

호르몬 처리 (*in vitro* 실험)에 의한 농어, *Lateolabrax japonicus*의 난성숙과 배란유도

백혜자 · 김형배* · 안철민 · 명정인

국립수산진흥원, *한국해양연구소

In vitro Effects of Hormonal Treatment on Induced Maturation and Ovulation in the Sea bass, *Lateolabrax japonicus*

Hea-Ja Baek, Hyung-Bae Kim*, Cheul-Min An and Jeong-In Myeong

National Fisheries Research and Development Institute, Kijang-Gun, Pusan 619-900, Korea

*Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P. O. Box 29, Korea

The relative effectiveness of C_{21} -steroids and human chorionic gonadotropin(HCG) on maturation and ovulation was investigated *in vitro* using the isolated oocytes or ovarian fragments from the sea bass, *Lateolabrax japonicus*.

17α -hydroxy, 20β -dihydroprogesterone ($17\alpha,20\beta$ OHP : 5, 50, 500, 1000ng/ml), 17α -hydroxy, 20α -dihydroprogesterone ($17\alpha,20\alpha$ OHP : 5, 50, 500, 1000ng/ml) and HCG(5, 50, 500IU/ml) were effective in inducing oocyte maturation, GVM(germinal vesicle migration) or GVBD(germinal vesicle breakdown), compared to control except $17\alpha,20\beta$ OHP and $17\alpha,20\alpha$ OHP at 5 ng/ml. $17\alpha,20\beta$ OHP showed the greatest effect on oocyte maturation at 50ng/ml.

A combination of $17\alpha,20\beta$ OHP(50ng/ml) and HCG(50IU/ml) led to a significant increase ($p<0.05$) in GVBD when compared with $17\alpha,20\beta$ OHP or HCG alone. These findings suggest that the two in combination acts synergistically to induce GVBD.

$17\alpha,20\beta$ OHP(1~1000ng/ml) and HCG(1~500IU/ml) also induced ovulation in ovarian fragments at all concentrations used; more effective at lower concentrations(1~50ng/ml or IU/ml). It was shown that HCG was more potent in inducing ovulation than $17\alpha,20\beta$ OHP.

Key words : GVBD, Ovulation, HCG, Steroid, Sea bass

서론

고급 단백질의 수요가 증가함에 따라 양식어류 개발의 필요성이 가중되면서 유용어종을 대상으로 계획적이고 안정적인 종묘를 확보하기 위해서는 인위적으로 성숙, 배란을 유도시킬 수 있는 방법을 개발하는 것이 우선 과제이다.

어류의 성숙과 배란유도 방법으로서 사육 환경

조절과 호르몬 투여 등이 있는데, 호르몬 처리에 의한 방법은 여전히 오랜 기간 동안 잘 확립되지 않고 있다. 왜냐하면, 각각의 어종에 적합한 호르몬과 투여할 호르몬의 적정 농도 및 생식소 성숙 단계 중 어떤 시기에 투여해야하는가 등에 대한 번식 내분비적 기초 자료가 매우 부족하기 때문이다.

일반적으로 난자가 만들어지는 과정은 환경 인

본 연구의 일부는 국립수산진흥원 수산시험연구비에 의해 수행되었음.

자가 뇌에 전달되어 시상하부의 생식선자극호르몬 방출호르몬(GnRH=gonadotropin releasing hormone) 분비를 자극하면 이 호르몬이 뇌하수체에 전달되어 생식선자극호르몬(GtH=gonadotropin)을 분비하게 되고, 이것이 난소에 있는 성 스테로이드 호르몬의 생성, 분비를 촉진시킴으로써 난성숙이나 배란 결과를 초래하게 된다(Goetz, 1983; Jalabert *et al.*, 1991). 이와같은 일련의 과정에 관여하는 호르몬들의 분비 패턴은 어종에 따라 다르므로 자연상태에서의 어종 특유의 번식 호르몬 분석이 이루어져야 한다.

