

# 범가자미, *Verasper variegatus*의 난모세포 성숙(GVBD) 유도를 위한 HCG와 스테로이드 호르몬의 *in vitro* 효과

백혜자·김 윤\*

국립수산진흥원 양식과·\*국립수산진흥원 유전육종과

## Effects of Human Chorionic Gonadotropin (HCG) and Steroids on *In vitro* Germinal Vesicle Breakdown in the Spotted Halibut, *Verasper variegatus*

Hea-Ja Baek and Yoon Kim\*

Aquaculture Division, National Fisheries Research and Development Agency, Kijang-Gun, Pusan 619-900, Korea

\*Genetics and Breeding Division, National Fisheries Research and Development Agency, Kijang-Gun, Pusan 619-900, Korea

The relative effectiveness of steroids and human chorionic gonadotropin (HCG) on germinal vesicle breakdown (GVBD) was investigated *in vitro* using the isolated oocytes (folliculated oocytes) from the spotted halibut, *Verasper variegatus*.

Among the steroids tested, 17 $\alpha$ -hydroxy, 20 $\beta$ -dihydroprogesterone (17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP) was more effective than progesterone (P4) and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17 $\alpha$ OHP). In comparing 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ OHP with HCG, both 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP and HCG were effective in inducing GVBD at all concentrations : 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP was effective even at lower concentrations (10~50 ng/ml). HCG at three concentrations used (50, 100, 500 IU/ml) showed no significant differences in inducing GVBD.

Key words : HCG, GVBD, Steroid, Spotted halibut

### 서 론

경골어류의 난소는 난원세포의 유사분열중식기, 성장기를 거쳐 제1차 난모세포로 발달되는데 이 과정에서 난모세포는 제1차 감수분열 전기상태(diplotene)로 머물면서 세포질내 난황축적이 완료될 때까지 계속 성장한다. 뒤이어 난모세포의 성숙(oocyte maturation or meiotic maturation, Masui, 1985)이라고 부르는 제1차 감수분열이 재개된다.

지금까지 밝혀진 연구들에 의하면 경골어류의 난성숙 과정은 여포층에서 생성, 분비되는 성스테로이드 호르몬에 의해 조절되고있으며, 뇌하수체의 생식선자극 호르몬이 그 매개체 역할을 한다고 알려져 있다(Goetz, 1983 ; Thibault and Gerard, 1987 ; Jalabert et al., 1990). 스테로이드 호르몬들을 사용하여 난모세포의 최종 성숙을 유도한 연구들에 의하면 C<sub>19</sub>와 C<sub>18</sub>-스테로이드들은 난의 성숙을 유도하는데 비효과적임을 나타낸 반면, 20 $\beta$ -hydroxy group을 가지고 있는

본 논문은 국립수산진흥원 수산시험연구비에 의해 수행되었음.

C<sub>21</sub>-스테로이드들은 일반적으로 아주 효과적임을 보고하였다(Goetz, 1983; Scott and Canario, 1987).

이들 중 비교적 반응이 좋은 스테로이드는 17 $\alpha$ -20 $\beta$ OHP로 알려져있으며 연어류, 메기류와 잉어류에서는 성숙유도 스테로이드(maturation inducing-steroid, MIS)로 불리어지고 있다(Nagahama and Adachi, 1985; Scott and Canario, 1987; Canario and Scott, 1988). 대부분의 연구에서 난모세포의 최종 성숙이 일어났는지의 여부를 결정하기 위해 사용하는 형태적인 관찰은 난황형성을 완료한 직후의 난모세포 중앙에 위치해 있던 핵(GV=germinal vesicle)이 동물극 쪽으로 이동하면서 세포질이 점점 투명화되는 현상으로 보고하고 있다. 뒤이어 난핵이 붕괴(GVBD=germinal vesicle breakdown)되면서 제1극체를 방출하고 곧이어 제2감수분열을 이행하면서 난모세포는 수정 능력을 갖추게 된다. 이러한 과정에 관여하는 내분비 호르몬들의 상호작용 메카니즘 해명은 유용어류의 성숙과 배란을 인위적으로 조절하는데 반드시 필요하다.

