

在來山羊의 繁殖期에 있어서 血中 Steroid Hormone 水準 變化에 關한 研究

I. 發情週期中의 血中 Progesterone 및 20α -Dihydroprogesterone 水準 變化

閔觀植·張奎泰·吳錫斗*·成煥厚·李炳五·尹昌鉉

慶尙大學校 農科大學

Studies on the Changes of Steroid Hormone Levels during the Reproductive Stage in Korean Native Goats

I. Progesterone and 20α -Dihydroprogesterone Levels in Serum During the Estrous Cycle

Min, K.S., K.T. Chang, S.D. Oh*, H.H. Seong, B.O. Lee and C.H. Yun
College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

The study was conducted to find out the changes of progesterone and 20α -dihydroprogesterone (20α -OHP) levels during the oestrous cycle in Korean native goats. 4 cyclic goats were offered for this experiment. Blood samples were taken from jugular vein on day 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 and 19 during the oestrous cycle, then the next oestrous day. The serum levels of progesterone and 20α -OHP were measured by radioimmunoassay.

The progesterone concentration in serum of the cyclic goats was 0.29 ± 0.06 ng/ml on the first day of oestrous (day 0), increased to 5.29 ± 0.73 ng/ml on day 9, reached to a peak level of 5.73 ± 0.61 ng/ml on day 13, and thereafter decreased to 0.35 ± 0.03 ng/ml on day 1. The serum level of 20α -OHP during the oestrous cycle was 0.42 ± 0.03 ng/ml on day 0 and then decreased to 0.28 ± 0.01 ng/ml on day 5. This basal level was maintained until day 13, increased gradually, and reached a peak level of 0.62 ± 0.05 ng/ml on day 19.

From the above results, it was suggested that the enzyme 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (20α -HSD) catalyzing the conversion of progesterone to a biologically inactive steroid, 20α -OHP, should be active in the luteal cells during the oestrous cycle in Korean native goats.

(Key words : progesterone, 20α -OHP, Oestrous cycle)

I. 緒 論

家畜에 있어서 發情週期中의 內分泌學的 變化에 關한

情報은 繁殖效率의 改善을 위한 각종 研究의 基礎 資料로서 매우 중요하며, 家畜의 繁殖生理현상을 究明코자 血中 性 hormone의 水準 및 性 hormone의 支配機

* 晋州農林專門大學 (Chinju National Agricultural and Forestry Junior College)

轉의 解明에 관한 研究가 활발하게 進行되고 있다.

山羊에 있어서 發情週期中의 血中 progesterone 水準變化를 보면, Linzell 와 Heap(1968), Thorburn 과 Schneider(1972), Wentzel(1979), Chimineau 등(1982) 및 Bono 등(1983)은 血中과 卵巢中에서 發情期에는 0.02~0.8ng/ml 으로 낮은 水準이나, 그후 增加하여 黃體期에는 最高水準에 이른다고 하였으며, 黃體退行期에는 急減하여 낮은 水準이라고 보고하였다.

在來山羊에 있어서는 宋 등(1984)은 發情開始日에는 0.02ng/ml 以下였으며, 그후 增加하여 6일에는 4.46 ng/ml, 14일에는 最高水準인 8.98ng/ml 에 달하였고, 16일 즉, 다음 發情開始日의 4일전에는 減少하기 시작하여 다음 發情開始日에는 0.02ng/ml 以下の 水準이라고 하였다. 丁 등(1984)도 發情後 13일에 最高水準인 5.98ng/ml 이었으나, 그 후 減少하여 19일에는 0.27ng/ml 으로 낮은 水準이라고 하였다.

한편, 發情週期中의 20α -OHP 水準變化에 관하여는 흰쥐에서 Wiest(1959)는 發情前期에 $29.2\mu\text{g/ml}$ 으로 가장 높았고, 發情期에는 $17.2\mu\text{g/ml}$ 으로 감소하여 發情後期 1일에는 $15.8\mu\text{g/ml}$ 으로 낮았다고 하였다. Flint 와 Armstrong(1973)도 흰쥐의 黃體退行期에 子宮筋組織에서는 20α -dihydroprogesterone (20α -OHP) 水準이 增加되는데 이러한 원인은 20α -hydroxysteroid dehydrogenase(20α -HSD)의 活性이 크게 增加되어 progesterone 이 生物學的으로 不活性인 20α -OHP로 代謝되어진 結果라고 하였다. Davies 와 Ryan(1972)은 progesterone 과 20α -OHP 水準 및 20α -HSD 活性에 관하여 보고하였으나, 山羊에 있어서 20α -OHP 水準變化에 관한 研究報告는 아직 없었다.

