

性腺刺戟 Hormone 水準이 Golden Hamster의 過排卵 및 受精에 미치는 影響

禹濟碩 · 李揆丞 · 徐吉雄 · 朴昌植
忠南大學校 農科大學

Effects of Superovulation and Fertilization on Gonadotrophic Hormone Levels in the Golden Hamster

Woo, J.S., K.S. Lee, K.W. Seo and C.S. Park
College of Agriculture, Chungnam National University

Summary

This study was carried out to investigate the effects of PMSG and/or HCG treatment on superovulation and fertilization in the golden hamster. The results obtained were summarized as follows:

1. The female groups treated with 30 IU PMSG or 30 IU PMSG + 25 IU HCG ovulated more eggs than those treated with 15 IU PMSG or 15 IU PMSG + 25 IU HCG ($P < .01$). All the PMSG treatment groups superovulated as compared with the untreated control group ($P < .01$). There were no differences on fertilization rate between the superovulated groups and the control group.
2. The fertilized ova were obtained only by the female group treated with 30 IU PMSG at 1000 hr on day 1 (morning of ovulation) of the estrous cycle.
3. The intervals between PMSG and HCG injection necessary to obtain the consistent superovulation and fertilized ova were 66hr and 72hr.
4. The superovulated ova were collected from oviduct 48hr, oviduct and uterus 72hr, and uterus 96 hr after mating. 80.3% of two cell, 75.8% of eight cell, and 73.7% of blastocyst of the ovulated ova occurred 48 hr, 72hr, and 96hr after mating, respectively.

I. 緒 論

오늘날 顯微的 操作을 통한 發生工學的 研究들이 進行되면서 家畜들의 卵子 및 精子에 關한 研究가 活潑해지고 있다. 特히 体外受精, 卵子培養, 受精卵 移植 그리고 遺傳子操作 等の 研究들을 통하여 受精 現象을 究明하고 나아가서는 家畜의 遺傳的 改良을 圖謀하려 하고 있다. 以上の 研究들은 많은 卵子들을 必要로 하기 때문에 經濟動物인 家畜들을 利用 하기 보다는 經濟的 負擔이 적은 實驗動物을 많이

利用하고 있다. 그러나 實驗動物을 利用하는 경우 에도 더 많은 排卵된 卵子를 얻기 위하여 過排卵誘 起를 實施하고 있다. 現在 많이 利用하는 實驗動物 로는 mouse, rat, golden hamster 等인 바, golden hamster에 關한 研究로는 過排卵誘起에 關한 Greenwald(1962)의 報告, 發情週期中 過排卵誘起에 PMSG를 利用한 Greenwald(1973)의 報告, 卵胞發達과 排卵에 미치는 FSH와LH의 役割에 關한 Greenwald(1974)의 報告, 胎兒發達과 hormone 水準에 따른 過排卵效果에 關한 Greenwald(1976)의 報告, 發情

週期中 PMSG를 處理할 경우 卵巢反應에 미치는 季節的 變化에 關한 Moore와 Greenwald(1974)의 報告, 着床前 胚兒의 移植에 關한 Sato와 Yanagimachi(1972)의 報告, 室驗室이나 生体内에서 受精된 卵子的 發達에 關한 Whittingham과 Bavister(1974)의 報告, 過排卵과 過姓娠에 關한 Fleming과 Yanagimachi(1980)의 報告, 過排卵處理時 排卵時間과 卵子的 分割에 關한 橋詰等(1975)의 報告, 過排卵處理가 卵子移動과 分割에 미치는 影響에 關한 鈴木과 石島(1976)의 報告 등이 있었다.