지금까지 밝혀진 *in vivo* 또는 *in vitro* 실험에 의하면 경골 어류의 난성숙과 배란유도에 효과적인 호르몬은 C₂₁-스테로이드 특히, progesterone의 유도체인 20 α - 또는 20 β -hydroxy group을 가지고 있는 스테로이드(17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone, 17 α -hydroxy, 20 α -dihydroprogesterone)와 이의 분비를 증가시키는 태반성 생식선자극호르몬(HCG)으로 알려져 있다. White bass(*Morone chrysops*)에서는 HCG 처리가 난모세포의 최종 성숙을 유도시켰으며(King *et al.*, 1995), Yellow perch (*Perca flavescens*)에서는 17 α 20 β OHP가 배란유도를(Berndtson *et al.*, 1989), 참돔 *Pagrus major*에서는 HCG와 17 α 20 β OHP 모두 최종 성숙을 유도시켰다(Kagawa *et al.*, 1994). Walleye(*Stizostedion vitreum*)의 경우 HCG와 17 α 20 β OHP 모두 난모세포의 최종 성숙과 배란을 유도하였다(Barry *et al.*, 1995). 가자미의 일종인 *Limanda limanda*에서는 HCG 투여에 반응하여 C₂₁-스테로이드중 17 α -hydroxy, 20 α -dihydroprogesterone(17 α 20 α OHP)의 농도가 급격히 증가함을 보고하였다(Canario and Scott, 1990).

본 연구는 현재 완전 인공 종묘생산이 어려운 농어(점이 없는 계통)를 대상으로 성숙 또는 배란유도에 널리 사용되고 있는 HCG(태반성 생식선자극호르몬)와 C₂₁-스테로이드인 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone(17 α 20 β OHP)과 17 α -hydroxy, 20 α -dihydroprogesterone (17 α 20 α

OHP)를 사용하여 농어의 난성숙 및 배란을 유도하기 위한 농도별 효능 비교 실험이 *in vitro*에서 이루어졌다.

재료 및 방법

실험어는 경남 사천만에서 채집된 자연 종묘를 한국 해양연구소 통영 가두리에서 양성시켜 만 4년생에 이른 전장 59~68cm, 체중 2.1~3.4kg에 해당되는 농어 암컷을 대상으로 하였다.

난소 성숙 단계에 따라 복부 팽만 정도가 외관상 뚜렷하지 않으므로 산란기 전이라고 추정되는 1월부터 3월까지 cannulation에 의해 난성숙 발달 단계를 확인한 후 난황형성이 완료(난핵은 중앙에 위치)되었다고 생각되는 난경 0.8mm 전후의 어미를 선별하였다.

난소조직 분리 및 배양: 무균상태에서 난소를 절취하여 배양 세척액(TBSS: trout balanced salt solution, Jalabert and Fostier, 1984)으로 세척한 뒤 가는 핀셋을 이용하여 각각의 난모세포 또는 조그만 난소조직 상태로 분리하였다.

25~47개의 난모세포 또는 20~70mg의 난소조직을 1ml의 Leibovitz's L-15 배양액에 옮겨 호르몬을 첨가한 뒤 14°C에서 38~86시간 배양 후 난성숙과 배란 여부를 관찰하였다. 난성숙 효과 판별은 난핵의 위치 이동으로, 즉 GVM(germinal vesicle migration) 또는 GVBD(germinal vesicle breakdown) 관찰로 이루어졌으며(백과 김, 1996; 임등, 1997), 배란 효과는 난모세포가 여포로부터 방출되어 난 중앙에 큰 유구를 가진 것으로 판별하였다(Fig. 1).

실험에 사용된 스테로이드 호르몬과 HCG는 Sigma사로부터 구입하였으며, 스테로이드는 에탄올 농축액으로 냉동 보관해 두었다가 사용 직전 질소 가스로 건조시킨 뒤 필요한 농도의 배양액을 첨가하여 사용하였다. 배양세척액과 배양액의 pH는 7.9, 삼투 농도는 340milliosmol로 조절하였다.