따라서, 本 研究는 在來山羊의 發情週期中에 progesterone 과 20α -OHP 水準變化를 測定함으로써 卵巢의 黃體 細胞內 progesterone 을 生物學的으로 不活性인 20α -OHP로 代謝시키는 20α -HSD의 活性與否를 檢査하기 위하여 수행하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物 및 飼養管理

本 試驗에 사용된 供試動物은 韓國在來 山羊으로 正

常的으로 發情週기를 나타낸 4頭를 供試하였으며, 飼養管理는 一般慣行法에 따라 飼育하고 食鹽 및 물은 自由攝取토록 하였다.

2. 試驗期間 및 場所

試驗期間은 1991. 4. 1~1991. 8. 30일까지 慶尙大學校 農科大學 附屬動物 飼育場과 酪農學과 家畜繁殖學 教室에서 실시하였다.

3. 試驗方法

1) 發情 確認

發情週기를 위하여 供試된 牝山羊은 정상적으로 20日의 發情週기를 나타낸 것으로, 發情을 確認하기 위해 健康한 牝山羊을 試精牝山羊으로 매일 2回(09:00, 17:00時) 交尾의 許容與否를 觀察하고 發情徵候를 나타낸 개체를 發情週기의 初日로 算定하였다.

2) 血液採取 및 血清分離

發情週期中의 steroid hormone 水準變化를 測定하기 위한 血液은 發情初日(0)과 發情後 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 및 19일과 다음 發情日 12:00時에 頸靜脈으로부터 각각 10ml 씩 採取하였다. 採取한 血液은 4°C에서 12時間 保存한 다음 1,000×g 15分間 遠心分離하여 얻은 血清을 分析時까지 -20°C에서 冷凍保存하였다.

3) Hormone 분석방법

血清內 hormone 분석을 위한 radioimmunoassay는 Takahashi 등(1980)과 Matsuyama 등(1987)의 方法에 準하여 Fig. 1의 flow sheet와 같은 과정에 따라 실시하였다.

즉, 血清 1ml를 추출관에 넣고 特級 diethylether (Junsei Chemical Co., Ltd.) 2ml 添加하여 vortex mixer로 세차게 攪拌한 후 -20°C에서 12시간 이상 凍結하여 血清을 얼린 후 凍結되지 않은 ether層을 glass tube에 모아 2回 抽出하여 N_2 gas로 蒸發乾燥시켰다. 이들 glass tube에 4°C의 acetone을 1ml 씩 분주하고, 抽出效率 檢査時 反復測定을 위하여 progesterone 100 μ l 및 20α -OHP 50 μ l를 각각 2개의 시험관에 나누고 total은 buffer 800 μ l+ 3 H 100 μ l, blank는 buffer 600 μ l+ 3 H 100 μ l, bound는 buffer 500 μ l+抗體 100 μ l+ 3 H 100 μ l를 각각 분주하고 vortex mixer 후 4°C에서 12시간 이상 incubate

- 1) Sample extract with diethylether at least 2 times.
- 2) Dilution of samples with acetone at 4°C.
- 3) Add assay buffer 0.5ml, hot solution 0.1ml and antibody solution 0.1ml to each tube (except "total" & "blank").
 - * for "total" add assay buffer 0.8ml, hot solution 0.1ml.
 - * for "blank" add assay buffer 0.6ml, hot solution 0.1ml.
- 4) Incubate for 12h at 4°C.
- 5) Add charcoal solution 0.2ml to each tube except "total" and incubate for 10min at 4°C.
- 6) Centrifuge at 4°C, 3,000 rpm and for 15min.
- 7) Collect supernatant.
- 8) Add scintillation cocktail 3ml to each vial.
- 9) Count and calculate.

Fig. 1. Flow sheet of progesterone and 20 α -OHP radioimmunoassay.

