

성선자극 호르몬 투여가 토끼의 배란시간, 난자의 수정능력 보유시간과 난할 속도에 미치는 영향

김 병 기[†]

동의대학교 자연과학대학 생물학과

Effect of Gonadotropin Administration on the Timing of Ovulation, Fertilizable Life of Eggs and Cleavage of Embryos in Rabbit

Byung-Ki Kim[†]

Department of Biology, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

The present study was carried out to investigate the effect of gonadotropin administration on the timing of ovulation, fertilizable life of eggs and cleavage of embryos in rabbit. Mature angora rabbits were primed for superovulation with PMSG 100IU. Eighty hours later, the rabbit were induced to ovulate with HCG 100IU. Ovulation had started at 10hours after HCG injection and finished at about 16hours. Fertilizable life of eggs were lasted for 8hours after ovulation. The most frequent developmental stage observed from the embryos recovered at 24, 48, 72, 96, and 120 hours after HCG injection was 2-cell, 16-cell, morula, blastocyst and blastocyst, respectively.

Key words : gonadotropin, ovulation, fertilizable life, cleavage.

서 론

암컷 포유동물의 번식을 위한 난포의 성숙, 배란과 수정, 수정란의 발생 및 수란관과 자궁의 증식 또는 분비 등은 시상하부-뇌하수체-생식기로 이어지는 내분비조절에 의하여 달성된다. 대다수의 포유동물은 발정기라는 시간에 소수의 난자만 배란하여 번식에 제공되지만 신생송아지의 난소는 출생시 이미 50,500-75,000개의 원시난포를 갖고 있다¹⁾.

근래에 이르러 이러한 암컷의 잠재번식능력을 성선자극 호르몬을 투여하여 인위적으로 개발하고자 하는 연구가

많이 진행되어 왔다. 수정란이식과 수정란의 유전공학적 연구를 위하여서는 과배란처리가 필수적인 기술이나 성선자극호르몬의 종류, 동물의 종류 및 개체에 따라 나타나는 반응의 변화가 심하여 일률적인 작용기전에 관하여서는 아직 규명하여 할 점이 많다. 토끼는 교미자극에 의하여 배란이 일어나지만 성선자극호르몬의 투여로 배란을 유기할 수 있다²⁾. 이러한 번식학적 특성을 갖고 있는 토끼에서 성선자극호르몬 투여가 배란시간, 배란된 난자의 수정능력보유시간과 수정란의 분할속도에 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

[†] Corresponding author

재료 및 방법

가. 공시동물

본 실험에 사용한 실험동물은 체중 3.0~4.0 kg의 성숙 Angora토끼로서 실험실에서 20일간의 적응사육을 실시한 후 개체별 cage에서 사육하였다. 전 실험기간 동안 사료(축협 토끼 사료; 가소화 에너지, 2500 Kcal/kg: 조단백, 15%)와 물은 무제한 급여하였다.

나. 성선자극호르몬처리

과배란을 유도하기 위하여 pregnant mare serum gonadotropin(PMSG, 日本三共ノキ社)을 식염수(0.15M NaCl) 1 ml에 100 IU씩 희석하여 100IU를 피하주사하였고, 배란을 유기하기 위하여 human chorionic gonadotropin(HCG, 日本三共ノキ社)으로써 식염수(0.15M NaCl) 1ml에 200 IU씩 희석하여 PMSG투여 후 80시간에 이정맥에 주사하고 자연 교미를 시켰다.

다. Laparotomy

일반적인 외과 처리후 Xylazine(Rumpon, Bayer사; 5 mg Kg-1)을 근육주사와 동시 국소마취(Lidocaine 1 ml) 하였다. 수술부위는 마지막 늑골에서 후측으로 6cm, 요추 횡돌기에서 복측으로 5 cm 교차 되는 부위를 마지막 늑골과 평행하게 2cm를 절개한 후 난소를 복강 밖으로 노출시켜 배란점과 대형난포를 조사한 후 복막, 근육 및 피부를 같이 결찰하였다. 수술후 procaine penicillin G(50,000 IU)를 1회 근육주사하였다.

