

## 혈액 내 코티졸의 패턴 변화가 발정 암개의 P4 변화와 배란에 미치는 영향

박종주, 김현민, 최미경, 노진구, 염동현, 지주영, 김동교, 김동훈, 박진기, 류재규\*

국립축산과학원 동물바이오통학과

### The Influence of Cortisol Level on Progesterone and Ovulation in the Estrus Dogs

Jong-Ju Park, Hyun-Min Kim, Mi-Kyoung Choi, Jin-Gu No, Dong-Hyeon Yeom, Ju-Young Ji,  
Dong-Kyo Kim, Dong-Hoon Kim, Jin-Ki Park and Jae Gyu Yoo\*

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

#### ABSTRACT

It is generally accepted that chronic stress impairs female reproduction. It negatively affects ovarian function and the number of ovulated oocytes. Chronic stress lowers the number of retrieved oocytes. Ovarian follicular development is regulated by both pituitary-derived gonadotropins and intraovarian regulatory factors. The main corticosteroids are cortisol, cortisone, 11-deoxycortisol and corticosterone, cortisol being one of the most commonly used welfare and stress physiological indicator. In this study, we investigated the effect of cortisol level on progesterone patterns and ovulation in the dog. Cortisol and progesterone level of serum were analyzed by radioimmunoassay. The day of ovulation was considered as the day when serum progesterone concentration was 6.0~8.0 ng/ml. *In vivo* dog oocytes were collected by flushing oviducts of mixed-breed bitches at three days after ovulation. We classified dogs as having group 1 (cortisol level, 0 ≤ or < 2 μg/dl), group 2 (cortisol level, 2 ≤ or < 4 μg/dl), group 3 (cortisol level, 4 ≤ or < 6 μg/dl) and group 4 (cortisol level, 6 μg/dL ≤). The patterns of progesterone were not different in four cortisol groups. The average numbers of retrieved oocytes was not different in four cortisol groups. These results suggest that different cortisol levels on estrus dogs do not affect ovulation, number of ovulated oocytes and progesterone changes.

(Key words : canine oocytes, progesterone, cortisol)

#### 서 론

스트레스(stress)는 혈청이나 타액, 소변 등에서 호르몬 농도를 측정하거나, 신경 전달 물질의 양을 측정하여 나타낼 수 있는데, 그 중에서 코티졸(cortisol)이 스트레스 정도를 나타내는 지표로 인간을 포함한 여러 동물에서 사용된다(McEwen 등, 1997).

사람에서 심리적 우려와 극심한 육체적 활동, 단식과 같은 스트레스는 임신한 여성의 경우, 조산과 저체중아를 낳을 확률을 높이는 위험 요소들이다(Hobel 등, 2003). 예를 들면, 심리적으로 약한 여성은 저체중아를 낳을 위험과 임신기에 우울증으로 조산의 위험이 증가하는 것으로 나타났다(Neggers 등, 2006). 여성의 임신기에 심리적 스트레스는 통계학적, 그리고 특히 행동학적 평가에서 조산과 저체중아 출산과 관련이 있다고 보고하였다(Copper 등, 1996). 또한 심리적 스트레스는 여성이 체외수정이나 나팔관 내 생식세포를 이식할 때 회수되는 난자 수, 수정률, 임신율 그리고 태아의 체중, 태아

의 생존율 또한 감소하는 것으로 알려져 있다(Klonoff-Cohen 등, 2001; Schröder 등, 2004). 그리고 불임여성의 경우, 의심, 죄책감 그리고 적개심 등은 임신된 여성과 비교했을 때 프로락틴(prolactin) 호르몬의 순환과 코티졸 수치가 증가된 것을 확인하였다(Csemiczky 등, 2000; Kee 등, 2000).

스트레스는 종종 임신 전이나 초기 임신기에 많이 발생한다(Hobel 등, 2003). 따라서 스트레스를 예방으로 임신율을 증가시킬 수 있다. 정신적 스트레스를 많이 받는 환경에 있는 여성들은 체외수정을 할 수 있는 기회와 성공률이 낮는데, 그 이유가 난자 회수 때 정신적 스트레스가 난자의 발달이나 배란에 영향을 미쳐 나타나는 결과일지도 모른다(Ebbesen 등, 2009). 그러나 정신적 스트레스가 난자의 발달과 성숙에 직접적으로 영향을 미친다는 보고는 거의 없다(Euker 등, 1973; Zhang 등, 2011). 그러나 동물의 발정기에 코티졸 분비 패턴이 변할 수 있고, 정신적 스트레스에 의한 코티졸의 증가가 번식 과정에서 중요한 시점에 결국 호르몬이 영향을 미칠 수 있다. 하지만 정신적 스트레스가 난자의 능력에 손상을 주는 메