하고 total 을 제외한 전 glass tube 에 4°C 에 保管中인 charcoal suspension 을 2ml 添加하여 vortex mixer 한 後 15분간 放置한 다음 4°C 의 冷凍 遠心分離機에서 1,000×g 로 15분간 遠心分離하여 沈澱시키고, 上層을 scintillation vial 에 옮겨 각 sample vial 에 scintillation cocktail 을 3ml 添加하여 混合하였으며, 室溫에서 10시간 이상 靜置시킨 다음 liquid scintillation system(model, LSC-3500, ALOKA, Co. LTD, Japan)으로 測定하였다. 이와 같은 方法으로 standard 및 試料에서의 % bound 를 구하고 standard curve 와 비교하여 血中 progesterone 및 20 α -OHP 濃度를 계산하였다.

III. 結果 및 考察

1. 發情週期中의 血中 progesterone 水準變化

發情週期中의 血清內 progesterone 水準變化는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 發情日에는 0.29±0.06 ng/ml 으로 最低水準을 나타냈으며, 發情後 1일에도 0.54±0.08ng/ml 으로 낮은 水準이었다. 3일에는 1.25±0.14ng/ml 으로 增加하기 시작하여, 5일과 7일에는 2.57±0.27ng/ml 및 4.18±0.39ng/ml 으로 增加하였으며, 9일에는 5.29±0.73ng/ml 으로 더욱 增加하였다. 11일에는 5.18±0.54ng/ml 으로 약간 減少하였으며, 13일에는 5.73±0.61ng/ml 으로 最高水準에 달하였으며, 15일에는 4.81±0.54ng/ml 으로 減少하

기 시작하여 17일에는 3.02±0.35ng/ml 으로 19일에는 1.75±0.18ng/ml 으로 急減하여 낮은 수준을 나타냈으며, 다음 發情開始日에는 0.35±0.03ng/ml 으로 처음 發情開始日과 비슷한 水準이었다.

이와 같은 결과는 山羊에서 Thorburn 과 Schneider(1972)는 黃體期에 3.8ng/ml 수준이고, De Montigny 등(1982)은 10ng/ml 내외이며, Jones 와 Knifton(1971)은 發情週期 10일과 12일 사이에 5.7~8.9ng/ml, Ott 등(1980)은 13일에 8.0ng/ml, 宋 등(1984)은 14일에 8.9ng/ml 으로 黃體期에는 높은 水準이었다고 한 보고와 대체로 一致하는 傾向이었다.

또한, 緬羊에서도 Thorburn 등(1969), Thorburn 과 Mattner(1971)는 黃體期에 높은 水準이라고 하였고, Foster 등(1975)은 黃體中期인 7~12일에 2~4 ng/ml, Hill 과 Alliston(1981)도 7~13일에 progesterone 水準이 높게 나타난다고 보고한 결과와도 本試驗에서 黃體期에 높은 수준이었던 결과와 一致하는 傾向이었다.

本試驗의 發情前後에 있어서 progesterone 은 낮은 水準으로 發情日에 最低水準을 보였는데 이와 같은 결과는 山羊에 Thorburn 과 Schneider(1972), Ott 등(1980), 宋 등(1984)은 發情前 2일 및 1일에 각각 1.8ng/ml 및 0.5ng/ml 으로 減少하여 發情時에 0.1~0.2ng/ml 의 낮은 수준으로 發情前後의 progesterone 水準이 낮아진다는 보고와 一致하는 傾向이었다.

