에 따른 첫 발정 유도 효과가 관찰되지 않았다. Advis와 Ojeda(1979)는 뇌하수체 이식을 실시하면 이식 실시 2시간 이내에 이식된 뇌하수체로부터 다량의 FSH, LH 및 prolactin이 분비되어 혈중에 높은 농도로 유지된다고 보고하였다. 그러나 위 사실로 볼때 첫 발정유도를 일으키기 위해서는 뇌하수체 이식 후 2시간 이내에 높게 증가한 혈중 gonadotropin이 4시간 이상 지속적으로 혈중에서 유지되어야만 할 것으로 생각된다.

그리고 번식능력이 있는 성숙 암컷에 PMSG만을 단독으로 투여해 주었을 경우에는 배란전 LH급증 preovulatory LH surge가 억압당해 배란이 일어나지 않지만 뇌하수체를 이식해 줄 경우에는 이러한 억압효과가 나타나지 않는다. 뇌하수체 이식의 경우에는 이러한 억압효과가 나타나지 않는다.

뇌하수체 이식의 경우에는 이식한 뇌하수체 내에도 다량의 LH가 포함되어 있으므로 HCG나 LH를 추가로 투여해 주지 않아도 배란을 유도할 수 있다(Sameshima 등, 1982). 본 실험에서도 뇌하수체 이식후 별도의 HCG의 투여가 없이도 배란효과를 관찰할 수 있었다(Table 3). 한편 Taya(1983)은 이식된 뇌하수체 전엽내의 FSH 농도가 높을수록 혈중의 혈중의 FSH 수준이 증가하므로 배란된 난의 수효도 FSH수준과 비례하여 증가하며, 혈중에 FSH 수준이 30시간이상 높게 유지되면 모든 난포에서 배란이 일어난다고 보고하였다. 본 실험에서도 이식된 뇌하수체가 체내에서 가장 오래 지속되었던 PGT군에서 47.1 $\pm$ 4.9개로 배란효과가 가장 확실하였으며 RPGT 12h군(14.1 $\pm$ 0.3개)와 RPGT 24h군(18.1 $\pm$ 0.5개)도 PMSG군에 비해 좋은 배란 효과를 나타내었다. 이로써 본 실험에서도 위에서 설명한 Taya 등(1983)의 실험결과가 확인될 수 있었다.

위와 같은 본 실험의 결과로 미루어 보아, 배란을 일으키기 위해서는 이식된 뇌하수체가 6시간

이상 이식되어 있어야 하고, 과배란 효과를 나타내기 위해서는 이식된 뇌하수체가 12시간 이상 이식 동물체내에 있어야 하며 그리고 이식시간이 연장될수록 과배란 효과가 확실해짐이 분명하다. 또한 본 실험에서 PTG 군에 비해 RPGT 군에서 과배란 효과가 낮은 것은 RPGT 군의 실험과정중 제거 수술 시 받은 stress와 제거시 신장 피막 밑에 생기는 출혈이 난소에 미친 영향이 그 원인인 수도 있을 것이다.

이식후 48시간째 관찰한 교미율은 PMSG 군, P-GT 군, RPGT 12h 군 및 RPGT 24h 군의 순서로 감소하였다. 이렇게 교미율이 뇌하수체 제거 수술 시간과 합사시간과의 간격이 짧을수록 더욱 감소하는 것으로 보아 반복되는 수술 stress가 그 한 요인으로 작용하는 것으로 추측된다.

자궁의 무게는 뇌하수체를 이식하거나 4 IU PMSG를 처치한 군에서 처치후 48시간까지는 혈중에 높게 유지되는 estradiol-17 $\beta$ 의 영향 때문에 급격히 증가하며 (Miller와 Armstrong, 1981; Walton와 Armstrong, 1981), 이렇게 높게 유지되는 estradiol-17 $\beta$ 는 이식된 뇌하수체로부터 분비되는 FSH에 의해 과다하게 발육하게 된 난포에서 분비되는 것으로 알려져 있다 (Sameshima 등, 1982). 그리고 뇌하수체에서 분비되던 FSH의 농도가 줄기 시작하는 임신 1일 이후 estradiol-17 $\beta$ 의 수준이 감소하는 것과 비례하여 자궁의 무게도 급격히 감소한다는 것이 관찰된 바 있다 (Yang 등, 1985). 본 실험에서도 처치군이 대조군에 비해 임신 5일째 혈중 estradiol-17 $\beta$  수준이 현저히 낮은 것과 관련되어 자궁무게도 대조군에 비해 낮았다. 그러나 임신 5일째에 있어서 RPGT 24h 군의 혈중 estradiol-17 $\beta$  수준이 다른 처치군에 비해 높게 증가하는 이유를 확실히 구명하기 위해서는 뇌하수체 이식후 제거시간별에 따른 혈중 성 steroid 호르몬 농도 변화에 대해 보다 많은 연구가 필요한 것으로 보인다.