실험 결과에 대한 유의성 검정은 일원 분산분

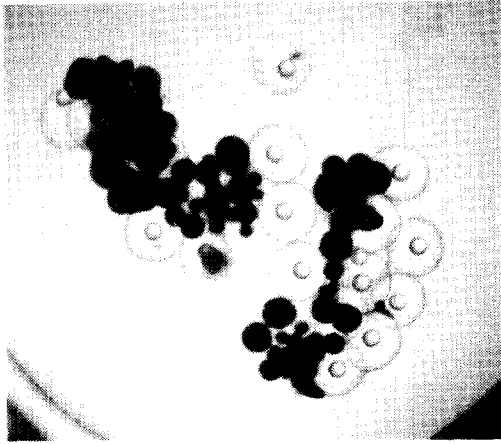


Fig. 1. *In vitro* response of the sea bass oocytes to hormone treatment. Ovulated oocytes are transparent and have a larger diameter. Oil droplets are seen at the center of the ovulated oocytes.

석에 의하였다.

결 과

분리된 난모세포(난경 800~850 μ m)를 대상으로 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone(17 α -20 β OHP : 5, 50, 500, 1000ng/ml), 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone(17 α 20 α OHP : 5, 50, 500, 1000ng/ml)와 HCG(5, 50, 500 IU/ml) 호르몬 자극에 대한 난성숙 유도 효과(GVM=germinal vesicle migration, GVBD=germinal vesicle breakdown)는 Fig. 2와 같다. 5ng/ml 농도의 17 α 20 α OHP와 17 α 20 β OHP를 제외한 모든 실험군에서의 반응은 대조군보다 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 50 ng/ml 농도의 17 α 20 β OHP 실험군에서 가장 높은 성숙 유도 효과를 보였다(58%, 대조군은 19% ($P < 0.05$)).

같은 어미의 난소 조직 20~34mg을 대상으로 17 α 20 β OHP(5, 50, 500, 1000ng/ml)와 HCG(5, 50, 500IU/ml)의 농도별 배란유도 효과를 보면 대조군에 비해 사용한 모든 농도의 실험군

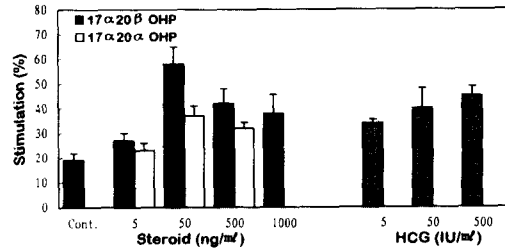


Fig. 2. The effects of 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β OHP), 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone (17 α 20 α OHP) and human chorionic gonadotropin (HCG) on germinal vesicle migration (GVM) or germinal vesicle breakdown (GVBD), "stimulation", in oocytes of the sea bass. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three replicate in incubations (40 oocytes/ml/well, incubation time=38 hrs).

에서 배란 반응을 관찰할 수 있었다($P < 0.05$). 낮은 반응 효과를 보인 HCG 500IU/ml를 제외한 모든 실험군 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다 (Fig. 3). Fig. 2의 결과를 바탕으로 난경 800~900 μ m의 난모세포를 분리하여 17 α 20 β OHP 50 ng/ml과 HCG 50IU/ml의 농도로 고정시켜 단독처리 또는 혼합처리한 후 최종성숙(GVBD) 유도 효과를 비교하였다. Fig. 4에서와 같이 17 α -

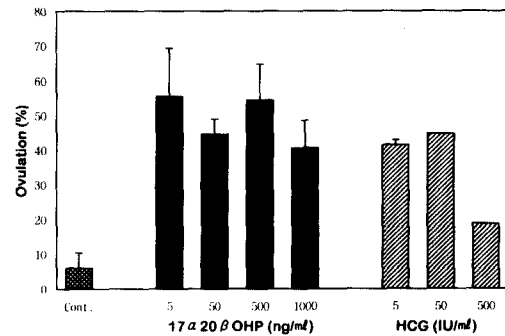


Fig. 3. The effects of 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone (17 α 20 β OHP) and human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation in ovarian fragments of the sea bass. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three replicate in incubations (20-34 mg/ml/well, incubation time=68 hrs).