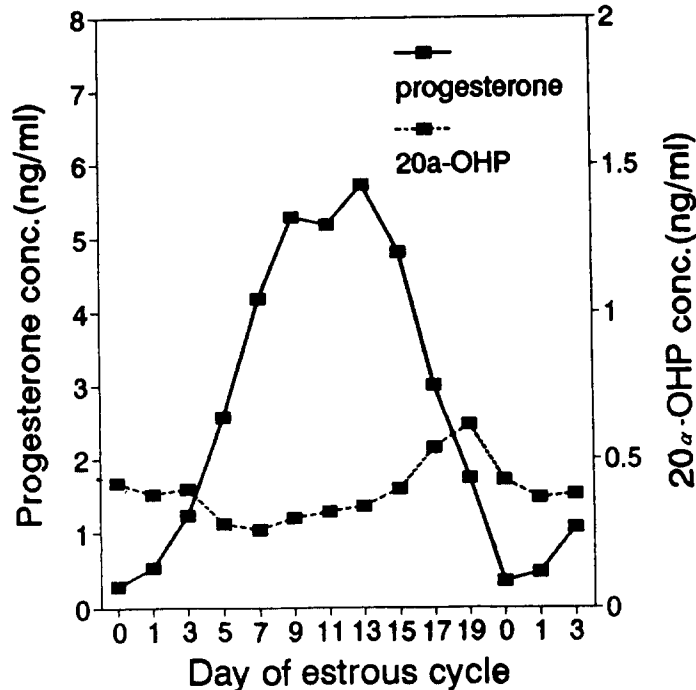


Fig. 2. Serum levels of progesterone and 20 α -dihydroprogesterone during the estrous cycle in Korean native goats(day 0 : day of estrus).

發情週期中의 progesterone 수준은 發情前期에 낮은 수준이었으나, 發情後 3일부터急增하여 黃體期에 높은 수준을 나타내며 發情後 13일에 最高水準에 도달하게 되고, 그 後 다음 發情時까지 점차적으로 감소하는데, 이와 같이 黃體退行期에 progesterone 수준이 낮아지는 것은 山羊과 (Cooke와 Homeida, 1982, 1983), 牛(Peter 등, 1989)에서 黃體退行時 子宮에서 PGF₂ α 의 代謝物質인 13, 14-dihydro-15-ketoprostaglandin F₂ α (PGFM)의 分泌增加로 인하여 黃體가 退行되어 progesterone 수준이 낮아진다고 보고하였으며, Flint와 Armstrong(1973)은 흰쥐에서 黃體退行時 progesterone 수준이 減少되는 것은 子宮筋組織에서 20 α -HSD 活性이 크게 增加되어 progesterone이 20 α -OHP로 代謝되어지기 때문이라고 하였다.

따라서, 發情後期에 progesterone 수준이 낮아지는 것은 子宮內의 PGFM의 分泌增加로 PGF₂ α 가 黃體를 退行시키기 때문이라고 思料된다.

2. 發情週期中의 血中 20 α -OHP 水準變化

發情期中의 血清內 20 α -OHP 水準變化는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 發情日에는 0.42 \pm 0.03ng/ml의 수준이었으며, 發情後 1일과 3일에는 0.38 \pm 0.02 및 0.40 \pm 0.04ng/ml로 發情日과 거의 같은 수준이었으나, 5일과 7일에는 0.28 \pm 0.01 및 0.26 \pm 0.02ng/ml로 減少하였다. 發情後 9일부터 서서히 증가하기 시작하여 11, 13 및 15일에는 0.32 \pm 0.03, 0.34 \pm 0.04 및 0.40 \pm 0.30ng/ml 수준으로 增加하였고, 17일에는 더욱 큰 幅으로 增加하여 0.54 \pm 0.05ng/ml 수준이었으며, 19일에는 0.62 \pm 0.05ng/ml로 最高水準에 달하였다.

山羊에 있어서 發情週期中에 20 α -OHP 水準變化에 관한 보고는 거의 없는 실정이지만, 이와 같은 결과는 Bedford 등(1972)이 緬羊의 發情週期中에 progesterone을 계속하여 주입하면 20 α -OHP의 分泌는 發情週期の 6일에 13.8%, 7일에 11.08%, 12일에 8.

7%로 發情後12일에 最低値를 나타낸다고 한 보고와, Seamark 등(1974)이 發情週期中의 緬羊卵胞를 *in vitro* 실험한 결과 發情日의 卵胞를 7일간 培養하면 20 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one(20 α -OHP)의 수준이 최고라 하여 發情日에 20 α -OHP 水準이 가장 높고 發情後期에도 높은 水準일 것이라고 한 보고와 대체로 一致하는 경향이였다. 또한, 흰쥐에서는 Wiest(1959)와 Ichikawa 등(1974)은 卵巢靜脈에서 20 α -OHP 水準은 發情前期에 증가하고 發情後期에 낮아지며 發情休止期에 增加한다고 하였고, Lu와 Judd(1982)도 흰쥐에서 發情日의 20 α -OHP 수준이 가장 높고 점차 減少하여 다음 發情日에 最大水準이 된다고 한 보고와 一致하는 경향이였다.