마. 실험설계

실험 1.

성선자극호르몬투여가 배란시간에 미치는 영향을 검토하기 위하여 HCG투여 후 8, 10, 12, 13, 14, 16시간에 laparotomy에 의하여 배란점과 대형난포를 조사하고, HCG 투여 후 24시간에 laparotomy에 의하여 조사된 실험동물을 도살하여 배란점과 대형난포를 조사하였다.

실험 2.

성선자극호르몬 투여후 배란된 난자의 수정능력보유시간을 조사하기 위하여 PMSG 100IU 투여 후 80시간에 HCG 100IU를 주사하고 HCG투여후 8, 10, 12, 14, 16시간에

수정하여 HCG투여 후 72시간에 수정란의 발생을 조사하였다.

실험 3.

성선자극호르몬처리에 의하여 배란·수정된 수정란의 발생속도와 수란관에서 자궁으로 이동시간을 조사하기 위하여 HCG투여 후 24, 48, 72, 96, 120시간에 수란관과 자궁에서 수정란을 회수하였다.

바. 통계 분석

본 실험에서 얻은 성적의 통계처리는 statistic program package를 이용하여 실시하였다. 각각의 반복처리 측정치는 평균과 표준오차를 구하였고, 각 처리구의 차이는 분산분석법으로 F-검정과 t-검정을 실시하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 배란시간

과배란처리 토끼의 배란시간은 Table 1에서 보는 바와 같이 HCG투여후 8시간에 laparotomy로 조사된 배란점은 없었고, 직경 2mm 이상의 난포만 21.6 ± 1.4 개가 있었으나, 이 실험구의 동물을 HCG투여후 24시간에 도살하였을 때 난소에는 20.2 ± 1.4 개의 배란점이 있었다. 10시간에서 laparotomy로 조사된 배란점이 4.4 ± 1.8 개가 나타나기 시작하여 12시간구에서는 12.6 ± 2.8 , 13시간구는 20.8 ± 1.5 , 14시간구에서는 21.6 ± 6.0 , 16시간구에서는 19.2 ± 1.6 이었으며 각 실험구의 토끼를 HCG투여 후 24시간에 도살한 난소의 배란점은 10, 12, 13, 14, 16시간구에서 각각 21.6 ± 2.0 , 19.0 ± 1.1 , 22.0 ± 1.1 , 22.0 ± 5.7 , 19.4 ± 1.6 이었다. HCG투여후 24시간의 배란점에 대한 각 시간에서 laparotomy에 의하여 조사한 배란점과의 비율을 배란율이라고 하였을 때 8시간에서는 0%, 10시간에서는 $19.7 \pm 8.0\%$, 12시간에서는 $63.8 \pm 12.7\%$, 13시간에서는 $94.3 \pm 3.9\%$, 14시간에서는 $80.0 \pm 17.9\%$ 이었고, 16시간에서는 $98.8 \pm 1.1\%$ 로서 배란은 HCG 투여 후 13시간 이전에 거의 일어났다.

2. 수정능력보유시간

PMSG와 HCG처리에 의하여 과배란된 난자의 수정능력 보유시간은 Table 2에서 보는 바와 같이 HCG투여후 8시

Table 1. Influence of gonadotropin administration on the time of ovulation in the Angora rabbits observed after operation and slaughter

Time of operation after HCG injection	n	operated			slaughtered			ovulating* rate
		No. of animals ovulated	ovulating point	large follicle $\geq 2\text{mm}$	No. of animals ovulated	ovulating point	large follicle $\geq 2\text{mm}$	
8h	5	0	0	108 [†] 21.6±1.4 [‡]	5	91	18	0
10h	5	4	22 4.4±1.8	104 20.8±2.2	5	108	21	19.7±8.0
12h	5	5	64 12.6±2.8	60 12.0±3.1	5	95	24	63.8±12.7
13h	5	5	104 20.8±1.5	38 7.6±2.1	5	110	39	94.3±3.9
14h	5	4	99 21.6±6.0	22 4.2±1.8	5	110	20	80.0±17.9
16h	5	5	96 19.2±1.6	20 4.0±1.7	5	97	19	98.8±1.1
						19.4±1.6	3.8±1.5	