지금까지 살펴본 研究들은 golden hamster에 대한 過排卵 및 受精에 미치는 影響을 斷片的으로 報告하고 있는바, 本 研究는 golden hamster의 發情週期에 따른 PMSG와 HCG의 處理間隔이나 處理水準이 過排卵 및 受精에 미치는 影響을 綜合的으로 檢討하여 顯微的 操作을 통한 發生工學的 研究의 基礎資料를 提供하고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗動物 및 飼育方法

本 實驗에 使用된 實驗動物은 忠南大學校 農科大學 畜産學科 家畜繁殖學教室에서 保有하고 있는 golden hamster(*Mesocricetus auratus*)로써, 암컷은 生後 3~4個月令, 수컷은 生後 4~6個月令의 것들을 使用하였다. 암컷은 性成熟 以後 發情週期4日의 것들을 各各 個體飼育하였고, 수컷은 한 케이지에 交尾 經驗이 있는 것들을 두마리씩 飼育하였다.

飼養管理는 NRC飼養標準에 맞추어 配合된 pellet 飼料를 自由給餌시켰으며, 물은 수도물을 그대로 自由給水 시켰다. 또한, 飼育室의 溫度는 23~25°C, 濕度는 50~55%, 日照時間은 14時間으로 調整하였다.

2. 發情調査 및 過排卵 誘起

發情調査는 Table 1에 나타난 바와 같이 發情前期, 發情期, 發情後期, 發情休止期로 나누어 實施하였으며, 發情週期가 4日인 것만을 本 實驗에 使用하였다. 排卵日의 午前 10時를 Day 1, 排卵當日 아침으로 하여 24時間 間隔으로 Day 2, Day 3, 그리고 Day 4로 區分하였다.

過排卵誘起는 實驗 1에서는 30IU PMSG+25IU HCG 그리고 對照群의 5群으로 나누어 實施하였는데, PMSG(Chorulon, Intervet, Holland)는 Day 1 午前 10時에 筋肉注射하였고, HCG(Folligon, Intervet Holland)는 Day 4 午後 2時에 筋肉注射하였으며, HCG注射當日 午後 7時에 交尾시켰다. 그리고 HCG注射後 72時間 지나서 子宮과 卵管에서 採卵 하였다.

實驗 2에서는 Day 1, Day 2, Day 3 그리고 Day 4에 各各 30IU PMSG를 午前 10時에 注射하였고, PMSG注射後 72時間 지나서 HCG를 各各 注射하였으며, HCG注射當日 午後 7時에 交尾시켰다. 그리고 HCG注射後 72時間 지나서 採卵하였다.

實驗 3에서는 30IU PMSG를 Day 1 午前 10時에 注射하였고, PMSG注射後 48, 54, 66 그리고 72時間 間隔으로 나누어 25IU HCG를 注射後 48時間 지나서 採卵하였다.

Table 1. Examination of estrous cycle

Stage of estrous cycle	Appearance of the vagina
Proestrus	Vagina is gaping; tissues are reddish pink and moist; vaginal discharge is slightly harden and light-yellow color.
Estrus	Vagina signs are similar to proestrus, but the tissues are lighter pink and less moist, and vaginal discharge is semitranslucent and nonmucus.
Metestrus	Vagina is pale; vaginal discharge is non-mucus and yellow color.
Diestrus	Vagina has small open and is dry. A small and hardened yellow mucus lies deep in vagina, and a pronounced yeasty odor from the genital area.

實驗 4 에서는 Day 1 에 30IU PMSG를 午前 10時 에 注射하였고, Day 4 午後 7 時에 交尾시켰으며, 交尾後 48, 72 그리고 96時間에 採卵하였다.

3. 交尾方法 및 排卵된 卵자의 回收

交尾는 모든 實驗에서 午後 7 時에 雌雄을 1:2로

Table 2. Composition of flushing medium TALP-Hepes^a

Component	mM	mg/100ml
NaCl	114.0	665.8
KCl	3.2	23.9
CaCl ₂	2.0	22.2
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5	10.2
NaHCO ₃	2.0	16.8
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.4	5.6
Glucose	5.0	90.0
Sodium lactate(60% Syrup)	10.0	0.17 ml
Sodium pyruvate ^b	0.1	1.1
Hepes		240.0
Phenol red		1.0
Bovine serum albumin ^b		3.0/ml
Sodium penicillin-G		10,000units/100ml

^apH of basic medium (all components except pyruvate and BSA) titrated to 7.4 with 1N NaOH. Medium was then made up to 100ml with distilled water.