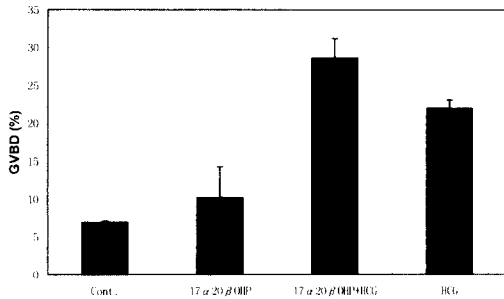


Fig. 4. The effects of selected hormone treatments on germinal vesicle breakdown (GVBD) in oocytes of the sea bass. The treatments were as follows : 17α-hydroxy,20β-dihydroprogesterone (17α20βOHP) = 50 ng/ml ; human chorionic gonadotropin (HCG) = 50 IU/ml. Each value represents the mean ± S.E.M. of three replicate in incubations (40 oocytes/ml/well, incubation time = 86 hrs).

20βOHP+HCG 실험군이 28.6%로 가장 높은 GVBD 유도 효과를 보였다(대조군은 6.9%).

같은 어미의 난소조직 34~74mg을 대상으로 17α20βOHP(1, 10, 100ng/ml)와 HCG(1, 10, 100IU/ml)의 배란유도 효과를 재실험한 결과 대조군에 비해 테스트한 모든 농도의 실험군에서 배란 반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

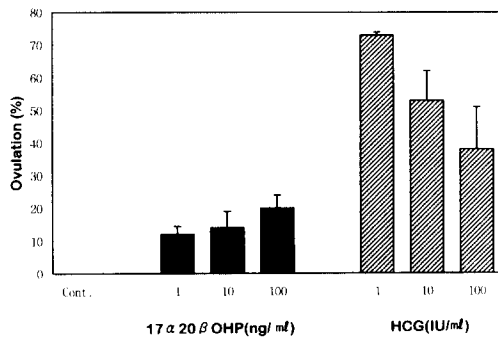


Fig. 5. The effects of 17α-hydroxy,20β-dihydroprogesterone (17α20βOHP) and human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation in ovarian fragments of the sea bass. Each value represents the mean±S.E.M. of three replicate in incubations (34-74 mg/ml/well, incubation time = 86 hrs).

고찰

유용어종을 대상으로 계획적이고 안정적인 종묘를 확보하기 위해서는 종묘생산 과정에서 인위적으로 성숙, 배란을 유도하지 않으면 안되는 경우가 많다. 호르몬 처리에 의해 성숙, 배란시절 경우 어종에 따라 적합한 호르몬 종류와 적정 농도 및 호르몬 처리에 반응할 수 있는 생식소 단계를 가진 어류를 선택하지 못하면 그 효과는 기대하기 어렵다. 특히 생체외(*in vitro*) 실험은 생체내(*in vivo*) 조건에서는 실행하기 어려운 다양한 호르몬 조절 실험을 할 수 있는 여건을 마련해 주므로 현장에서의 시행 착오를 최소화 시킬 수 있다.

난성숙 유도에 대한 HCG와 C₂₁-스테로이드의 역할은 많은 어종에서 언급되었으며, C₂₁-스테로이드 중에는 17α20βOHP가 가장 효과적인 스테로이드로 알려져 왔다(Scott and Canario, 1987). 그러나 몇몇 어종의 경우 이 호르몬의 혈중 농도는 난성숙 시기에 아주 낮거나 거의 측정이 되지 않아 또 다른 난성숙 스테로이드 호르몬의 존재를 제시하였다. Yellow perch(*Perca flavescens*)의 난소에서 17α20αOHP의 존재를 확인하였으며(Theofan and Goetz, 1983), dab(*Limanda limanda*)의 혈액중에는 17α20αOHP가 다른 C₂₁-스테로이드보다 높은 농도로 존재함을 보고하였다(Canario and Scott, 1989).