본 실험에서 임신 5일째 혈장내 progesterone 수준이 대조군에 비해 PGT 군에서 현저히 높게 나타났다. 이러한 현상은 PGT 군이 가장 현저한 과배란을 일으켰으며 그 결과 난소에 과다하게 형성된 황체 때문인 것으로 생각된다. 위 현상은 Miller와 Armstrong(1981a)이 4, 8, 16 IU의 PMSG를 투여한 경우 배란 정도와 혈장내 progesterone 수준은 비례한다는 보고에 의해서 더욱 확실하게 이해

할 수 있다. 그러나 이식한 뇌하수체를 제거한 군에서는 배란 정도가 대조군에 비해 높게 나타났음에도 불구하고 혈장내 progesterone 수준은 낮았다. 이 현상에 대한 정확한 이유는 본 실험의 결과만으로는 명백하게 설명할 수 없으나 이식된 뇌하수체를 제거한 군에서는 황체 형성의 불완전, 반복되는 수술 stress 등으로 인해 황체기능을 적절히 유지할 수 없었기 때문인 것으로 추측된다.

임신 8일째의 착상율은 PMSG 군(95.5%)에 비해 모든 처치군에서 낮게 나타났다. 그러나 쥐 한 마리당 착상된 숫자는 PMSG 군(8.5개)에 비해 모든 처치군에서 다같이 높게 나타났다. RPGT 24h 군이 RPGT 12군에 비해 착상수가 적은 것은 혈중 estradiol-17 $\beta$  수준이 높았기 때문인 것으로 생각된다 (Fig. 3). Walton과 Armstrong(1982)은 PMSG 과량 투여시에는 임신 초기에 다량의 estrogen이 분비됨으로써 자궁의 운동성이 증가하여 이로 말미암아 초기에 난이 소실되거나 자궁내 환경이 갖추어지기 전에 난이 자궁에 노출되기 때문에 착상이 실패한다고 하였다. 그리고 임신 0일에서 2일 사이의 estrogen의 높은 농도는 초기태아에 유해한 영향을 미친다고 한다 (Miller와 Armstrong, 1981b). 따라서 본 실험에서의 착상율 저하도 PMSG 과량 투여시와 같이 과배란이 확실한 개체일수록 과량의 estrogen이 임신 초기에 분비되어 초기의 수정란에 나쁜 영향을 미쳤기 때문일 것으로 생각된다. 그리고 Surani(1975)와 Aitken(1977) 등이 보고한 바에 따르면 초기 태아의 또 다른 착상 실패원인은 자궁 내액의 단백질 함량 감소와 단백질 구조변화에 기인하는 대사장애라고 하였다. 따라서 본 실험의 경우에 있어서도 미성숙 모체에 과배란이 유도되었더라도 실질적으로 모체측의 영양조달 능력이 한계에도달하여 태아 수용능력에 제한을 받을 것이므로 더 이상의 착상율은 기대하기 어려울 것으로 생각된다. 이러한 미성숙 모체측 수용능력의 한계에 의해 영양이 결핍된 난은 과배란은 잘 이루어 졌어도 자궁경을 통해 제거되는 것으로 보고되어 있다 (Greenwald, 1961, 1967; Doyle 등, 1963; Bennett, 1970; Dukelow와 Riegler, 1974).

그러므로 이렇게 뇌하수체 이식을 통해 과배란된 난은 난 자체의 문제보다는 모체측 수용성의 한계에 의해 착상율이 저하되는 것으로 생각된다. 따라서 뇌하수체 이식을 통해 과배란된 이들 난을 착상



이전의 단계에서 조기 회수하여 수정란 이식법으로 정상적인 모체 자궁에 이식하면 착상 유도 및 정상적인 태자 성장을 유도할 수 있을 것으로 여겨진다. 또 뇌하수체 이식에 의해 과배란된 난과 PMSG에 의해 과배란된 난의 수정란 이식에 대한 성적을 비교해 보는 것도 흥미로운 것으로 생각된다.

## 결 론

본 실험은 뇌하수체 이식에 의한 과배란의 유도 기전 및 이에 따른 초기 난의 소실과 착상 실패에 대한 원인을 밝히고자 실시하였다. 이러한 목적을 위해 고환을 제거한 수컷로부터 얻은 뇌하수체를 미성숙 암쥐에 이식한 군(PGT군), 이식한 뇌하수체를 이식후 RPGT 6h군 12시간(RPGT 12h군) 및 24시간(RPGT 24h군)에 다시 제거한 군 그리고 4 IU PMSG를 부여한 대조군(PMSG군)을 설정했다. 그리고서 이들 5개군에 관해 이식후 2일부터 임신 8일 사이에서의 발정주기, 교미율, 혈장내 progesterone 및 estradiol-17 $\beta$ 의 수준변화, 황체수, 자궁과 난소의 변화, 착상율 등을 비교 관찰하였다. 이 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌하수체 이식후 2일째에 PMSG군, PGT군, RPGT 6h군, RPGT 12h군 및 RPGT 24h군에서 발정전기와 발정기를 나타내는 율은 각각 93.0%, 82.6%, 0%, 90.7%, 89.5%로서 모든 군에서 발정동기화가 이루어졌다.