\* Correspondence : E-mail : vetjack@korea.kr

커니즘은 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

따라서 연구에서는 발정 암개에서 코티졸 농도치, 프로게스테론(progesterone) 호르몬 농도치, 황체수, 배란 난자 수, 그리고 배란난자의 성숙상태를 확인하여 코티졸이 배란 전 암개의 프로게스테론과 난자 배란에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시축

본 연구에 사용된 동물관리 및 절차는 국립축산과학원 동물복지위원회의 동물실험계획승인(2013-045)을 얻었으며, 공시축으로 56마리의 암개를 사용하였다. 암개의 발정 상태는 첫 번째로 질 분비물과 외음부를 육안으로 관찰하였고, 혈액을 채취하여 혈청에서 프로게스테론 농도를 분석하여 확인하였다.

### 2. 혈중 프로게스테론과 코티졸 농도 측정

혈액은 발정 암개의 요측피정맥(Cephalic vein)에서 채취하였고, 혈청 분리를 위해서 혈청 분리 튜브(STT tube, BD Vacutainer, U.S.A.)에 넣고, 4°C에 4,000 rpm으로 15분간 원심분리를 실시하였다. 프로게스테론과 코티졸 농도치를 분석하기 위해서 방사면역 분석법(Radioimmunoassay)을 이용하였다.

### 3. 난자 채취

개 배란일은 혈청 내 프로게스테론의 농도가 6~8 ng/ml로 상승했을 때를 간주하였고(Lee 등, 2005), 배란 후 약 72시간 후 개복술(laparotomy)을 통해서 난자를 채취하였다. 마취는 xylazine(1 mg/kg)를 사용하였고, 마취 유지는 2% isoflurane를 사용하였다. 개의 정중선을 절개하여 난관 팽대부에 경구 바늘(Feed needle, 18 gauge, 3 inch)를 삽입하고, 자궁-난관 접합부(uterus-oviduct junction) 부근의 난관에 정맥 카테타(24 gauge)를 삽입한 후 10 ml의 HEPES-buffered Tissue Culture Medium 199(TCM-199, Gibco-BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)을 관류하여 난자를 채취하였다. 관류액 TCM-199에는 10% FBS(Gibco-BRL, U.S.A.), 1% antibiotic-antimycotics 그리고 2 mM sodium carbonate(Sigma, U.S.A.)를 첨가하여 사용하였다. 난자 채취 후 암개의 배란 황체수를 확인하였다.

개의 분류는 배란 예정일 때 코티졸의 수치에 따라 네 분류(Group 1 : 0 ≤ 또는 < 2 µg/dl, Group 2 : 2 ≤ 또는 < 4 µg/dl, Group 3 : 4 ≤ 또는 < 6 µg/dl, Group 4 : 6 µg/dl ≤)로 나뉘었고, 채취된 난자의 상태는 노화된 것, 성숙된 것, 미성숙된 것, 비정상적인 것과 퇴화된 것으로 현미경하에 육안으로 분류하였다. 노화된 난자는 위란강(perivitelline space)이 넓고 난구세포층이 단층이며, 제 1극체(first polar body)의 존재가 명확하지 않다. 미성숙된 난자는 난구세포의 색깔이 성숙란에 비

해 검은색을 띄며, 세포질과 투명대 사이가 밀착되어 있어 위란강이 잘 보이지 않으며, 제 1극체도 없다. 성숙된 난자는 제 1극체가 분명하게 보이며, 세포질과 투명대 사이가 약간 벌어져 있어 위란강이 보인다. 비정상적인 난자는 모양이 주로 타원형이고, 세포막이 울퉁불퉁하게 보인다. 마지막으로 퇴화된 난자는 대부분 세포질이 터져 있다(Arlotto 등, 1996; Armstrong 등, 2001).

### 4. 통계 처리

혈청 코티졸과 프로게스테론의 분석 결과는 Student's *t*-test를 이용하여 비교하였으며, 유의성은  $P < 0.05$  수준에서 검정하였다.