^b Added from stock solution prepared fresh immediately before experiment.

수송시켜 實施하였으며, 排卵된 卵자의 回收는 Table 2 와 같은 TALP-Hepes 灌流液으로 子宮과 卵管에서 採卵하였다. 이때의 灌流液은 pH 6.9, 滲透壓 300mOsmol로 調整하였으며, 使用直前に 0.2 μm 의 millipore filter로 濾過시켜 細菌을 除去하였다. 排卵된 卵자와 回收된 卵자의 數 및 發達過程은 實體顯微鏡 (20×, 40×) 과 位相差顯微鏡 (100×, 250×, 450×)하에서 調査되었다.

III. 結果 및 考察

1. PMSG와 HCG의 處理水準이 過排卵과 受精에 미치는 影響

實驗 1 의 結果는 Table 3 에 나타난 바와 같다. 排卵된 卵子數는 30IU PMSG 單獨處理群이나 30IU PMSG+25IU HCG 處理群이 各各 36.8個, 35.4個로 15IU PMSG 單獨處理群이나 15IU PMSG+25IU HCG 處理群보다 많았으며 (P<.01), 모든 過排卵處理群들은 無處理對照群의 12.0個에 比하여 有意하게 많은 (P<.01) 卵子를 排卵하였다.

受精된 卵子の 數는 30IU PMSG 單獨處理群이나 30IU PMSG+25IU HCG 處理群이 各 30.6個 29.3個로 15IU PMSG 單獨處理群이나 15IU PMSG+25IU HCG 處理群보다 많았으며 (P<.01), 모든 過排卵處理群들은 無處理對照群의 10.5個에 比하여 有意하게 많은 (P<.01) 卵子가 受精되었다. 그러나 排卵

Table 3. Superovulation and fertilization following PMSG and HCG treatments(experiment 1).

Animal group	Hormones given ^a	Number of females treated	Number of females mated ^b	Average number of ova per hamster ovulated (A)	Average number of fertilized ova per hamster (B)	B/A,%
1	30IU PMSG only	10	10	Mean±S.E. 36.8±2.75 ^e	Mean±S.E. 30.6±2.07 ^e	83.1
2	30IU PMSG +25IU HCG	10	10	35.4±2.24 ^e	29.3±2.84 ^e	82.8
3	15IU PMSG only	10	10	26.5±2.35 ^d	22.4±2.03 ^d	82.5
4	15IU PMSG +25IU HCG	10	10	27.7±2.97 ^d	22.8±2.13 ^d	82.3
Control	none	10	10	12.0±1.50 ^c	10.5±1.61 ^c	87.5

^aPMSG was given at 1000 hr of Day 1 (morning of ovulation) and HCG at 1400hr of Day 4 (estrus).

^bFemales were allowed to mate overnight starting at 1900hr of Day 4.

^{c,e}Means in the same column that do not have a common superscript differ (p<.01).

Table 4. Induction of superovulation and fertilization following injection of PMSG(30IU) on various days of the estrous cycle (experiment 2)^a

Time of PMSG injection	Number of females treated	Number of females ovulated	Number of ova per ovulated hamster	Average number of fertilized ova per hamster
Day 1 1000hr	10	10	37.6±2.16 ^b	31.0±2.74 ^b
Day 2 1000hr	10	10	35.4±2.18	unfertilized
Day 3 1000hr	10	10	36.3±2.41	unfertilized
Day 4 1000hr	10	10	35.6±2.74	unfertilized

^aHCG (25IU) was given 72hr after PMSG administration.