[†] ; Sum of ovulating point from all animals, [‡] ; Mean±SE

* ; (Ovulating points at operation/ovulating points at slaughter) × 100 Parenthesis denotes the percentage of eggs recovered.

간에 교미시킨 구에서 미수정난자가 21.4% 이였고, 12시간 구에서는 46.3%, 14시간에는 68.7%, 16시간에는 78.9% 로서 HCG투여후 12시간 이후에 교미시킨 구에서 미수

정난자가 유의적(p<0.01)으로 증가하였으며, 수정란 생존율 역시 12시간구에서 47.1±4.1%로 유의적(p<0.01)으로 감소하였다.

Table 2. Fertilizable life of eggs and morphology of eggs recovered at 72 h after HCG injection in Angora rabbits treated with PMSG 100 IU and HCG 100 IU

Time of mating after HCG	n	ovulating points	Morphology of eggs recovered							total eggs recovered	survival rate	recovery rate
			8-cell	16-cell	32-cell	morula	blastocyst	degenerated eggs	unfertilized eggs			
8h	5	125 [†] 25.0±2.0 [‡]	2 (1.8)	3 (2.9)	27 (26.2)	41 (39.8)		8 (7.8)	22 (21.4) ^A	103 (100.0)	70.9±2.3 ^A	81.7±4.1
10h	5	118 23.6±2.0		5 (5.2)	19 (19.6)	39 (40.2)		5 (5.1)	29 (29.9) ^{A,B}	97 (100.0)	62.1±4.6 ^{A,B}	82.7±1.8
12h	5	115 23.0±1.0	1 (1.1)	2 (2.1)	17 (17.9)	24 (25.3)	1 (1.1)	6 (6.2)	44 (46.3) ^B	95 (100.0)	47.1±4.1 ^B	83.3±4.4
14h	5	124 24.8±2.5		2 (1.8)	2 (1.8)	16 (14.7)	1 (0.9)	12 (11.1)	76 (69.7) ^C	109 (100.0)	18.8±1.7 ^C	88.5±3.2
16h	5	134 28.8±3.6			1 (0.9)	6 (5.3)		17 (14.9)	90 (78.9) ^C	114 (100.0)	6.1±1.9 ^C	82.4±6.9

Values with different superscripts in the same columns are significantly different(p<0.01).

[†] ; Sum of ovulating point from all animals, [‡] ; Mean±SE

Parenthesis denotes the percentage of eggs recovered.

3. 수정란의 분할 및 하강속도

과배란된 수정란의 분할속도는 Table 3에서 보는 바와 같이 HCG투여 후 24시간에 회수한 수정란은 1세포기 수정란이 19.3%, 2세포기 수정란이 59.0%, 4세포기가 15.7%로서 2세포기가 가장 많았고, 48시간에서는 8세포기가 20.2%, 16세포기가 54.4%, 32세포기가 9.6%로서 대부분이 8 또는 16세포기 수정란이었다. 그리고 48시간까지는 수정란이 수란관에서만 회수되었다. 72시간에는 32세포기가 16.1%, 상실배가 59.8%이었으며, 수정란의 26.0%가 수란관에서 회수되었고 나머지 74.0%에 해당하는 수정란은 자궁에서 회수되었다. 96시간에서는 상실배가 13.2%, 배반포가 67.5%이었으며 전수정란이 자궁에서 회수되었다. 회수율은 수정란이 수란관에 위치하는 시간인 24시간과 48시간에서 각각 93.3±1.7%와 92.2±2.3%로 높았으나, 72시간에는 86.7±1.9%로 낮아졌으며 자궁에 수정란이 도달하는 시간 즉 96, 120시간에 각각 87.5±3.2%와 88.0±2.8%이었다.