發情週期中의 血中 20 α -OHP 수준은 發情前期에 약간 높은 수준이었고, 黃體期에는 낮은 水準을 나타내다가 黃體退行期인 發情後 15일부터 크게 증가하여 發情後 19일에 最高水準이었는데, 이와 같이 黃體退行인 發情後期에 20 α -OHP 水準이 增加하는 이유를 Hashimoto와 Wiest(1969)는 흰쥐에서 이전에 형성된 黃體에서 progesterone이 20 α -OHP로 代謝된 결과라고 하였고, Seamark 등(1974)도 緬羊 *in vitro* 실험에서 progesterone 및 20 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one이 granulosa cells을 培養하면 分泌된다고 하였으며, 또한 Flint와 Armstrong(1973)은 흰쥐의 黃體退行期에 子宮筋組織에서 20 α -HSD 活性이 크게 증가되어 progesterone이 20 α -OHP로 代謝되어 黃體退行期에 20 α -OHP 水準이 증가된다고 하였다.

以上的 結果로 보아, 本 試驗의 在來山羊에서도 發情週期の 後期 즉, 黃體退行期에 20 α -OHP 수준이 增加되는 것은 卵巢에 存在하는 20 α -HSD의 활성화로 인하여 progesterone이 生物學的으로 不活性인 20 α -OHP로 代謝된 結果라고 思料된다.

IV. 摘 要

本 試驗은 韓國在來山羊에 있어서 發情週期中의 血中 progesterone과 20 α -OHP 水準變化를 測定하고자 경산의 在來山羊 4頭를 供試하였다. 血液은 發情週期の 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 및 19일과 다음 發情日에 頸靜脈으로부터 採取하였으며, 血清內

progesterone과 20 α -OHP 水準 變化를 RIA法으로 分析한 結果는 다음과 같다.

發情週期中의 progesterone 水準 變化는 發情日에는 0.29 \pm 0.06ng/ml으로 낮은 水準이었으며, 9일에는 5.29 \pm 0.73ng/ml으로 增加하여, 13일에는 5.73 \pm 0.61ng/ml으로 最高水準에 到達하였고, 그 후 다음 發情開始日에는 0.35 \pm 0.03ng/ml으로 낮은 水準이었다. 發情週期中의 20 α -OHP 水準變化는 發情日에 0.42 \pm 0.03ng/ml으로 약간 높았고, 5일에는 0.28 \pm 0.01ng/ml으로 減少하여 13일까지 큰 변화가 없었으며, 그 후 점차 增加하여 19일에 0.62 \pm 0.05ng/ml으로 最高水準이었다.

以上的 結果로 보아, 在來山羊의 發情週期에 progesterone을 生物學的으로 不活性인 20 α -OHP로 代謝시키는 20 α -HSD가 卵巢의 黃體細胞에서 活性이 있는 것으로 思料된다.

V. 引用文獻

1. Bedford, C.A., F.A. Harrison and R.B. Heap. 1972. The metabolic clearance rate and production rate of progesterone and the conversion of progesterone to 20 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one in the sheep. J. Endocrinol., 55: 105-118.
2. Bono, G., F. Cairoli, C. Tamanini and L. Abrate. 1983. Progesterone, estrogen, LH, FSH and PRL concentrations in plasma during the estrus cycle in goat. Reprod. Nutr. Devel., 23: 217-222.
3. Chimineau, P., O. Gauthier, J.C. Poirier and J. Saumande. 1982. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. Theriogenology, 17: 313-323.
4. Cooke, R.G and A.M. Homeida. 1982. Plasma concentrations of 13, 14, dihydro-15-keto-prostaglandin F₂ α and progesterone during oxytocin-induced oestrus in the goat.