Ova were collected from oviducts and uteri 72hr after HCG injection.

^bMean ± s. e.

된 卵子數에 대한 受精된 卵子數의 比率은 모든 處理群들 사이에 有意性을 認定할 수 없었다.

以上の 結果는 Day 1에 30IU PMSG를 注射할 경우 排卵數가 40~50個 라는 Greenwald(1974, 1976)의 報告보다는 약간 적었으며, 排卵된 卵子의 受精率이 90%라는 Greenwald(1976)의 報告보다는 약간 낮았다.

2. 發情週期가 過排卵 및 受精에 미치는 影響

實驗 2의 結果는 Table 4에 나타난 바와 같다. 發情週期 Day 1, Day 2, Day 3 그리고 days 4에 過排卵誘起時 各各 排卵된 卵子數는 35.4~37.6個의 範圍로써 排卵數에 있어서는 큰 差異를 認定할 수 없었다. 그러나 Day 1에 過排卵誘起時에만 受精된 卵子를 回收할 수 있었다. 以上の 結果는 排卵된 卵

앞으로 좀 더 綜合的으로 檢討되어야 할 것으로 思料된다.

3. PMSG와 HCG의 處理間隔이 過排卵과 受精에 미치는 影響

實驗 3의 結果는 Table 5에 나타난 바와 같다. 30 IU PMSG注射와 25IU HCG注射의 間隔을 48時間, 54時間, 66時間 그리고 72時間으로 하여, 過排卵과 受精을 誘起할 경우 處理間隔에 따른 過排卵된 卵子數의 差異는 認定할 수 없었다. 그리고 過排卵된 卵子中 受精된 卵子의 回收는 處理間隔이 66時間, 72時間인 경우에만 可能하였다.

以上の 結果中 過排卵誘起는 PMSG注射와 HCG注射의 間隔이 44時間 以上이어야 한다는 Fleming과 Yanagimachi(1980)의 報告와 잘 一致하였다.

Table 5. Interval between PMSG and HCG injections necessary for induction of superovulation and fertilization (experiment 3)^a

Time interval(hr) between PMSG and HCG injections	Number of females treated	Number of females ovulated	Average number of ova per hamster	Average number of fertilized ova per hamster
48	10	10	33.6±1.94 ^b	unfertilized
54	10	10	33.5±1.93	unfertilized
66	10	10	34.2±2.11	26.4±2.79 ^b
72	10	10	36.0±2.35	29.7±3.51

子의 數에 있어서 Greenwald(1974, 1976)의 報告나 Fleming과 Yanagimachi(1980)의 報告보다 약간 적었으며, Day 2, Day 3, 그리고 Day 4에 過排卵誘起時 受精된 卵子를 回收할 수 없는 機轉에 대하여는

4. 過排卵된 卵子의 移動과 分割

實驗 4의 結果는 Table 6에 나타난 바와 같다. 交尾后 48時間 經過后 排卵된 卵子는 處理된 암컷 10頭에서 345個였으며, 採卵場所는 卵管으로써 排卵

Table 6. Cell stages of ovulated ova in superovulated hamster treated with 30IU PMSG(experiment 4)^a

Time after mating ^b	Number of females treated	Total number of ovulated ova	Collection site	Cell stage				
				2	4~7	8	Morula Blastocyst	Unfertilized ova
48	10	345	Oviduct	277	10			58
72	10	297	Oviduct, Uterus		5	225	17	50
96	10	224	Uterus			4	10	165

^aPMSG was given at 1000hr of Day 1.

^bFemales were allowed to mate overnight starting at 1900hr of Day 4.

된 卵子中 2細胞期の 受精卵은 277個로 全体 排卵된 卵子數의 80.3%였다. 交尾后 72時間 經過后 排卵된 卵子는 處理된 암컷 10頭에서 297個였으며, 採卵場所는 卵管和 子宮이었으며, 排卵된 卵子中 8細胞期の 受精卵은 225個로써 全体 排卵된 卵子數의 75.8%였다. 交尾后 96時間 經過后 排卵된 卵子는 處理된 암컷 10頭에서 224個였으며, 採卵場所는 子宮으로써 排卵된 卵子中 胚盤胞는 165個로 全体 排卵된 卵子數의 73.7%였다.