고 찰

PMSG로 난포를 성숙 시켜 HCG투여로 배란을 유기하면 HCG투여 후 8시간에 laparotomy로서 확인된 배란점은 없었고 대형난포만 존재하였으나, 24시간 후에는 개체당

20.2±1.4개의 배란점을 확인할수 있었으므로 HCG투여 후 8시간에는 배란이 일어나지 않음을 나타내고 있다. HCG투여 후 10시간에는 4.4±1.8개의 배란점을 나타내어 배란이 시작하였고, 13시간에서는 배란율이 급격히 증가하여 16시간에 98.8±1.1%로서 거의 종료되었다. 토끼에서 배란자극후 즉시 난소내 압력³⁾의 변화가 없었으나 배란자극 후 6~8시간 사이에서 압력이 증가하여 9~10시간 지속하므로 본 연구에서 배란이 유기된 시간과 일치하고 있다. Fujimoto⁴⁾등은 HCG처리 후 8시간에 배란이 시작되어 14.5시간에는 25.3%가 배란되었다고 보고하여 배란시작 시간과 14시간에서의 배란율이 본 실험 결과와 상당한 차이가 있었다. 그러나 石島⁵⁾와 Lambertsen⁶⁾는 HCG 투여 후 각각 9~16시간과 10~15시간 사이에서 배란이 일어났다고 하여 본 연구와 거의 일치하고 있다. LH⁷⁾로 배란을 유기하면 LH투여 후 10시간까지는 배란이 일어나지 않았으나 10.5시간에는 50%, 14시간에 배란이 종료하여 본 연구에 비하여 배란 개시는 늦었으나 배란에 소요되는 전체시간은 오히려 짧았어 배란이 동기화되는 경향이였다. 배란의 비동기화는 난자의 수정율을 감소 시킨다⁸⁾. Walker⁹⁾등은 PMSG처리는 FSH에 비하여 배란종료시간은 빨랐으나 배란소요시간은 두중의 성선자극호르몬에 차이가 없었으며, GnRH처리는 배란소요시간을 PMSG와 FSH에 비하여 단축할 수 있었으므로 배란을 동기화 시킨다. GnRH¹⁰⁾ 처리는

Table 3. Developmental stage of embryos in Angora rabbits treated with PMSG 100 IU and HCG 100 IU

Time of mating after HCG	n	ovulating points	Morphology of eggs recovered								Total eggs recovered	Survival rate(%)	Recovery rate	
			1-cell	2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	32-cell	morula	blastocyst				ahn*
24h	5	86 [†]	16	49	13						5	83	94.9±3.0	93.3±1.7
		17.2±2.1 [‡]	(19.3)	(59.0)	(15.7)						(6.0)	(100.0)		
48h	5	125				23	62	11			18	114	84.9±3.3	92.2±2.3
		25.0±2.4				(20.2)	(54.4)	(9.6)			(15.8)	(100.0)		
72h	5	139						18	67		27	112	76.7±2.1	86.7±1.9
		27.8±3.3						(13.2)	(59.8)		(24.1)	(100.0)		
96h	5	131							15	77	22	144	79.3±3.2	87.5±3.2
		26.2±3.2							(13.2)	(67.5)	(19.3)	(100.0)		
120h	5	125								80	20	100	81.0±2.3	81.0±2.8
		25.0±4.5								(80.0)	(22.0)	(100.0)		

[†] ; Sum of ovulating point from all animals [‡] ; Mean±SE

* ; Degenerated or unfertilized eggs Parenthesis denotes the percentage of eggs recovered.