본 연구는 실내 자연산란이 어려운 범가자미를 대상으로 어류의 인위적 성숙·배란유도를 위해 많이 사용하고 있는 단백질성 호르몬 HCG와 어류에서 최초로 분리·동정된 성 스테로이드 17 $\alpha$ -20 $\beta$ OHP (Idler et al., 1960) 외에 다른 progestins 특히, 17 $\alpha$ -20 $\beta$ OHP의 전구체인 17 $\alpha$ OHP나 P4 등(C<sub>21</sub>-스테로이드)의 성숙유도 효과에 초점을 맞춘 농도별 비교 실험이 *in vitro*에서 이루어졌다.

## 재료 및 방법

### 실험어

부산 또는 여천 근해에서 어획된 범가자미, *V. variegatus* (전장 15~20 cm)를 울진 또는 거제 수산종묘배양장에서 일정 기간 사육하면서 복부가 팽대되었다고 판단되는 것을 선택(전장 40~51

cm, 체중 1.2~1.7 kg), 수송하여 실험실 내에서 복부 압박으로 배란여부를 육안으로 판단한 뒤, 가능한 한 전혈액을 제거한 후 무균상태로 옮겨 졌다.

### 난모세포 분리 및 배양

난황형성 직후의 난소조직을 절취하여 TBSS (trout balanced salt solution, Jalabert and Fostier, 1984)로 세척한 뒤, 더 작은 난소조직으로 분리하여 가는 핀셋으로 결합조직과 혈관 등을 제거시키면서 난모세포들을 하나씩 분리하였다. 난모세포 분리과정은 얼음조각 위에서, 배양은 13 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 에서 행해졌으며 비교실험군은 동일한 어미로부터 얻어진 난들로서 3회 반복구로 이루어졌다. 배양초기의 난모세포 성숙 단계를 판별하기 위해 투명액(ethanol : formalin : glacial acetic acid=6 : 3 : 1, Stoeckel, 1992)으로 일부 난모세포를 투명화시킨 뒤, 현미경하에서 핵(GV=germinal vesicle)의 위치를 확인하였다. 난성숙 과정의 형태적 변화를 Fig. 1에 나타냈다. 분리, 선택된 난모세포들의 크기는 난황형성이 완료되었다고 판단되는 직경 1.0 mm 전후의 불투명한 난들로서 핵은 거의 중앙에 위치하고 있었다(Fig. 1 a). 난모세포들은 40개씩 각 well (24-well plate)로 옮겨져 1 ml의 Leibovitz L15 배양액 속에서 조절 호르몬과 함께 60 또는 72시간 동안 배양 후, 1~1.5 ml의 투명액으로 GVBD 여부를 현미경하에서 관찰하였다. 실험에 사용한 스테로이드 호르몬과 HCG는 Sigma로 부터 구입하였으며, 스테로이드는 에탄올 농축액으로 냉동보관해 두었다가 사용 직전 질소 가스로 건조시킨 뒤 필요한 농도의 배양액을 첨가하여 사용하였다.

실험과정 동안 필요한 모든 기구는 고압증기로 멸균시켰으며 용액은 PH 7.6~7.7, 삼투압 305~310 milliosmol로 조절한 후 millipore filter (0.22  $\mu$ m)로 여과시켰다.