以上の 結果는 交尾后 48時間 經過后 2細胞期の 受精卵이 100%, 交尾后 72~73時間 經過后 8細胞期の 受精卵이 82.7%라는 橋詰等(1975)이나, 鈴木과 石島(1976)의 報告보다 약간 낮았다. 그 原因은 排卵된 卵子中 未受精卵의 比率이 높기 때문인 것으로 思料된다. 한편, 排卵된 卵子中 胚盤胞의 比率이 交尾后 83時間 經過后 64.7%라는 橋詰等(1975)의 報告나, 交尾后 84時間 經過后 75%라는 鈴木과 石島(1976)의 報告와는 採卵時間에 의한 差異로 本 實驗과 比較하기는 어려웠다.

IV. 摘要

本 研究는 golden hamster에서 PMSG나 HCG의 處理가 過排卵 및 受精에 미치는 影響을 調査하기 위하여 實施한 바, 그 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 30IU PMSG單獨處理群과 30IU PMSG+25IU HCG處理群은 15IU PMSG單獨處理群과 15IU PMSG+25IU HCG處理群 보다 排卵된 卵子數가 많았으며 ($P < .01$), 모든 過排卵處理群 들은 無處理對照群에 比하여 有意하게 ($P < .01$) 많은 卵子를

排卵하였다. 排卵된 卵子의 受精率에서는 差異를 認定할 수 없었다.

2. 發情週期中 排卵日 午前 10時(Day 1)에 PMSG를 處理한 경우에만 過排卵된 卵子中 受精된 卵子를 얻을 수 있었다.

3. 過排卵 및 受精된 卵子를 얻기 위한 PMSG와 HCG의 處理間隔은 66 및 72時間이었다.

4. 過排卵된 卵子의 交尾后 48時間에는 卵管, 72時間에는 卵管和 子宮, 그리고 96時間에는 子宮에서 採卵되었다. 受精卵의 分割段階는 交尾后 48時間에는 2細胞期(排卵된 卵子의 80.3%), 72時間에는 8細胞期(排卵된 卵子의 75.8%), 그리고 96時間에는 胚盤胞(排卵된 卵子의 73.7%)였다.

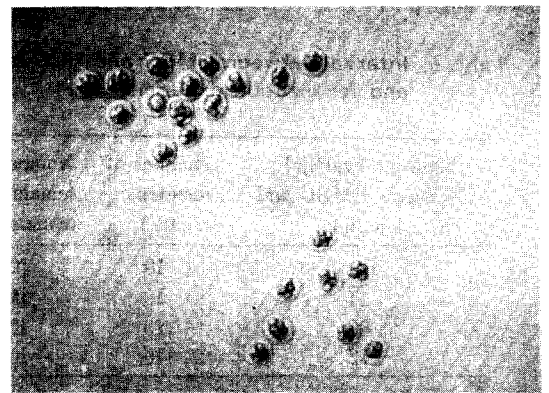


Fig. 1. Twenty-one 8-cell preimplantation embryos flushed from both oviducts and uteri on day3 of superpregnancy in a female which received 15IU PMSG on day 1 and 25 IU HCG on day 4 of the cycle (100 X).

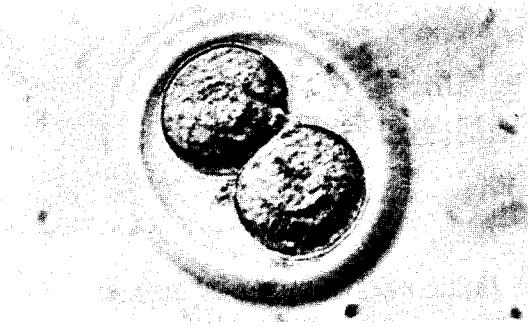


Fig. 2. Two cell embryo (450X).