2. PMSG군, PGT군, RT 6h군, RPGT 12h군 및 RPGT 24h군에서 교미율은 각각 80.2%, 75.0%, 0%, 56.4% 및 57.8%였다.

3. 임신 8일째에 황체수는 PMSG군, PGT군, RPGT 12h군 및 RPGT 24h군에서 각각  $8.9 \pm 0.3$ ,  $47.1 \pm 4.9$ ,  $14.1 \pm 0.3$ ,  $18.1 \pm 0.5$ 였으며 이들 처치군 사이에는 유의차가 있었다( $P < 0.05$ ).

4. 임신 8일에 착상수는 PGT군에서는  $18.1 \pm 4.0$ 으로 나타났다. 이 착상수치는 PMSG군( $8.5 \pm 2.5$ ), RPGT 12h군( $9.8 \pm 0.2$ ), RPGT 24h군( $10.8 \pm 0.2$ )에 비해 높았다( $P < 0.05$ ).

5. 임신 8일에 있어서의 체중 100g당 난소무게는 PGT군이  $95.2 \pm 14.3$ mg, RPGT 12h군이  $51.7 \pm 0.6$ mg, 그리고 RPGT 24h군이  $57.9 \pm 0.9$ mg이었다. 이들 난소무게는 PMSG군의  $30.4 \pm 7.4$ mg에 비해 유의하게 높았다( $P < 0.05$ ).

6. 임신 8일에 있어서의 체중 100g당 자궁무게는 PMSG군( $672.4 \pm 4.7$ mg)과 PGT군( $660.7 \pm 7.8$ mg)의 경우가 RPGT 12h군( $403.0 \pm 1.1$ mg)과 RPGT 24h군( $490.1 \pm 0.9$ mg)의 경우보다 높았다( $P < 0.05$ ).

7. 임신 5일째의 혈장내 progesterone 수준은 PMSG군(83 ng/ml), RPGT 12h군(57 ng/ml) 및 RPGT 24h군(82 ng/ml)의 경우에 비해 PGT군(151 ng/ml)의 경우가 현저히 높았다( $P < 0.05$ ).

8. 임신 5일째에 혈장내 estradiol-17 $\beta$  수준은 RPGT 24h군의 13 pg/ml에 비해 PMSG군에서는 185 pg/ml로 현저히 높았으나( $P < 0.05$ ), PGT군과 RPGT 12h군에서는 그 수준이 8 pg/ml 이하로 너무 낮았다.

## 참 고 문 헌

1. Advis, J.P. and Ojeda, S.R. (1978). Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rat: Ovarian site of action. *Endocrinol.*, 103: 924-935.
2. Advis, J.P. and Ojeda, S.R. (1979). Acute and delayed effects of anterior pituitary transplants in inducing precocious puberty in the female rat. *Biol. Reprod.*, 20: 879-887.
3. Aitken, R.J. (1977). Changes in the protein content of mouse uterine flushing during normal pregnancy and delayed implantation and after ovariectomy and estradiol administration. *J. Reprod. Fert.*, 50: 29-36.
4. Allen, J. and McLaren, A. (1971). Cleavage of mouse eggs from induced and spontaneous ovulation. *J. Reprod. Fert.*, 27: 137-140.
5. Bennett, J.P. (1970). The effect of drugs on egg transport. *Adv. Biosci.*, 4: 191-197.
6. Bennett, D.R., Powell, J.G. and Cochrane, R.L. (1980). Maintenance of unimplanted fertilized ova in spayed rats: II. effects of progesterone therapy and the duration of the delay in implantation. *Biol. Reprod.*, 22: 500-506.
7. Betteridge, K.J. (1977). Superovulation, In: *Embryo Transfer in farm Animals* K.J. Betteridge, ed. Agriculture Canada Monograph, 16: 1-9.