- Theriogenology, 18: 453-460.
5. Cooke, R.G. and A.M. Homedia. 1983. Prevention of the luteolytic action of oxytocin in the goat by inhibition of prostaglandin synthesis. *Theriogenology*, 20: 363-365.
 6. Davies, I.J. and K.J. Ryan. 1972. The uptake of progesterone by the uterus of the pregnant rat *in vivo* and its relationship to cytoplasmic progesterone-binding protein. *Endocrinology*, 90: 507-512.
 7. De Montigny, G., P. Millerioux, N. Jeanguyot, P. Humblot and M. Thibier. 1982. Milk fat progesterone concentration in goats and early pregnancy diagnosis. *Theriogenology*, 17: 423-431.
 8. Flint, A.P.F. and D.T. Armstrong. 1973. The appearance of an endometrial 20α -hydroxy steroid dehydrogenase toward the end of pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 92: 624-629.
 9. Foster, D.L., J.A. Lemons, R.B. Jaffe and G.D. Niswender. 1975. Sequential patterns of circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in female sheep from early postnatal life through the first estrous cycles. *Endocrinology*, 97: 985-994.
 10. Hashimoto, I. and W.G. Wiest. 1969. Correlation of the secretion of ovarian steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat. *Endocrinology*, 84: 873-885.
 11. Hill, T.G. and C.W. Alliston. 1981. Effects of thermal stress on plasma concentration of luteinizing, progesterone, prolactin and testosterone in the cycling ewe. *Theriogenology*, 15: 201-209.
 12. Ichikawa, S., T. Sawada, Y. Nakamura and H. Morioka. 1974. Ovarian secretion of pregnane compounds during the estrus cycle and pregnancy in rats. *Endocrinology* 94: 1615-1620.
 13. Jones, D.E. and A. Knifton. 1972. Progesterone concentration in the peripheral plasma of goats during the oestrus cycle. *Res. Vet. Sci.*, 13: 193-195.
 14. Linzell, J.L. and R.B. Heap. 1968. A comparison of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat: sources of production and an estimation of uptake by some target organs. *J. Endocrinol.*, 41: 433-438.
 15. Lu, J.K.H. and H.L. Judd. 1982. Silastic implants of progesterone produce high circulating levels of both progesterone and 20α -hydroxyprogesterone in ovariectomized, adrenalectomized rats. *Biol. Reprod.*, 26: 385-390.
 16. Matsuyama, S., M. Ohta and M. Takahashi. 1987. The critical period in which splenectomy causes functional disorder of the ovary in adult rats. *Endocr. Japon.*, 34: 849-855.
 17. Ott, R.S., D.R. Nelson and J.E. Hixon. 1980. Peripheral serum progesterone and luteinizing hormone concentrations of goats during synchronization of estrus and ovulation with prostaglandin $F_2\alpha$. *Am. J. Vet. Res.*, 41(9): 1432-1434.
 18. Peter, A.T., W.T.K. Bosu, R.M. Liptrap and E. Cummings. 1989. Temporal changes in serum prostaglandin $F_2\alpha$ and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. *Theriogenology*, 32: 277-284.
 19. Seamark, R.F., R.M. Moor and J.E.A. McIntosh. 1974. Steroid hormone production by sheep ovarian follicles cultured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 41: 143-158.
 20. Takahashi, M., N. Murakami, H. Naito

- and Y. Suzuki. 1980. Blockade of pseudo pregnancy in the rat by treatment with antiprogestosterone serum. *Biol. Reprod.*, 22: 423-429.
21. Thorburn, G.D., J.M. Bassett and I.D. Smith. 1969. Progesterone concentration in the peripheral plasma of sheep during the oestrus cycle. *J. Endocrinol.*, 45: 459-469.
 22. Thorburn, G.D. and P.E. Mattner. 1971. Anastomosis of the utero-ovarian and anterior mammary veins for collection of utero-ovarian venous blood: progesterone secretion rates in cyclic ewes. *J. Endocrinol.*, 50: 307-320.
 23. Thorburn, G.D. and W. Schneider. 1972. The progesterone concentration in the plasma of the goat during the oestrus cycle and pregnancy. *J. Endocrinol.*, 52: 23-36.
 24. Wentzel, D., L.J.J. Botha and K.S. Viljoen. 1979. Progesterone levels in the peripheral plasma of the cycling Angora goat doe. *Agroanimalia*, 11: 27-28.
 25. Wiest, W.G. 1959. Conversion of progesterone to 4-pregnen-20 α -ol-3-one by rat ovarian tissue *in vitro*. *J. of Biolo. Chem.*, 234: 3115-3121.
 26. 宋又準·朴忠生·崔尙龍. 1984. 在來山羊의 發情週期中 血清 progesterone 및 estradiol-17 β 水準의 變化. *韓畜誌*, 26: 534-540.
 27. 丁永浩·鄭英彩·金昌根·李根常. 1984. 韓國在來牝山羊의 繁殖過程에 따른 血清內 progesterone 과 estradiol-17 β 水準變化에 關한 研究. *韓國家畜繁殖研究會誌*, 8(2): 100-109.