

비장적출이 임신 Rat의 Progesterone농도에 미치는 영향

이병오 · 정원철 · 오석두 · 성환후* · 윤창현

경상대학교 농과대학

Effect of Splenectomy on the Progesterone Concentration according to Gestation Periods in Rats

Lee, B. O., W. C. Jung, S. D. Oh, H. H. Seong and C. H. Yun

College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

The effect of splenectomy on the concentration of progesterone in pregnant wistar rats showing 4-day regular estruous cycles more than two cycles were investigated. The day after mating with the same male animal was designated day 0 of pregnancy. Splenectomy was conducted on day 0 (early-S), 6 (middle-S) and 13 (late-S) of pregnant rat, respectively. Blood sample were collected at day 1, 7, 14 and 21 of pregnancy. Concentration of serum progesterone was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using specific antibodies and enzyme conjugate(progesterone peroxidase labeled). In normal pregnant rats, serum progesterone concentrations were increased significantly ($P < 0.05$) on day 7 and 14 of pregnancy compared with on day 1 of pregnancy and then dramatically decreased on day 21. However, in early and middle splenectomized rats, progesterone concentrations were significantly ($P < 0.05$) decreased on day 7 and 14 of pregnancy compared with same day of normal rats. These observations indicate that luteotropic action and steroidogenesis by corpus luteum of ovary may be regulated by splenocytes in rat.

I. 서 론

비장은 순환계의 일종으로 혈액성분의 여과작용을 가지며 노화 및 병적인 적혈구의 제거와 혈구 특히 적혈구 및 림프구의 저장소인 동시에 혈중에서 생성된 항원에 대한 면역방어의 역할을 담당하고 있다. 따라서 비장은 정상적인 혈액상의 구성성분을 형성하는데 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Takahashi, 1984).

비장에 관련된 연구는 혈액상에 있어서 Torton과 Schalm(1964), Kenneth emd(1989)이 보고하였

으며, 면역학적인 측면에서는 임(1990)이 rat를 이용한 보고가 있다. 특히, rat에 있어서는 배란 후 황체가 형성되는 특정시기에만 비장세포에서 유도된 macrophage가 신생 황체내에 침입하여 황체의 기능적 퇴행을 촉진하여 황체의 기능에 중요한 역할을 하며, 황체의 기능 유지뿐만 아니라 형태적 퇴행에도 중요한 기능을 담당하고 있는 것으로 보고되었다(Matsuyama 등, 1990). 또한, 임신말기의 비장적출이 정상 임신우의 분만기간에 비해 분만 지연현상이 나타나 비장이 정상적인 분만유기에도 관여하고 있다고 추측된다(정 등, 1994).

이러한 보고는 임신전기간 중에 정상적인 임신울 유

* 축산기술연구소(National Animal Research Institute)

지하기 위해서는 비장에서 합성된 면역계 물질이 황체 형성시에 침입하여 황체세포의 기능을 활성화 하거나 자궁내 환경을 조절하여 수정란의 착상, 임신유지 및 분만의 시기 결정 등의 중요한 내분비적 환경을 제어하는 데 기여할 가능성이 극히 높은 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구는 임신 rat에 있어서 비장적출이 난소내 황체세포의 혈중 progesterone분비에 미치는 영향을 검토하여 임신유지와 비장과의 관련성을 구명해 보기 위해 rat를 이용하여 임신초기, 중기 및 말기에 각각 비장을 적출하여 임신경과에 따른 progesterone 농도를 측정하여 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

경상대학교 부속동물사육장에서 사육중인 Wistar 계 성숙 암컷 중 정상적인 성주기가 2회 이상 반복되는 미경산개체를 선발하여 총 32마리를 공시하였다. 사육관리는 일반적인 관행법(조명:14시간, 물과 사료:자유공급, 온도:20~24℃)에 따랐다.

2. 시험설계

암컷의 발정전기일 17:00시에 동종의 수컷상자에 투입하여 수정을 유기시킨 후, 다음날 오전에 질 도말을 통하여 질전이나 정자가 확인된 개체를 임신 0일로 정하였다. 정상적인 임신군을 대조구로 하고, 비장적출구는 초기(임신 0일), 중기(임신 6일) 및 말기(임신 13일)의 3개군으로 각각 8마리씩 구분하였다. 비장적출시와 수술로 인한 스트레스를 최소화 하기 위해 ethyl ether흡입 마취하여 비장 적출후 봉합하였다. 전시험구의 개체는 임신경과에 따라 임신 1, 7, 14 및 21일 오전 중에 각각 0.5~1.0ml의 혈액을 심장채혈하여 혈청을 분리한 후 progesterone분석시까지 -20℃에서 냉동보관하였다. 임신 21일째 오전에 이미 분만되었거나 분만이 시작되고 있는 개체는 시험구에서 제외시켰으며, 혈중 progesterone분석시 각 시험구의 반복수는 8마리이며 각 마리당 2반복으로 처리하여 측정하였다. 실험계획은 Fig. 1과 같다.