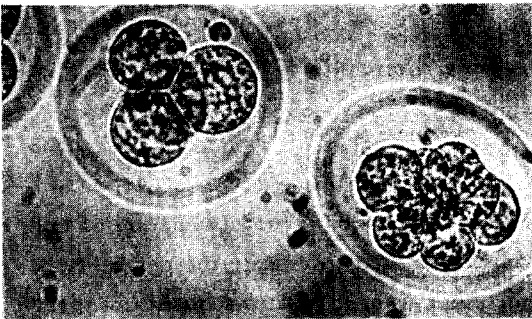


Fig. 3. Four cell and eight cell embryos (450X).

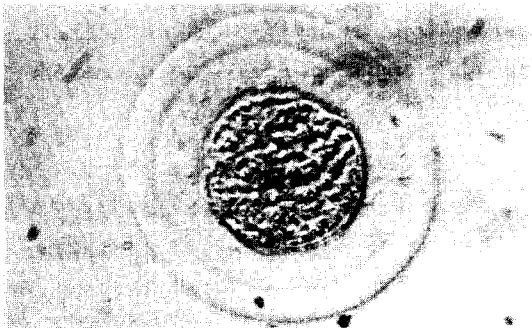


Fig. 4. Morula (450X).

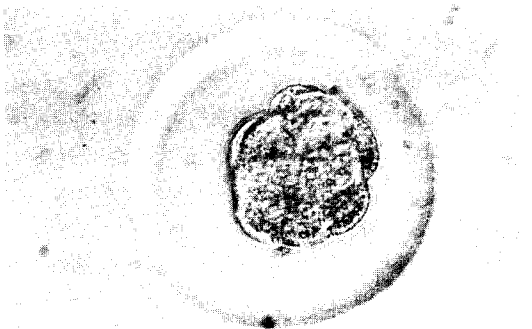


Fig. 5. Blastocyst (450X).

V. 引用文献

1. Bavister, B.D., M.L. Leibfried and G. Lieberman. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 28: 235.
2. Fleming, A.D. and R. Yanagimachi, 1980. Superovulation and superpregnancy in the golden hamster. *Develop. Growth and Differ.* 22(2):103.
3. Greenwald, G.S. 1962. Analysis of superovulation in the adult hamster. *Endocrinol.* 71:378.
4. Greenwald, G.S. 1973. Effect of an anti-PMS serum on ovulation and oestrogen secretion in the PMS treated hamster. *Biol. Reprod.* (In press).
5. Greenwald, G.S. 1974. Role of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in follicular development and ovulation. In *The Handbook of Physiology*, Section 7, Vol. IV Part 2, pp.293-324.
6. Greenwald, G.S. 1976. Effects of superovulation on fetal development and hormone levels in the pregnant hamster. *J. Reprod. Fert.* 48:313.
7. Moore, P.J. and G.S. Greenwald. 1974. Seasonal variation in ovarian responsiveness of the cycling hamster to PMSG. *J. Reprod. Fert.* 36:219.
8. Sato, A. and R. Yanagimachi. 1972. Transplantation of preimplantation hamster embryos. *J. Reprod. Fert.* 30:329.
9. Whittingham, D.G. and B.D. Bavister. 1974. Development of hamster eggs fertilized in vitro or in vivo. *J. Reprod. Fert.* 38:489.
10. 橋詰良一・石島芳郎・平林忠. 1975. 過排卵處理ハムスターの排卵時間と卵子の分割進行程度. *畜産の研究* 29 (9) : 1217.
11. 鈴木幾夫・石島芳郎. 1976. ゴールデンハムスターの卵子の移動と分割におよぼす過排卵處理の影響. *畜産の研究* 30 (6) : 785.