estrogen 분비를 감소하여 배란을 동기화할 수 있다. 본 실험에서 GnRH의 영향을 검토할 수 없었지만 본 연구와 다른 연구자의 보고에서 배란개시시간, 배란이 진행되는 속도 및 배란종료는 성선자극호르몬의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다. 과배란처리한 토끼 난자의 수정능력보유시간을 지연교미법^{5,11)}으로 검토하였다. HCG주사후 16시간에서 교미 시켰을 경우 미수정란이 78.9%로서 유의적 ($p < 0.01$)으로 증가하였다(Table 2). HCG주사후 13시간에는 배란이 거의 완료하여 이미 PMSG로 자극된 대형난포의 $94.3 \pm 3.9\%$ 에서 배란되어 난자들이 수정을 위하여 정자를 대기하고 있는 상태이다(Table 1). 토끼의 정자가 수정을 위하여 생식기관내 이동과 수정능력을 획득에 요하는 시간은 8시간¹²⁾이므로 HCG투여 후 16시간에 교미를 시키면 배란이 거의 완료되는 시간인 HCG주사후 13시간에서 배란된 대다수의 난자는 배란후 교미에 소요되는 3시간과 정자의 수정능력에 요하는 8시간 즉 배란 후 11시간에 실제 수정이 일어난다. 미수정난자는 HCG투여 12시간 이후 유의적($p < 0.01$)으로 증가하였으므로 배란 후 8시간 정도는 수정능력을 보유하고 있는 것으로 사료된다. 자연교미에 의하여 배란된 난자는 배란후 8시간 동안 수정능력을 갖고 있다¹³⁾. PMSG처리 전에 estrogen을 투여하면 HCG 주사 후 13시간에 교미시킨 토끼에서 수정된 난자의 수가 급격히 감소하여 수정능력 보유시간은 6~8시간이다¹⁴⁾. LH로서 유기한 난자의 수정능력은 6~9시간이다¹⁵⁾. 본 실험 결과와 전술한 연구보고에서 성선자극호르몬 처리는 난자의 수정능력보유시간에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 과배란된 토끼 수정란의 분할속도는 HCG투여후 24시간에서는 2세포기 수정란이 59.0%, 48시간에는 16세포기 수정란이 54.4%, 72시간에는 상실배가 59.8%, 96시간과 120시간에서는 배반포가 각각 67.5%와 80.0%로서 가장 많았다. 이러한 결과는 다른 연구¹⁶⁾와 거의 일치하고 있으나 자연교미¹⁴⁾에 의한 수정란의 분할속도에 비하여 약간 지연되거나 일정하지 않았다. 이것은 과배란처리로 인하여 난포의 성숙과 배란이 동기화하지 못한 것으로 사료된다. 수정란이 수란관에서 자궁으로 이동하는 것은 수란관의 섬모운동과 평활근수축¹²⁾, 수란관분비액 흐름¹⁷⁾으로 이루어진다. 자연상태하에서 수정란이 자궁으로 이동하는 시간은 교미후 84시간^{12,18)}이었으며, 과배란처리에 의하여 배란된 수정란은 67시간¹⁵⁾이었다. 본연구에서는 72시

간에 회수한 수정란중 25.0%가 수란관에서 74.0%는 자궁에서 회수되어 다른 연구자와 일치하고 있으나 石島¹⁸⁾ 등은 PMSG로서 과배란 처리한 토끼에서 교미후 72시간에 대부분의 수정란이 자궁에서 회수되었다고 보고하여 차이가 있었다. 과배란처리는 다수의 난포를 발육하여 estrogen분비를 촉진한다¹⁹⁾. 과도히 분비된 estrogen은 배란된 난자의 이동률 촉진하여 미성숙상태의 수정란이나 난자를 자궁으로 보내어져 변성된 후 자궁경관을 통하여 배출된다²⁰⁾.