3. 혈중 progesterone 농도 측정

Progesterone농도의 측정은 Fig. 2와 같이 enzy-

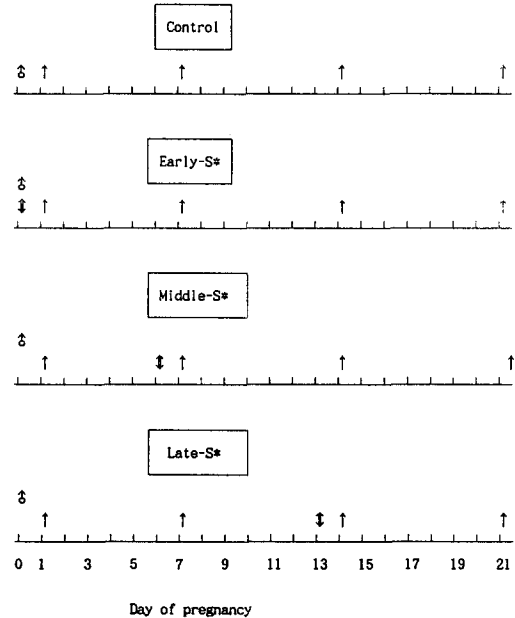


Fig. 1. Experimental design(♂ :mating, ♀ :spenectomy, ↑ :blood collection).

me-linked immuno sorbent assay(ELISA)방법에 의하였고 측정과정에 있어서 사용된 anti-progesterone은 일본 수의축산대학에서 친절하게 제공받았으며, enzyme conjugate(progesterone-horseradish peroxydase labeled, HRP-Progesterone: Sigma Chem. Co.)는 assay buffer로 1:800,000으로 희석하여 처리하였고, 본 실험에서는 ELISA Reader (Dynatech MR700, Dynatech Lab)를 410nm에서 측정하여 계산하였다.

4. 통계처리

통계는 SAS package program으로 산출하였고, 각 처리구간의 차이는 Student's t-test에 의하여 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 임신 rat의 혈중 progesterone 농도의 변화

정상적으로 임신한 rat에 있어서 임신경과에 따른 progesterone농도는 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 임

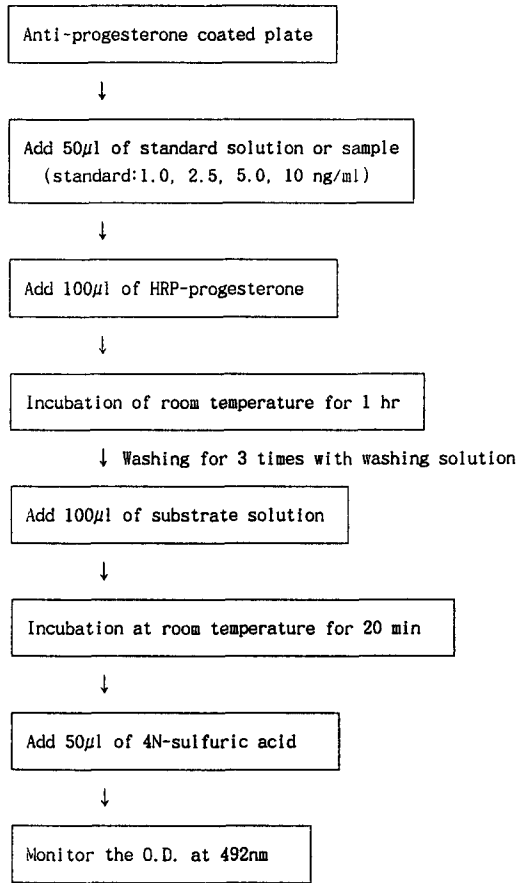


Fig. 2. Microplate ELISA procedure for the determination of serum progesterone concentration.

