韓國受精卵移植學會誌(2005) 第 20 卷 第 3 號
Korean J. Emb. Trans. (2005) Vol. 20, No. 3, pp. 317~322

젖소 과배란 처리시 PEG(Polyethylene Glycol) 처리가 수정란 생산에 미치는 영향

최선호† · 류일선 · 한만희 · 조상래 · 최창용 · 김현종 · 손동수 · 김영근 · 이종완[1]
축산연구소 가축유전자원시험장

Effects of PEG on Embryo Production in Superovulated Hostein Cows

S. H. Choi†, I. S. Ryu, M. H. Han, S. R. Cho, C. Y. Choe, H. J. Kim, D. S. Son, Y. K. Kim and J. W. Lee[1]
Animal Genetic Resources Station, NLRI, RDA

SUMMARY

This study was conducted to improve the efficiency of embryo recovery and to establish the protocols of superovulation in Holstein cows. Sixteen Holstein cows were used the test the efficacy of three superovulation regimens using Folltropin. In the case of regimen 1, CIDR plus with E2 capsule was inserted in cows at the random stage of estrous cycle and the total of 400 mg Folltropin V was adminstered twice a day for 4 days(Folltropin V group). In regimen 2, CIDR was inserted and 3.0 mg estradiol benzoate was administered i.m. next day and the total of 400 mg Folltropin was adminstered twice a day for 4 days(Folltropin V+EB group). For regimen 3, CIDR insertion was same as in the regimen 2 and the total of 400 mg Folltropin diluted with 10% PEG 8,000 was administered once(Folltropin V+PEG 8,000 group). In all the regimens, CIDR were removed on 12th day and 45 mg dinoprost was administered i.m. simultaneously. The heat detected donors were administered 200 ug LH-RH and inseminated twice with 2 straws of frozen semen 12 hours apart. Embryo were collected using Foley catherter in each uterine horns on 6~8 days after inseminations. The evaluation of collected embryos were according to the IETS manual. The CL responses according to the superovulation treatments were 5.8, 20.6, 24.0 in the Folltropin V, Folltropin+EB and Folltropin V+PE 8,000 groups, respectively and there were significant different among the treatments($p<0.01$). Transferable embyos collected were 3.6±2.4, 3.3±1.8 and 2.8±2.3, in the Folltropin V, Folltropin+EB and Folltropin V+PE 8,000 groups, respectively. Degenerated and unfertilized embryos in regimen 2 and 3 than regimen 1. These results indicates that superovulation treatments with both multiple injections and a single injection using PEG of Folltropin combined with CIDR insertion at the random stage of estrus cycle can be used to produce Holstein embryos.

(Key words : folltropin, superovulation, PEG, Holstein)

[1]공주대학교(Kongju University)
† Correspondence : E-mail : sunho@rda.go.kr

서 론

공란우의 효율성 증대를 위하여 과배란 처리기법의 개선은 필수적이다. 과배란 처리반응은 공란우가 가지고 있는 개체 차이에 따라 결과가 상이하게 나타나며, 젖소의 번식도 감소하는 경향을 보이고 있다. 가장 큰 이유로는 낭종성 질병이 가장 많아졌고(Lucy, 2001), 발정 지연과 배란 지연 등의 근본적인 문제(Opsomer 등, 1998; Merton 등, 2003; Lopez, 2004)가 발생하고 있으며, 그에 따라 발정관찰이 어렵고, 착상율(Satori 등, 2002)이 낮아지는 원인이 되고 있다. 특히 고능력의 젖소 공란우의 경우는 에너지 균형이 분만 후 우유생산을 유지하는 데 주된 요인이며, 에너지 대사의 변화는 난포액의 형성(Nolan 등, 1998; Leroy 등, 2004a; 2004b; Bader 등, 2005)에 영향을 미치며, 이러한 이유로 난자의 성장과 성숙에 역효과를 발생시킨다. 성공적인 수정란이식을 위해서는 공란우들의 다양한 과배란 반응의 차이(Morrow 등, 1976; Adams 등, 1992; Guibault 등, 1991; Ax 등, 2005), 수정란의 생산량의 차이(Greve 등, 1995) 등에 의해서도 많은 변이가 나타나므로 보다 더 합리적인 처리방법이 요구된다고 하겠다.