본 실험에서 농어의 난성숙 유도 효과에 대한 17α20βOHP, 17α20αOHP, 그리고 HCG의 효능 테스트 결과 17α20βOHP(50ng/ml)에 대한 반응이 가장 높은 것으로 보아 농어의 난모세포 성숙에 17α20βOHP가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. King *et al.*(1995)은 White perch(*Morone americana*)와 White bass(*M. chrysops*)를 대상으로 *in vivo*에서 HCG 투여 후 17α-20βOHP와 17α,20β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one(17α20β21P)의 분비가 증가하였으며, *in vitro*에서의 GVBD 유도에 이들 호르몬이 아주 높은 효과를 나타냈다고 보고하였다. 이러한 결과는 walleye (*Stizostedion vitreum*)에서도 마찬가지로

가지였다(Barry *et al.*, 1995). 본 연구에서는 17 α -20 β 21P가 준비되지 않은 관계로 이에 대한 효과는 실시하지 못하였다. GVBD 유도효과에 대한 17 α 20 β OHP(50ng/ml), HCG(50IU/ml), 그리고 이들 호르몬을 혼합처리한 17 α 20 β OHP+HCG에서는 혼합처리 실험군이 가장 높은 반응을 보여 이들의 상호보완적 작용을 관찰할 수 있었다.

HCG와 17 α 20 β OHP를 사용하여 *in vitro*에서 농어의 배란유도를 관찰한 결과 사용한 모든 농도(17 α 20 β OHP : 1~1000ng/ml, HCG : 1~500 IU/ml)에서 배란 반응을 보였다. 특히 저농도(17 α -20 β OHP : 50ng/ml 이하, HCG 50IU/ml 이하)로 처리하는 것이 더 효율적인 것으로 나타났으며, 이와 비슷한 결과가 walleye(*Stizostedion vitreum*)에서도 관찰되었다(Barry *et al.*, 1995). 또한 Fig. 5의 결과를 보면 HCG 처리가 17 α 20 β -OHP보다 배란 반응에 더 민감한 것으로 생각된다. Berndtson *et al.*(1989)의 보고에 의하면 yellow perch로부터 분리한 각각의 난모세포는 17 α 20 β OHP에 대하여 배란 반응을 보이지 않는 반면, 난소조직 상태로서는 배란 반응을 보였으므로 난모세포와 그것을 둘러싸고 있는 조직 사이에 배란을 조절하는 물질의 존재를 시사하였다. 본 연구에서도 배란 효과 실험은 난소조직을 대상으로 실시되었다. 앞으로 농어의 성숙에 관여하는 또 다른 C₂₁-스테로이드인 17 α 20 β 21P의 존재와 성숙과 배란유도에 더욱 적합한 호르몬의 존재 가능성에 대한 실험이 이루어져야 할 것이다.

요 약

농어의 난성숙과 배란유도를 위한 C₂₁-스테로이드와 HCG의 효능 비교실험이 *in vitro*에서 이루어졌다.

분리된 난모세포를 대상으로 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone(17 α 20 β OHP), 17 α -hydroxy,20 α -dihydroprogesterone(17 α 20 α -OHP : 5~100ng/ml)와 HCG(5~500IU/ml)를 사용하여 관찰한 난성숙 유도효과, 즉 GVM

(germinal vesicle migration)과 GVBD(germinal vesicle breakdown)를 보면, 5ng/ml 농도의 17 α 20 α OHP와 17 α 20 β OHP를 제외한 모든 실험군에서의 반응은 대조군보다 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 17 α 20 β OHP 50ng/ml 농도에서 가장 높은 성숙 유도효과를 보였다. GVBD 유도효과에 대한 17 α 20 β OHP(50ng/ml), HCG(50IU/ml) 그리고 이들 호르몬을 혼합처리한 17 α 20 β OHP+HCG에서는 혼합처리한 실험군이 가장 높은 반응을 보여 이들의 상호보완적 작용을 관찰할 수 있었다.