본 실험에 들어가기 전에 예비실험으로 난소 조직 (60~150 mg, 난경 0.85~0.95 mm)을

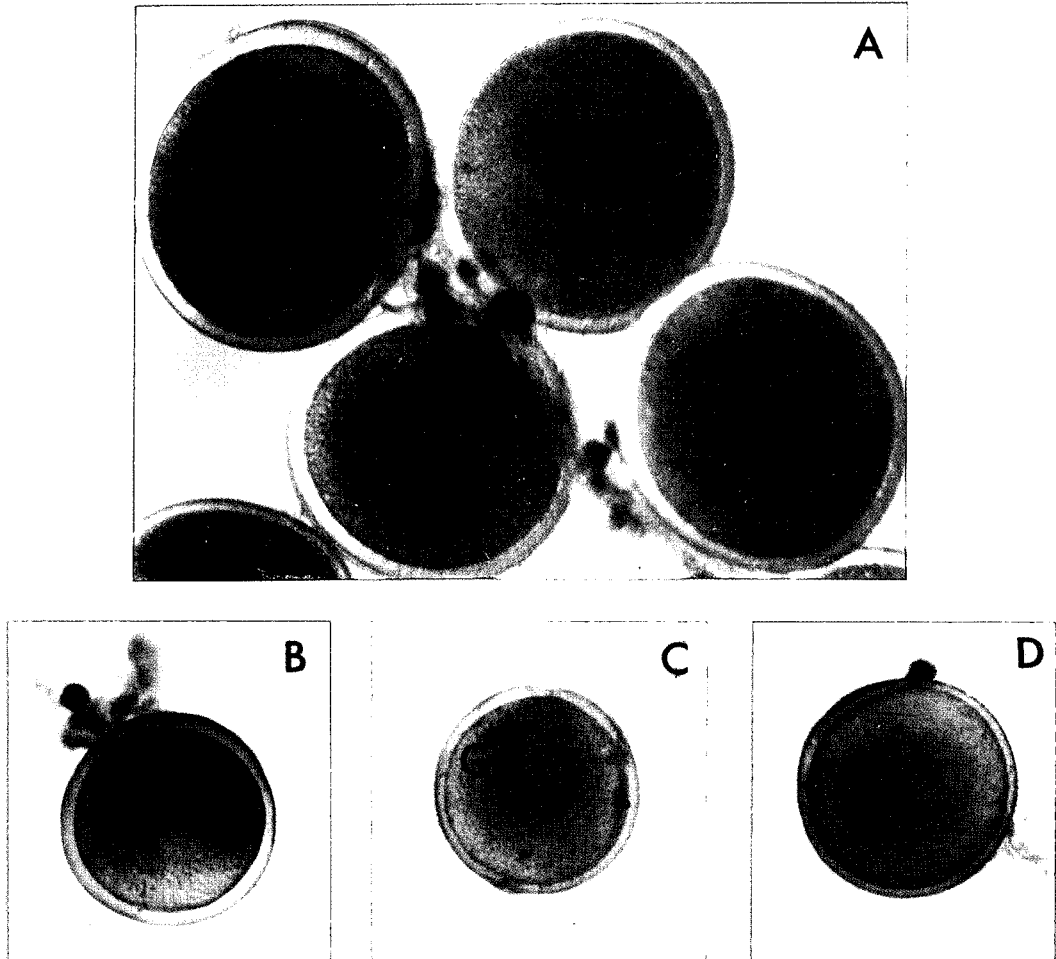


Fig. 1. Photomicrographs of the spotted halibut oocytes during the course of hormones-induced oocyte maturation (B-D) *in vitro*. Oocytes were treated with a "clearing" fixative prior to observation. A, "Full-grown" oocytes prior to incubation, germinal vesicle (GV) was positioned in the center of the oocyte ( $\times 30$ ). B, GV in subperipheral position ( $\times 20$ ). C, GV in peripheral position, beginning to spread ( $\times 20$ ). D, GVBD, GV no longer evident but the oocyte was still in its follicle ( $\times 20$ ).

이용하여 2 ml의 Leibovitz L15 배양액 속에서 성숙조절 가능한 여러 호르몬을 농도별로 첨가하여 72시간 배양후 핵의 위치를 관찰하였다.

#### 통계학적 분석

실험 결과에 대한 유의성 검정은 Duncan's multiple range test와 Student's t-test에 의하였다.