과배란 처리기법으로는 대부분이 progesterone 방출 기구와 함께 FSH를 병용하여 처리하는 방법이 가장 손쉽게 할 수 있는 방법이나, 과배란처리 후 수정란의 회수까지의 기간이 대개 20일 이상 소요되는 불편함이 있다. 장시간의 처리로 인하여 공란우에게 발생할 수 있는 스트레스도 양질의 수정란을 채취하는 데 장해요인이라고 할 수 있겠다. FSH의 투여는 동량법, 점감법 등이 이용되고 있으며, 대개 4일간 주사하고 있다. 따라서 보다 간편하고 단순한 방법이 요구된다. Polyethylene glycol (PEG)은 고분자의 물질로 혈청내 LH의 농도 측정을 위한 RIA에 이용(Seibel 등, 1981)되었으며, 수정란의 급속 동결시 비침투 물질로서 수정란을 동해로부터 보호하는데 이용되고 있다. 따라서 PEG에 FSH를 용해하여 사용시 여러 번 주사를 놓아야 하는 불편함과 공란우에게 미칠 스트레스를 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 본 시험은 PEG를 이용하여 젖소 공란우에 과배란처리시 PEG의 효과가 수정란 생산에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

공란우는 305일 보정 산유량 8,000 kg/년 이상인 경산 홀스타인 16두를 공시축으로 이용하여 과배란처리에 이용하였으며, 과배란처리 후 도입 동결정액으로 수정을 실시하였다.

2. 공란우의 과배란 처리

공란우는 발정발현에 관계없이 직장검사로 생식기 상태을 검사하여 양호한 개체를 선정하여 아래의 성선자극 호르몬 재제를 투여하는 3가지의 과배란을 유기하였다. 첫째는 CIDR plus (InterAg, New Zealand)의 estradiol 캡슐을 그대로 이용하며, 질내 삽입한 후 10일째에 Folltrophin-V(Vetrepharm Canada) 400 mg을 4일간 12시간 간격으로 50 mg씩 주사하고, 3일째에 dinoprost 45 mg을 주사하였다. 둘째로는 CIDR plus (InterAg, New Zealand)의 estradiol 캡슐을 제거하여, 질내 삽입한 후 다음날에 Estradiol benzoate(EB, 에스론, 삼양약화학) 3.0 mg을 근육주사하고, 10일째에 Folltrophin-V (Vetrepharm, Canada) 400 mg을 4일간 12시간 간격으로 50 mg씩 주사하고, 3일째에 dinoprost 45 mg을 주사하였다. 셋째로는 CIDR plus (InterAg, New Zealand)의 estradiol 캡슐을 제거하여, 질내 삽입한 후 10일째에 Folltrophin-V 400 mg을 PEG 8000 (polyethylene glycol 8000, Fisher Chemical USA)를 10% 융해 혼합시켜 1회 근육 주사한 후 12일째에 CIDR를 제거함과 동시에 dinoprost 45 mg을 분할 근육주사하였다. 공란우 발정 발현 12시간 후 정액 2 straw를 인공수정 및 LH-RH(Conceral, Upjohn, USA) 200 μg을 근육주사 하였으며, 12시간 후 정액 2 straw를 재차 인공수정하였다.

3. 공란우의 인공수정

공란우 발정발현 12시간 후 정액 2 straw로 인공수정 및 LH-RH(콘세랄, 동방) 200 μg을 주사하였으며, 그로부터 12시간 후 정액 2 straw로 재수정하였다.

4. 황체의 관찰 및 수정란 회수

공란우의 황체의 관찰은 수정란 회수시 직장검사법으로 황체의 수를 확인하였고, 공란우를 인공수정 후 6~8일에 2% lidocaine 6 mL로 경막외 마취후 FBS 2%가 함유된 D-PBS 용액으로 Foley catherter를 이용하여 자궁경관 경유법으로 각각의 자궁각을 별도로 수정란을 회수하였다.

5. 수정란의 평가

회수된 채란액을 실체현미경 하에서 수정란을 회수하여 IETS(International Embryo Transfer Society) Manual(Stringfellow와 Seidel, 1990)의 평가방법에 따라 수정란의 등급과 발육 단계를 구분하였다. 회수된 수정란 중 미세한 결함을 가진 수정란(1등급)과 소수의 돌출된 할구와 변성세포가 존재하는 수정란(2등급)을 이식가능 수정란으로 분류하였다.