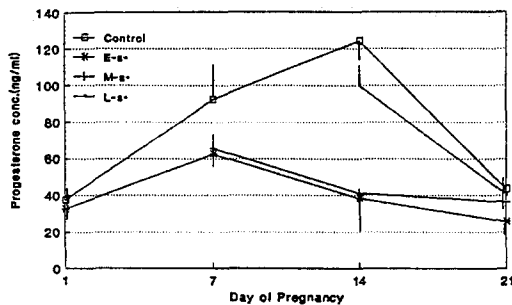


Fig. 3. Concentration of progesterone according to splenectomy in pregnant rats. S*: splenectomy, values means \pm S. E. (n=8)

신 제1일째에는 37.5ng/ml로 나타났으며, 7일째에는 92.3ng/ml, 그리고 14일째에는 124.4ng/ml로 높은 농도를 나타내었으며 그 후 임신 21일째에서는 43.6ng/ml로서 급격히 감소되는 현상이 나타났다.

Takahasi(1984)와 Takahashi 등(1988)의 보고에 의하면 배란 직전의 성숙란포는 뇌하수체의 황체형성 호르몬인 LH의 대량방출로 인해 배란이 유도되고 파열된 난포는 황체로 전환되어 급격한 기능적 변화가 일어나며, 이렇게 형성된 신생황체로부터 progesterone의 분비는 LH와 PRL에 의해 조절되며 착상후 부터 분만까지는 태반에서 분비하는 lactogen에 의해 황체세포로부터 progesterone분비를 촉진시켜줌으로써 수정란의 발육, 착상 및 임신 유지 등의 포유동물 특유의 중요한 생식주기를 반복하게 된다고 하였다. 또한, Schwall(1986)은 황체의 발달은 황체세포의 크기와 황체수에 깊은 관계가 있음을 시사하였고, Murakami 등(1982)은 새롭게 형성된 임신황체는 interstitial cell은 progesterone분비를 촉진시킨다고 하여 황체에 다른 촉진물질이 관여하고 있으며, Hansel과 Dowd(1986)는 황체가 progesterone을 분비한 후 퇴행하여 생리적 기능을 상실할 때까지 복잡한 내분비 기전이 관여한다고 보고하여 임신유지는 뇌하수체와 난소, 태반외에 깊이 관여하는 다른 인자가 존재하고 있음이 강력히 시사하고 있다.

2. 비장적출이 임신 rat의 혈중 progesterone 농도에 미치는 영향

비장 적출시기에 따른 혈중 progesterone농도는 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 임신초기의 비장 적출구(Early-S)에서는 임신 제1일째와 분만예정일인 21일째에서는 대조구와 비슷한 수준으로 나타났으나 임신 중기인 7일과 14일에는 대조구에 비해 혈중 progesterone농도는 크게 낮은 현상이 나타났다.

이와 같은 결과는 임신중기의 비장 적출구(Middle-S)와 비슷한 결과를 보였다. 반면에 임신말기의 비장적출구(Late-S)에서는 임신 14일과 21일의 혈중 progesterone농도는 대조구와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는, 배란된 성숙란포가 황체로 전환되어 progesterone을 합성하고 분비하는 기능을 하기 위해서는 적어도 임신초기와 중기에서는 비장이 황체에 중요하게 작용하게 된다고 사료된다. Rat에

있어서 황체가 progesterone을 합성분비하기 위해서는 뇌하수체의 LH와 PRL이 반드시 필요하다고 알려져 있으며, LH와 PRL이 황체세포에 작용하여 progesterone을 분비하기 위해서는 적어도 비장에서 공급되는 macrophage 및 TGF- β (Transforming growth factor- β)의 작용이 필요한 것으로 알려져 있다(Matsuyama et al., 1990). 또한, Takahashi 등(1988)은 비장에서 생산되는 macrophage는 임신황체의 성숙을 촉진한다고 하였고, Koichiro 등(1988)은 비장의 macrophage는 수정란 착상에 관하며 비장세포의 혈액내 주입은 난소기능의 정상화를 가져왔으며 위임신 rat의 비장적출후는 progesterone이 감소되었다고 하였고, Saito 등(1988)은 위임신 rat에 비장 적출후 6일째까지는 progesterone농도가 증가하다가 그 이후로는 절감하였다고 하였다.