#### 결 과

실험 1; 난모세포 분리 및 배양을 처음 시작하기 전에 개개의 난으로 분리할 때 기계적 손상에 의한 핵이동 정도를 확인하기 위한 예비 실험으로 난소조직(60~150 mg, 난경 0.85~0.95 mm)을 대상으로 현재 보유하고 있는 성숙 유도 가능한 여러 종류의 스테로이드와 HCG

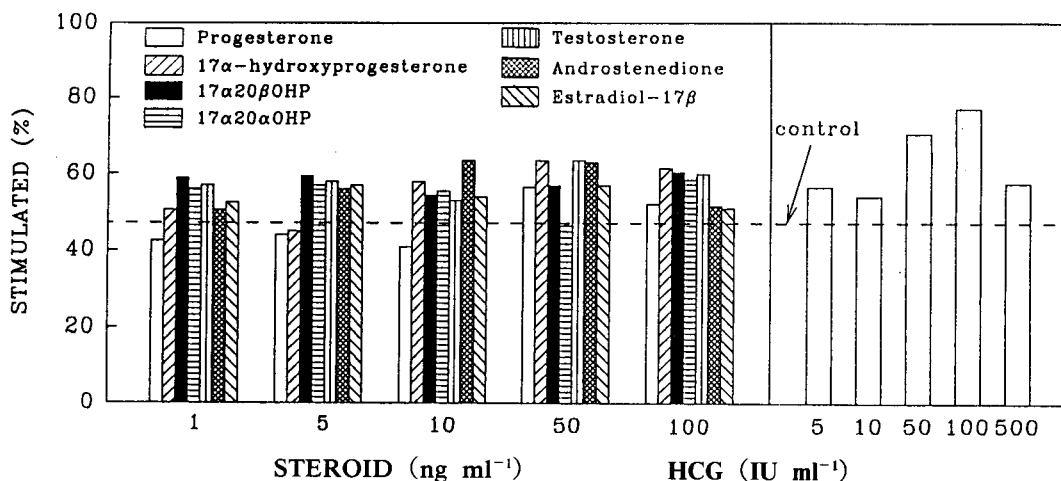


Fig. 2. The effects of steroids and human chorionic gonadotropin (HCG) on germinal vesicle breakdown (GVBO) or peripheral germinal vesicle (PGV), "stimulated", in ovarian tissue of the spotted flounder. Values represent the mean of two replicate incubations (60~150 mg/2 ml/well, incubation time=72 hours). 17α20βOHP=17α-hydroxy, 20β-dihydro progesterone (17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one), 17α20αOHP=17α-hydroxy, 20α-dihydroprogesterone(17α, 20α-dihydroxy-4-pregnen-3-one).

호르몬들의 효능을 농도별로 테스트하였다(Fig. 2). 호르몬 자극에 대한 난성숙 반응은 핵이동 위치 또는 GVBD 여부(Fig. 1C, 1D)를 전체에 대한 백분율로 표시하였다. estradiol-17β와 androgens (testosterone, androstenedione)은 사용한 모든 농도에서 범가자미의 난성숙을 자극 하는데 영향을 미치고있으며, androstenedione 은 10과 50 ng/ml 농도에서 64와 63%의 자극 반응을 보였고(대조군은 47%), testosterone은 50과 100 ng/ml에서 각각 64와 60%의 반응을 보였다. 4종류의 progestogens중 17α20βOHP는 낮은 농도(1과 5 ng/ml)에서도 각각 59와 60%의 반응을 나타냈으며, 17α-hydroxy, 20β-dihydroprogesterone (17α20βOHP) 역시 비슷한 경향을 보였다. P4는 저농도(1,5, 10 ng/ml)에서 비효과적인 것으로 나타났으며, 17αOHP는 고농도 (50, 100 ng/ml)에서 64와 62%의 반응을 보였다. 한편 HCG은 50과 100 IU/ml에서 각각 71과 77%로 다른 실험군보다 높은 자극 반응을 보였다.