## 결 과

### 1. 코티졸 농도에 따른 프로게스테론의 농도

코티졸 농도별 group간 매일 코티졸의 농도 변화를 비교하였다. Group 1, 2, 3은 배란 날짜에 가까워질수록 코티졸 농도가 감소하는 경향을 보였다. 그러나 코티졸 농도가 가장 높은 Group 4는 배란기와 그 이후로 코티졸 농도가 유의적으로 증가하였다(Fig. 1). 코티졸 농도에 따른 배란 전후의 프로게스테론의 농도를 매일 관찰했을 때, 각기 다른 코티졸 농도 group간의 프로게스테론의 농도는 배란 5일전부터 배란 1일 이후에서 유의적 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

### 2. 코티졸 농도에 따른 황체 수와 난자 수

코티졸 수치가 가장 낮은 Group 1은 11마리에서 평균 11.5개의 황체를 확인하고, 평균 9.1개의 난자를 회수하였다. 그리고 Group 2에서는 19마리에서 평균 11.4개의 황체를 확인하고 평균 8.2개의 난자를 회수하였다. Group 3에서는 14마리에서

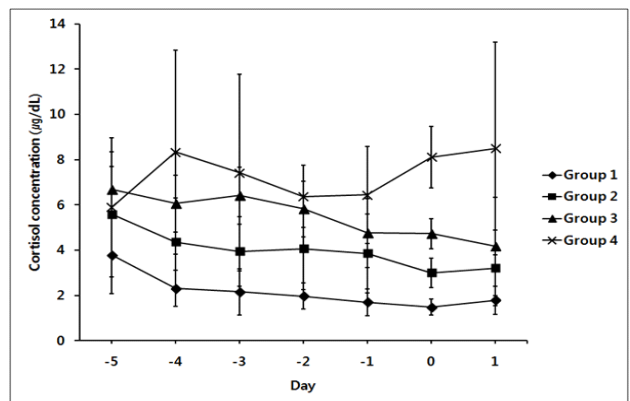


Fig. 1. Cortisol changes of estrus bitches in four different groups. Group 1 : 0 ≤ or < 2 µg/dl, Group 2 : 2 ≤ or < 4 µg/dl, Group 3 : 4 ≤ or < 6 µg/dl, Group 4 : 6 µg/dl ≤.

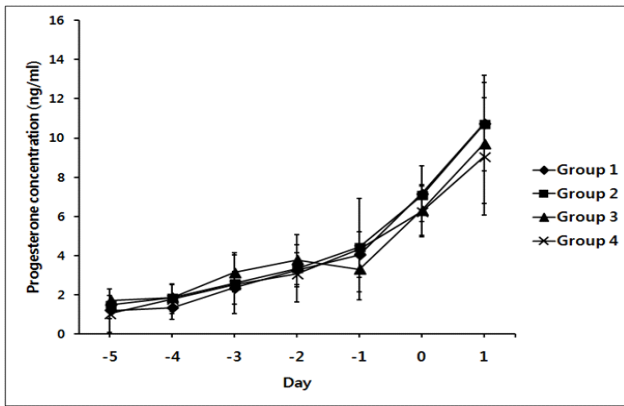


Fig. 2. Progesterone changes of estrus bitches in four different groups. Group 1 : 0 ≤ or < 2 µg/dl, Group 2 : 2 ≤ or < 4 µg/dl, Group 3 : 4 ≤ or < 6 µg/dl, Group 4 : 6 µg/dl ≤.

평균 11.4개의 황체를 확인하고, 평균 9.4개의 난자를 회수하였다. 마지막으로 코티졸 수치가 가장 높은 Group 4는 12마리에서 평균 11.3개의 황체를 확인하고, 평균 9.7개의 난자를 회수하였다. 모든 그룹에서 황체 및 난자 수는 유의적 차이를 보이지 않았다(Table 1).

### 3. 코티졸 농도에 따른 회수난자의 성숙 상태

코티졸 농도에 따라 회수 난자의 성숙 상태를 확인하였다 (Table 2). 난자는 노화, 성숙, 미성숙, 비정상 그리고 퇴화된 것으로 각각 분류하였다. Group 1에서는 노화, 성숙, 미성숙, 비정상, 퇴화 순으로 각각 37%, 50%, 0%, 5%, 8%였고, Group 2에서는 각각 7.7%, 80%, 0.1%, 3.2%, 8.4%로 나타났다. 그리고 Group 3에서는 25.2%, 56.5%, 9.2%, 6.1%, 3.1% 나타났고, Group 4에서는 17.2%, 68.9%, 8.6%, 4.3%, 0.1%로 나타났다. Group 2에서 회수 성숙난자가 124개로 전체 회수 난자의 80%를 차지하였고, 노화된 난자 수 및 비율은 Group 1에서 가장 높았고, 퇴화된 난자는 Group 2에서 가장 높았으며, 미성숙과 비정상적인 난자는 Group 3에서 가장 높았다.