6. 통계분석

본 시험에서 얻어진 결과의 통계분석은 STATVIEW program의 ANOVA test 및 Fisher's protected least significant difference test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 성선자극 호르몬의 처리방법이 황체 형성에 미치는 영향

홀스타인을 이용하여 성선자극호르몬의 처리에 따른 황체의 반응은 Table 1과 같다. Folltropin V 처리시 5.8개의 황체를 나타내었고, Folltropin V+EB, Folltrpin V+PEG의 처리시 20.6개, 24.0개를 각각 나타내어 별도의 EB의 주입과 PEG 처리가 Folltropin V만으로 처리한 것보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 Folltropin의 주입 용량에 관계없이 황체수가 변화가 없다고 한 Mapletoft 등(1988)의 결과와는 상이한 결과이며, Tribulo 등(1993)이 Folltropin 1회 주사시 15.5개, 8회 점감법은 20.4개로서 점감법이 약간 높게 나타난다고 하였다(Lafri 등, 2002). 그러나 Yamamoto 등(1992)은 1회 FSH+PVP(polyvinyl pyrrolidone)를 투여한 것이 점감법을 이용한 것보다 다소 높은 결과를 보인다고 하여, 1회 주사가 기존의 점감법에 의한 주사 스트레스를 줄일 수 있으므로 더 효과적인 과배란 기법이라고 하였다. 본 시험 결과에서도 1회 주사법인 PEG 투여가 황체의 형성에 있어서 Folltropin V 보다 많았으며, Folltropin V+EB 처리와는 큰 차이를 보이지 않으므로 적절한 과배란 기법임을 확인할 수 있었다.

Table1. Effects of superovulation methods on CL responses in treated Holsteins

Treatments	No. of		CL/cow
	Cows treated	Cows heated	
Folltropin V	8	5	5.8± 4.7[a]
Folltropin V+EB	4	3	20.6± 7.3[b]
Folltropin V+PEG 8,000	4	2	24.0±10.2[b]

* [a,b] in the same column means significantly different($p<0.01$).
* Folltropin V (Vetrepharm, Canada), EB (estradiol benzoate), PEG (poly ethylene glycol).

2. 성선자극 호르몬의 처리방법이 수정란 생산에 미치는 영향

홀스타인을 이용하여 성선자극호르몬의 처리에 따른 수정란의 회수율은 Table 2와 같다. Folltropin V의 단독 처리시에 EB와 PEG 8,000을 병용 처리한 것에 비하여 유의적으로 높은 수정란의 회수율을 보였다. 또한 이식 가능 수정란의 생산에서는 커다란 차이를 보이지는 않았으므로, 여러 번 성선자극호르몬을 투여하는 단독처리에서 보다 한 번만 주사를 하는 PEG 8,000의 연구에도 많은 연구의 가치가 있음을 시사한다. FSH의 투여량에 따른 수정란의 회수율은 Follitropin의 처리에 의한 경우는 투여량이 300mg(Sartori 등, 2003)로서 3.9~5.4개의 생산량을 보여 약간 높은 경향을 보였다. 그 밖에 FSH-P를 투여한 경우는 투여량에 있어서 많은 차이를 보이고 있는데, 임 등(1997)은 28~50 mg을, 김 등(1997a)은 30~32 mg, 그리고 Pawlu-

Table2. Effects of superovulation methods on embryo recovering in Holstein cows

Treatments	No. of			Transferable/ recovered(%)
	Cows treated	Embryos recovered	Transferable embryos/cow	
Folltropin V	8	29	3.6±2.4	99.3
Folltropin V+EB	4	60	3.3±1.8	22.0
Folltropin V+PEG 8,000	4	61	2.8±2.3	18.4

* Folltropin V (Vetrepharm, Canada), EB(estradiol benzoate), PEG(poly ethylene glycol).