본 실험의 결과, 임신초기와 중기의 비장적출이 임신 rat의 progesterone농도가 대조구에 비해 크게 감소된 이유는 황체에서 progesterone을 분비하기 위해서는 비장세포에서 분비하는 물질이 황체형성시 혹은 황체형성후 모세혈관을 통해 일정하게 작용하여 황체의 기능을 유지하는 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 얻은 결과로서 임신초기 비장적출구에서 mating후 질점액에서 정자가 확인되어 임신으로 판명되어 비장적출 후 실험에 공시하여 임신 21일째에 개복수술한 결과 이외에 다른 구에 비해 유산 특이 착상 전후에 유산된 것으로 추정되는 개체를 많이 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 비장세포가 초기수정란의 착상에도 깊이 관여하고 있을 가능성이 극히 높은 것으로 사료되며, 금후 수정란의 착상과 태반 형성시에 비장의 역할에 대해 구체적으로 검토할 필요가 있는 것으로 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 비장 적출이 임신 rat에 있어서 progesterone분비에 미치는 영향을 검토하기 위하여 정상적인 성주기가 2회 이상 반복되는 약 12~15주령의 Wistar계 rat를 이용하여 동종의 수컷과 임신을 유지하여 정상임신군을 대조구로 하고 비장적출을 초기(Early-S; 임신 0일), 중기(Middle-S; 임신 6일) 및 말기(Late-S; 임신 13일)에 각각 실시하고 임신 1, 7,

14 및 21일에 각각 채혈하여 혈청내 progesterone농도를 RIA법으로 분석하였다. 대조구에서는 임신경과에 따라 혈중 progesterone농도가 임신 14일까지 유의적으로($P < 0.05$) 증가하다가 임신 21일째에 급격히 감소되었으나, 초기 및 중기의 비장 적출구의 progesterone농도는 임신 7일과 14일에서 대조구에 비해 급격히 감소되었다. 그러나 임신말기의 비장 적출구에서는 대조구에 비해 큰 차이가 없어 임신 14일째에는 높게 나타났다가 21일에 급격한 감소현상이 나타났다. 이와 같은 결과로, 비장이 초기임신 rat의 황체형성뿐만 아니라 황체 기능 및 황체세포의 progesterone분비에 깊이 관여하고 있다고 사료된다.

V. 인용문헌

1. Hansel, W. and J.P. Dowd. 1986. New concepts of the control of corpus luteum function. *J. Reprod. Fert.*, 78:755-768.
2. Kenneth, G.T., J.S. Meneil, Y.Y. Phillips and G.R. Ripple. 1989. Blood volume determinations in sheep before and after splenectomy. *Laboratory Animal Science*, 39: 598-602.
3. Koichiro, A., T. Kodama, S. Akimoto and J. Shimazaki. 1988. Characteristics of progesterin binder in hypertrophic human prostate. *Endocrinol. Japonica*, 35(6):899-906.
4. Matsuyama, S., K. Shiota and M. Takahashi. 1987. The critical period in which splenectomy causes function disorder of the ovary in adult rats. *Endocrinol. Japonica*, 34(6):849-855.
5. Matsuyama, S., K. Shiota and M. Takahashi. 1990. Possible role of transforming growth factor- β as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell cultures. *Endocrinology*, 127:1561-1567.
6. Murakami, N., M. Takahashi, Y. Suzuki and K. Homma. 1982. Responsiveness of dispersed rat luteal cells to luteinizing hormone and prolactin during the estrous cycle and

- early pseudopregnancy. *Endocrinology*, 111: 500-508.
7. Saito, S., S. Matsuyama, K. Shiota and M. Takahashi. 1988. Involvement of splenocytes in the control of corpus luteum function in the rat. *Endocrinol, Japonica*, 35(6):891-898.
 8. Schwall, R.H., F. Gamboni, M.H. Mayan and G.D. Niswender. 1986. Changes in the distribution of sizes of ovine luteal cells during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 34:911-918.
 9. Takahashi, M. 1984. Functional differentiation of the rat luteal cells. *Endocrine correlates of Reproduction* (Ochial., K. et al., eds) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo Springer-Verlag, Berlin, pp. 307-315.
 10. Takahashi, M., S. Saito and S. Matsuyama. 1988. Macrophages on the spleen effects on luteal cell steroidogenesis *in vitro* or *in vivo* in human reproduction. Current status future prospect. Amsterdam-New York-Oxford. *Excepta Medica*, pp. 179-180.
 11. Toren, M. and O.W. Schalm. 1964. Influence of the equine spleen on rapid changes in the concentration of erythrocytes in peripheral blood. *Am. J. Ver. Res.*, 25:500-504.
 12. 임창운. 1991. 생쥐비장에서 T 및 B세포계의 임신 기간에 따른 변화에 관한 면역조직 화학적 연구. 서울대학교 대학원 박사학위 논문.
 13. 정원철, 오석두, 성환후, 정진관, 윤창현, 이병오. 1994. 비장적출이 임신 rat의 혈액성분 및 번식력에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 18(3):167-174.