난소조직을 대상으로 HCG와 17 α 20 β OHP를 사용하여 *in vitro*에서 농어의 배란유도효과를 관찰한 결과 사용한 모든 농도(17 α 20 β OHP : 1~1000ng/ml, HCG : 1~500IU/ml)에서 배란 반응을 보였다. 특히 저농도 50ng/ml 또는 50IU/ml 이하로 처리하는 것이 더 효율적인 것으로 나타났다. 또한 HCG 처리가 17 α 20 β OHP보다 배란 반응에 더 민감하게 작용하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Barry, T. P., J. A. Malison, A. F. Lapp and L. S. Procarione, 1995. Effects of selected hormones and male cohorts on final oocyte maturation, ovulation, and steroid production in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquaculture*, 138 : 331-347.
- Berndtson, A. K., F. W. Goetz and D. Priscilla, 1989. *In vitro* ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian components of yellow perch (*Perca flavescens*) : Effects of 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 75 : 454-465.
- Canario, A. V. M. and A. P. Scott, 1989. Synthesis of 20 α -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 76 : 147-158.
- Canario, A. V. M. and A. P. Scott, 1990. Effects of steroids and human chorionic gonadotrophin on *in vitro* oocyte final maturation in two marine flatfish : The dab, *Lima-*

- nda limanda*, and the Plaice, *Pleuronectes platessa*. Gen Comp. Endocrinol., 77 : 161-176.
- Canario, A. V. M. and A. P. Scott, 1990. Plasma levels of ovarian steroids, including 17 α ,20 α -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 3 β , 17 α , 20 α -trihydroxy-5 β -pregnane, in female dabs (*Limanda limanda*)-marine flatfish-induced to mature and ovulate with human chorionic gonadotrophin. Gen. Comp. Endocrinol., 77 : 177-191.
- Goetz, F. W., 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In Fish physiology, Academic Press. New York., Vol. IXB : 117-170.
- Jalabert, B. and A. Fostier, 1984. The modulatory effect *in vitro* of oestradiol-17 β , testosterone or cortisol on the output of 17 α -hydroxy,20 β -dihydroprogesterone by rainbow trout(*Salmo gairdneri*) ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropin s-GtH. Reprod. Nutr. Develop., 24 : 127-136.
- Jalabert, B., A. Fostier, B. Breton and C. Weil, 1991. Oocyte maturation in vertebrates. In : "Vertebrates endocrinology : fundamentals and biomedical implications", 3 : 23-90(P. K. T. Pang and M. P. Schreiber eds.), Academic Press. N. Y.
- King, V. W., D. V. Berlinsky and C. V. Sullivan, 1995. Involvement of gonadal steroids in final oocyte maturation of white perch (*Morone americana*) and white bass (*M. chrysops*) : *in vivo* and *in vitro* studies. Fish Physiol. Biochem., 14(6) : 489-500.
- Kagawa, H., H. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose, 1994. Development of maturational competence of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, after human chorionic gonadotropin treatment *in vitro* requires RNA and protein synthesis. Gen. Comp. Endocrinol., 94 : 199-206.
- Theofan, G. and F. W. Goetz, 1983. The *in vitro* synthesis of final maturational steroids by ovaries of brook trout(*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch(*Perca flavescens*). Gen. Comp. Endocrinol., 51 : 84-95.
- 백혜자 · 김윤, 1996. 범가자미, *Verasper variegatus*의 난모세포 성숙(GVBD) 유도를 위한 HCG 와 스테로이드 호르몬의 *in vitro* 효과. J. Aquaculture, 9(1) : 57-63.
- 임상구 · 백혜자 · 한창희, 1997. 동자개(*Pseudobagrus fulvidraco*)의 난모세포 성숙과 배란에 대한 스테로이드와 HCG의 *in vitro*효과. J. Korean Fish Soc., 30(2) : 203-210.