shyn 등(1986)은 60 mg 이상을 투여하였을 때 수정란의 회수율이 높다고 하여 과배란처리 기법에 있어서 호르몬의 투여량이 확립되어야 할 필요가 있다고 하겠다. Mapletoft 등(1988)에 의하면, Folltropin의 주사량에 따른 수정란의 회수율은 유의적인 차이가 인정되지 않는다고 하였으며, Walsh 등(1993)은 pFSH로 미경산우에 과배란 처리시 일일 2회 주사가 1회보다 더 효율적인 과배란 기법이라고 하였다. 이와 같이 연구자에 따라 호르몬처리 방법은 다양하며, 기존의 4일 2회 투여/1일은 효율적이라고 하나, 상당히 처리하는 사람이 불편하다. 따라서 호르몬 방출 방법에 대한 연구가 더 절실하다고 하겠으며, 이러한 방법의 발전은 수정란이식 기술의 진보를 더 앞당길 수 있을 것으로 생각된다.

3. 성선자극호르몬 투여방법에 따른 회수 수정란의 분포

성선자극호르몬의 투여방법에 따라 회수된 수정란은 Table 3과 같다. 회수 수정란 중 퇴화된 난자는 Folltropin V+EB의 방법이 가장 많았고, 미수정란의 수는 Folltropin V+PEG 방법이 가장 많이 나타났다. 이와 같은 결과는 Tribulo 등(1993)의 결과와는 상이한 결과였으며, Walsh 등(1993)의 결과와는 유사하였으나, pFSH의 주사량과 공시축이 미경산우인 점이 달라 완전한 비교는 불가능하였다. 연구자들에 따라 사용한 호르몬이 다르고, 대상 공시축도 다르게 사용되어 과배란처리 기법의 우열을 가리기가 어려운 실정이다. 그러나 과배란처리는 호르몬의 사용(Boland 등, 1991), 그에 따른 황체의 반응 그리고 주입 방법(Bo 등, 1991) 등이 크게 영향을 미치므로 가장 단순하고 간편한 처리방법은 시술자나 공란우를 위해서, 다량의 양질의 수정란을 생산하기 위해서는 절대적으로 필요하다. 따라서 PEG 등의 성선자극호르몬의 방출을 조절할 수 있는 물질의 개발과 사용 방법 등의 개발이 요구되며, 지속적인 연구가 수정란이식의 활성화와 농가 젖소의 개량 향상을 위해서 기여할 것으로 생각된다.

적 요

Table 3. Collected embryos by different superovulation methods in Holstein cows

Treatments	No. of				
	Embryos recovered	Embryos degenerated	Embryos unfertilized	Morulae	Blastocysts
Folltropin V	29	1	2	11	15
Folltropin V+EB	60	22	24	3	10
Folltropin V+PEG 8,000	61	16	35	5	5

* Folltropin V (Vetrepharm, Canada), EB (estradiol benzoate), PEG (poly ethylene glycol).

본 연구는 젖소에 있어서 다량의 수정란을 생산하여, 고능력의 유전인자를 조기에 확산할 수 있도록, 젖소에 있어서 PEG를 이용하여 과배란 처리기법 확립을 위해 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 성선자극호르몬의 처리 방법에 따른 황체반응은 Folltropin 단독처리시 5.8%, Folltropin+EB는 20.6%, Folltropin+PEG는 24.0%로 나타났으며, 유의적인 차이를 보였다($p<0.01$).
2. 성선자극호르몬의 처리 방법에 따른 이식 가능 수정란 수에 미치는 영향은 Folltropin V 단독처리시 3.6개, Folltropin +EB 처리시 3.3개, Folltropin +PEG 8,000 처리시 2.8개이었으며, 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p<0.01$).
3. 성선자극호르몬의 처리방법에 따른 퇴행란과 미수정란 Folltropin+EB와 Folltropin+PEG 처리구에서 Folltropin 단독처리보다 많이 회수되었으며, 배반포 수정란의 수에 있어서는 처리간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과는 임의의 발정주기에 CIDR 삽입 후 Folltropin의 1일 2회 4일간의 분할 투여법 뿐만 아니라 Folltropin을 PEG로 용해하여 1회 투여법을 이용한 과배란 처리기법도 젖소 공란우에서 수정란의 생산이 가능함을 보여준다.

참고문헌

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC and Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicl-stimulating hormone and the emergence of follicular wave in heifers. J. Reprod. Fertil., 94:177-188.

Ax RL, Armbrust S, Tappan R, Gilbert G, Oyarzo JN, Bellin ME, Selner D and McCauley TC, 2005. Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifer. Anim. Reprod. Sci., 85:71-80.