## 고 찰

Table 1. Comparison of corpus luteum and recovered oocytes on different cortisol level in estrus dogs

	No. of dogs	No. of total Corpus Luteum(mean)	No. of total oocytes recovered(mean)
Group 1	11	126(11.5)	100(9.1)
Group 2	19	217(11.4)	155(8.2)
Group 3	14	158(11.4)	131(9.4)
Group 4	12	136(11.3)	116(9.7)

Group 1 : 0 ≤ or < 2 µg/dl, Group 2 : 2 ≤ or < 4 µg/dl, Group 3 : 4 ≤ or < 6 µg/dl, Group 4 : 6 µg/dl ≤.

코티졸은 스트레스 상황에서 분비가 증가하는데, 스트레스 상태를 평가하기 위해 가장 흔히 이용되는 지표 중의 하나이며, 혈청이나 타액에서 측정할 수 있다. 타액은 채취가 용이하지만, 일반적으로 혈청에서 그 농도를 측정한다. 본 실험에서도 보다 정확한 결과 값을 얻고자 혈청에서 측정하였다. 스트레스가 생리 작용에 영향을 미치는 연구는 많이 이루어지지 않았다. 난소의 발달과 배란된 난자 수 그리고 임신율에 대한 연구는 약간의 진척이 있으나, 난자의 상태에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 최근에 암컷 생쥐에 정신적 스트레스를 인위적으로 가하고, 난자의 발달 상태를 확인한 연구를 하였다. 이 연구에서 스트레스를 받은 생쥐는 혈액 내 코티졸 농도가 증가하는 것을 확인하였고, 배 발달에 좋지 않은 영향을 미친다. 또한 산자 수도 줄어들었다고 보고하였다(Zhang 등, 2011; Liu 등, 2012). 이러한 보고에서 스트레스는 뇌하수체 전엽에 영향을 미치고, FSH의 분비에 영향을 주어 배란된 난자 수와 난자의 상태에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

본 실험에서 코티졸 농도가 가장 높은 Group 4에서 배란기와 그 이후 코티졸 농도가 증가하는 것을 보였다(Fig. 1). 따라서 극심한 스트레스를 받은 Group 4는 그 지속시간 또한 상대적으로 스트레스가 덜한 Group 1, 2, 3 과 비교했을 때 더 오랫동안 지속될 것으로 사료된다. 결과는 코티졸 농도가 가장 높은 Group과 낮은 Group간의 배란된 난자 수는 유의적 차이를 보이지 않았다. 이는 육안적 판단에 의한 오류일 수도 있

Table 2. Comparison of retrieved oocyte maturation status on different cortisol level in estrus dogs

Cortisol level(µg/dl)	No. of total oocytes(mean)	No. of retrieved oocytes			
		Aged(%)	Matured(%)	Immatured(%)	Abnormal(%)
0 ≤ or < 2	100(8.5)	37(37.0)	50(50)	0(0)	13(13)
2 ≤ or < 4	155(8.2)	12( 7.7)	124(80)	1(0.1)	18(11.6)
4 ≤ or < 6	131(8.3)	33(25.2)	74(56.5)	12(9.2)	12( 9.2)
6 ≤	116(9.5)	20(17.2)	80(68.9)	10(8.6)	6( 5.2)

고, 스트레스가 배 발달과 임신기에 특히 영향을 미칠지도 모른다. 그리고 개라는 종 특이성도 관여할지 모른다. 개는 인간, 소, 돼지, 생쥐 등과 달리 발정동기화와 과배란 유도에 많은 어려움이 따른다. 그 기전 또한 아직까지 밝혀지지 않고 있다. 본 실험에서는 육안으로 난자의 성숙 상태를 확인하고 평가하였으나, 향후 코티졸 농도치에 따른 난소와 난관의 호르몬 수용체와 난자의 질적인 상태를 분석 할 필요가 있다고 사료된다.