요 약

본 실험은 성선자극 호르몬 투여가 토끼의 배란시간, 수정능력보유시간, 수정란의 난할속도 등에 미치는 영향을 조사하기 위하여 성숙 양고라 토끼에 PMSG 100IU를 투여하여 다수의 난포성숙을 유도하고 80시간 후 HCG 100IU를 주사하여 배란을 유기하였다. 배란은 HCG투여후 10시간에 시작하여 16시간에 거의 종료하였으며, 과배란처리에 의하여 배란된 난자의 수정능력을 보유하고 있는 시간은 배란후 8시간이었다. 수정란 분할은 HCG투여후 24, 48, 72, 96, 120시간에 회수한 회수한 수정란은 각각 2세포기 수정란, 16세포기 수정란, 상실배, 배반포, 배반포가 가장 많았다.

참 고 문 헌

1. Erickson BH : Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 25, 800(1966).
2. 김병기 : 과배란 처리 토끼에서 수정란의 초기발생에 난소 steroid호르몬이 미치는 영향. *동의대 생물생산연구지* 12-13, 13(1996).
3. Virutamasen P, Smitasiri Y and Fuchs A-R : Intraovarian pressure changes during ovulation in rabbits. *Fertli Steril* 27, 188(1976).
4. Fusimoto S, Rawson JMR and Dukelow WR : Hormonal influence on the time of ovulation in the rabbit as determined by laparoscopy. *J Reprod Fert* 38, 97(1974).
5. 石島芳郎 : 過排卵家兔의 排卵時間의 檢討. *農學會日報* 15, 145(1974).
6. Lambertsen CJ Jr, Greenbaum DF, Wright KH and Wallach EE : In vitro studies of ovulation in the perfused rabbit ovary. *Fertli Steril* 27, 178(1976).
7. Harper MJK : Ovulation in the rabbit : The time of follicular rupture and expulsion of the eggs in rela-

- tion to injection of luteinizing hormone. J Endocrinol 26, 307(1963).
8. Whyman Dand Moore RW : Effect of PMSG and the prostaglandin F_{2α} analogue, cloprostenol on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. J Reprod Fertil 60, 267(1980).
 9. Walker SK, Smith DH and Seamark RF : Timing of multiple ovulation in the ewe after treatment with and without GnRH. J Reprod Fertil 77, 135(1986).
 10. Jabbour HN and Evans G : Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-P. Anim Reprod Sci 26, 93(1991).
 11. Marston JH and Chang MC : The fertilizable life of eggs and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. J Exp Zool 121, 351(1964).
 12. Hafez ESE : Reproduction and breeding techniques for laboratory animal. Lea and Febiger, Philadelphia, p.334(1970).
 13. Chang MC : Fertilizability of rabbit ova and the effect of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo. J Exp Zool 121, 351(1952).
 14. 石島芳郎・伊藤雅夫・東泰 弘 : 過排卵家兎卵子の受精能力保有時間の 検討. 日本家畜繁殖誌 15, 29(1969).
 15. Adams CE : Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* : The effect of transferring varying numbers of eggs. J Endocrinol 24, 471 (1962).
 16. 角田幸生・入谷 明・西川義正 : 家兎の過排卵ならびに反復過排卵誘起に関する研究. 日畜會報 49, 89(1978).
 17. Harper MJK : The physiology of reproduction. pp. 114-124, Raven press, New York(1988).
 18. 石島芳郎・伊藤雅夫・平林 忠・佐久間勇次 : 家兎の過排卵誘起におけるestrogen前處置の效果. II 卵子の生殖器下降速度および卵精分割速度の 検討. 日本家畜繁殖誌 13, 71(1967).
 19. Jabbour HN, Veldhuizen FA, Mulley RC and Asher GW : Effect of exogenous gonadotropins on oestrus, the LH surge and the timing and rate of ovulation in red deer. J Reprod Fertil 100, 533(1994).
 20. Argo C McG, Jabbour HN, Goddard PJ, Webb R and Loudon ASI : Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and David's deer (*Elaphurus davidianus*) and fertilization rates following artificial insemination with David's deer semen. J Reprod Fertil 100, 629 (1994).