8. De La Lastra, M., Forcelledo, M.L. and Serrano, C. (1972). Influence of the hypophysis on pregnant mare's serum gonadotrophin-induced ovulation in immature rats. *J. Reprod. Fert.*, 31:23-28.
9. Doyle, L.L., Gates, A.H. and Noyes, R.W. (1963). Asynchronous transfer of mouse ova. *Fertil. Steril.*, 14:215-225.
10. Dolher, K.D., von zur Muhlen, A. and Dohler, U. (1977). Pituitary luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and prolactin from birth to puberty in female and male rats. *Acta Endocrinol.*, 85:718-728.
11. Dukelow, W.R. and Riegler, G.D. (1974). Transport of gametes and survival of the ovum as function of the oviducts. In *Oviducts and Its Functions*. Eds. Johnson, A.D. and Foley, C.W., Academic Press, New York, pp. 193-220.
12. Evans, G. and Armstrong, D.T. (1984). Reduction in fertilization rate *in vitro* of oocytes from immature rats induced to superovulate. *J. Reprod. Fert.*, 70:131-135.
13. Fujimoto, S., Pahlavan, N. and Dukelow, W.R. (1974). Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J. Reprod. Fert.*, 40:170-180.
14. Greenwald, G.S. (1961). The anti-fertility effects in pregnant rats of a single injection of estradiol cyclopentylpropionate. *Endocrinol.*, 69:1068-1073.
15. Greenwald, G.S. (1967). Species differences in egg transport in response to exogenous estrogen. *Anat. Rec.*, 157:163-172.
16. Goldman, B.D., Grazia, Y.R., Kamberi, I.A. and Porter, J.C. (1971). Serum gonadotropin concentrations in intact and castrated neonatal rats. *Endocrinol.*, 88:771-776.
17. Kostyk, S.K., Dropcho, E.J., Moltz, H. and Swartwout, J.R. (1978). Ovulation in immature rats in relation to the time and dose of injected human chorionic gonadotropin or pregnant mare serum gonadotropin. *Biol. Reprod.*, 19:1102-1107.
18. Kragt, C.L. and Ganong, W.F. (1968). Pituitary FSH content in male rats at various ages. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128:965-967.
19. Lopata, A., Brown, J.B., Leeton, J.F., McTalbot, J. and Wood, C. (1978). *in vitro* fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.*, 30:27-35.
20. Maudlin, I. and Fraser, L.R. (1977). The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 50:275-280.
21. Miller, B.G. and Armstrong, D.T. (1981a). Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. *Biol. Reprod.*, 25:253-260.
22. Miller, B.G. and Armstrong, D.T. (1981b). Effects of superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. *Biol. Reprod.*, 25:261-271.
23. Miller, B.G. and Armstrong, D.T. (1982). Infertility in superovulated immature rats: Role of ovarian steroid hypersecretion. *Biol. Reprod.*, 26:861-868.
24. Nequin, L.G., Alvarez, J.A. and Campbell, C.S. (1975). Alteration in steroid and gonadotropin release resulting from surgical stress during the morning of proestrus in 5-day cycle rats. *Endocrinol.*, 97:718-724.
25. Sameshima, H., Taya, K., Sasamoto, S. and Etoh, T. (1982). Superovulation induced by a single pituitary gland transplanted beneath the kidney capsule in adult rats. *J. Endocrinol.*, 94:339-345.
26. Seki, K., Seki, M., Maeda, H. and Yoshihara, T. (1972). Serum and pituitary levels of FSH, LH and prolactin in maturing female rats. *Acta obst. et Gynaec. Jap.*, 19:252-256.
27. Steptoe, P.C. and Edwards, R.G. (1976). Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet.*, 1:880-882.
28. Surani, M.A.H. (1975). Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implications for implanta-

- tion and embryonic diapause. *J. Reprod. Fert.*, 43:411-417.
29. Taya, K., Mizokawa, T., Matsui, T. and Sasamoto, S. (1983). Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J. Reprod. Fert.*, 69:265-270.
  30. Voogt, J.L., Clemens, J.A. and Meites, J. (1969). Stimulation of pituitary FSH release in immature female rats by prolactin implants in median eminence. *Neuroendocrinol.*, 4:157-163.
  31. Walton, E.A. and Armstrong, D.T. (1981). Ovarian function and early embryo development in immature rats given a superovulatory dose of PMSG, later neutralized by antiserum. *Biol. Reprod.*, 25:272-280.
  32. Welschen, R. and Rutte, M. (1971). Ovulation in adult rats after treatment with pregnant mare serum gonadotrophin during oestrus. *Acta Endocrinol.*, 68:41-49.
  33. Yang, M.P., Kim, Y.H., Yang, I.S. and Kwun, J.K. (1986). Effects of superovulation and early embryonic development by pituitary transplants. *Kor. J. Vet. Res.*, 26:39-49.
  34. Yun, Y.W. and Kwun, J.K. (1984). Studies on the possible cause of implantation failure in immature rats given high doses of pregnant mare serum gonadotropin. *Seoul Univ. J. Vet. Sci.*, 9:139-155.
  35. Zarrow, M.X. and Quinn, D.L. (1963). Superovulation in the immature rat following treatment with PMS alone and inhibition of PMS induced ovulation. *J. Endocrinol.*, 26:183-188.