## 결 론

만성적 스트레스는 암컷의 번식에 좋지 않은 영향을 미친다. 난소의 기능에 영향을 미쳐 난자 수를 감소시킨다. 그리고 회수되는 난자의 수도 감소시킨다. 난소 내의 난포는 너허수체에서 분비되는 성선자극호르몬과 난소에 존재하는 조절인자들에 의해 발달한다. Corticosteroid 호르몬은 cortisol, cortisone, 11-deoxycortisol과 corticosterone이 있고, 이 중에서 cortisol이 정신적 행복과 스트레스의 지표로 가장 많이 이용된다. 본 연구에서는 개에서는 코티졸 농도에 따른 프로게스테론과 배란된 난자 수와 난자의 성숙상태를 확인하였다. 채취된 혈액에서 배란의 시점을 알기 위한 코티졸과 프로게스테론 농도치를 방사면역 분석법으로 측정하였다. 성숙된 난자는 배란 후 3일째 잡종견의 난관에서 관류하여 채취하였다. 본 연구에서는 코티졸 농도치에 따라 4개의 Group(Group 1 :  $0 \leq$  or  $< 2 \mu\text{g/dl}$ , group 2 :  $2 \leq$  or  $< 4 \mu\text{g/dl}$ , group 3 :  $4 \leq$  or  $< 6 \mu\text{g/dl}$ , group 4 :  $< 6 \mu\text{g/dl}$ )으로 분류하였다. 모든 Group에서 프로게스테론의 변화양상은 유의적 차이를 보이지 않았고 채취된 난자 수 또한 모든 group에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 본 실험 결과를 바탕으로 발정기 암컷의 코티졸의 차이는 배란, 배란 난자 수 그리고 프로게스테론의 변화에 영향을 주지 않음을 확인하였다. 하지만 코티졸과 난자의 질적 수준과의 상관관계 연구는 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 논 문

- Arlotto T, Schwartz JL, First NL and Leibfried ML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 943-956.
- Yamamoto T, Iwata H, Goto H, Shiratuki S, Tanaka H, Monji Y and Kuwayama T. 2010. Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 595-604.
- Copper RL, Goldenberg RL, Das A, Elder N, Swain M, Norman G, Ramsey R, Cotroneo P, Collins BA, Johnson F, Jones P and Meier AM. 1996. The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than 35 weeks' gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 1286-1292.
- Csemiczky G, Landgren BM and Collins A. 2000. The influence of stress and state anxiety on the outcome of IVF treatment: psychological and endocrinological assessment of Swedish women entering IVF treatment. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 79: 113-118.
- Ebbesen SM, Zachariae R, Mehlsen MY, Thomsen D, Højgaard A, Ottosen L, Petersen T and Ingerslev HJ. 2009. Stressful life events are associated with a poor *in-vitro* fertilization (IVF) outcome: a prospective study. *Hum. Reprod.* 24: 2173-2182.
- Euker JS and Riegler GD. 1973. Effects of stress on pregnancy in the rat. *J. Reprod. Fertil.* 34: 343-346.
- Hobel C and Culhane J. 2003. Role of psychosocial and nutritional stress on poor pregnancy outcome. *J. Nutr.* 133: 1709S-1717S.
- Kee BS, Jung BJ and Lee SH. 2000. A study on psychological strain in IVF patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17: 445-448.
- Klonoff-Cohen H, Chu E, Natarajan L and Sieber W. 2001. A prospective study of stress among women undergoing *in vitro* fertilization or gamete intrafallopian transfer. *Fertil. Steril.* 76: 675-687.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G and Hwang WS. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436: 641.
- McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambes WH, Shabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL and Weiss JM. 1997. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interactions, *Brain Research Review* 23: 79-133.
- Negggers Y, Goldenberg R, Cliver S and Hauth J. 2006. The relationship between psychosocial profile, health practices, and pregnancy outcomes. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 85: 277-285.
- Schröder AK, Katalinic A, Diedrich K and Ludwig M. 2004. Cumulative pregnancy rates and drop-out rates in a German IVF programme: 4102 cycles in 2130 patients. *Reprod. Biomed. Online* 8: 600-606.
- Zhang SY, Wang JZ, Li JJ, Wei DL, Sui HS, Zhang ZH, Zhou

P and Tan JH. 2011. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. *Biol. Reprod.* 84: 672-681.

---

(접수: 2013. 08. 21/ 심사: 2013. 08. 24/ 채택: 2013. 09. 16)