Bader JF, Kojima FN, Wehrman ME, Lindsay BR Kerley MS and Patterson DJ. 2005. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. anim. Reprod. Sci., 85: 61-70.

Bo. GA, Hockley D, Tribulo D, Jofre F, Tribulo R, Busso N, Barth AD and Mapletoft RJ. 1991. The effects of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. Theriogenology, 35:186, abstr.

Boland MP, Goulding D and Roche JF. 1991. Alternative gonadotropihins for superovulation in cattle. Theriogenology, 35:5-17.

Greve T, Callesen H, Hyttel R and Assey R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins. Theriogenology, 43:41-50.

Guilbault LA, Grasso F, Lussier JC, Rouillier P and Maton P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of dominant follicle. J. Reprod. Fertil., 9:81-89.

Lafri M, Ponsart C, Nibart M, Durand M, Morel A, Jeanguyot N, Badinant F, De Mari K and Humblot P. 2002. Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. Theriogenology, 58: 1141-1151.

Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, van Soom A and Bols PE. 2004a. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. Anim. Reprod. Sci., 80:201-211.

Leroy JL,Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A and Bols PE. 2004b. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post parum. Theriogenology, 62:1131-1143.

Leroy JLMR, Opsomer G, De Viegher S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PEJ, de Kruif A and von Soom A. 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. Theriogenology, 64: 2002-2036.

Lopez H, Satter LD and Wiltbank MC, 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cow. Anim. Reprod. Sci., 81:209-223.

Lucy MC. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? Dairy Sci., 84:1277-1293.

Mapletoft RJ, Gonzalez A, Lussier JG, Murphy BD and Carruthers TD. 1988. Superovulation of beef heifer with Folltropin or FSH-P. Theriogenology, 29:274, abstr.

Merton JS, De Roos APW, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM and Dielman SJ. 2003 Factors affecting oocytes quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology, 59:553-597.

Morrow DA, Swanson LV and Hafs HD, 1976. Estrous behavior and ovarian activity in prepubertal heifers. Theriogenology, 6:427-435.

Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT Lonergan P and Boland MP. 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifer. Theriogenology, 50:1263-1274.

Opsomer G, Coryn M, Deluyker H and De Kruif A, 1998. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cow after calving based on progesterone profiles. Reprod. Domest. Anim., 33: 193-204.

Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M and Mapletoft RJ. 1986. Superovualtion of beef cows with FSH-P : A dose response trial. Theriogenology, 25:179(Abstr.).

Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ and Wiltbank MC. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. J Dairy Sci., 85:2803-2812.

Sartori R, Suarez-Fernandez CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM and Wiltbank MC, 2003. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. Theriogenology, 60:1319-1330.

Seibel MM, Levesque LA and Taymor ML. 1981. A rapid radioimmunoassay method for serum luteinizing hormone utilizing polyuethylene glycol and a double antibody method of separation. Fert. Steril., 35:36-39.

Tribulo H, Jofre F, Crcedo J, Alonso a, Tribulo R and Bo GA. 1993. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. Theriogenology, 39:331, abstr.

Walsh JH, Mantovani R, Duby RT, Overstrom EW, Dobrinsky JR, Enright WJ, Roche JF and Boland MP. 1993. The effects of once or twice daily injection of pFSH on superovulatory response in heifers. Theriogenology, 40:313-321.

Yamamoto M, Suzuki T, Ooe M, Takagi M and Kawakuchi M. 1992. Efficacy of single vs. multiple injection superovulation regimens of FSH using polyvinylpyrrolidone. Theriogenology, 37:325, abstr.

김흥률, 김덕임, 박노형, 김창근, 정영채, 윤종택, 전광주. 1997a. 한우에서 FSH-P와 super-Ov에 의한 체내수정란 생산에 관한 연구 Ⅱ. 공란우의 조건에 따른 체내수정란 생산에 영향을 미치는 요인. 한국수정란이식학회지, 12:49-56.

임석기, 전기준, 우제석, 장선식, 박준철, 정종원, 윤상보. 1997. 한우에 있어서 FSH-P 투여량과 에너지 수준이 정상수정란의 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 12:301-306.

(접수일: 2005. 10. 27 / 채택일: 2005. 12. 17)