실험 2 : 분리된 난모세포(난경 1.0 mm 정도)

를 대상으로 난의 최종 성숙에 직접 관련이 있는 것으로 알려진 C<sub>21</sub>-스테로이드 중 progestogens을 이용한 GVBD유도 효과를 보면(Fig. 3), 사용한 농도 즉, 5와 50 ng에서 P4와 17αOHP

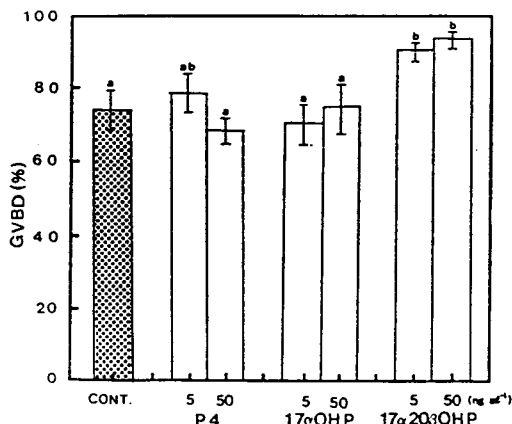


Fig. 3. The effects of P4, 17αOHP and 17α20βOHP on GVBD in oocytes of the spotted halibut. Each value represents the mean±S.E.M. of three replicate incubations (40 oocytes/ml well, incubation time=72 hours). Values with dissimilar superscripts are significantly different at P<0.05 (Duncan's multiple range test).

는 대조군(74% GVBD)에 비해 유의한 효과를 보이지 않았으나 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP는 대조군에 비해 유의한 효과(P<0.05)를 보였다(각각 91, 93% GVBD).

실험 3; 난경 1.0~1.1 mm인 난모세포를 대상으로 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP와 HCG를 농도별로 비교 실험한 결과는 Fig. 4와 같다. 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP (10, 50, 100, 500 ng/ml)와 HCG (50, 100, 500 IU/ml)의 모든 농도 실험군은 27%를 보인 대조군보다 높은 성숙유도 효과를 보였으며 (P<0.05), 100 ng의 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP 실험군은 62%로 가장 높은 GVBD 유도 효과를 보였다. HCG의 경우 500 IU에서 56%의 GVBD 유도 효과를 보여 비교적 높은 반응을 나타냈으나, 사용한 농도 즉, 50, 100, 500 IU 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다.

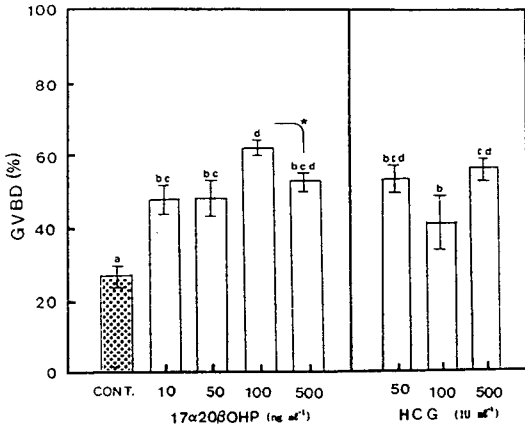


Fig. 4. The effects of 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP and HCG on GVBD in oocytes of the spotted halibut. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of three replicate incubations (40 oocytes/ml well, incubation time=60 hours). Values with dissimilar superscripts are significantly different at P<0.05 (Duncan's multiple range test). P<0.05 by t-test

### 고찰

실내 자연산란이 어려운 종을 대상으로 수정란을 얻기 위해 상품화된 호르몬제를 사용하여

생식소 발달단계를 조절하려는 시도가 산업적으로 이루어지고 있으나 어류의 생식소 성숙에 관여하는 내분비 호르몬들의 역할과 이들 상호간의 조절 메커니즘을 이해하지 않고는 일관성있는 결과를 유도하는데 많은 어려움이 뒤따른다.

어류의 난성숙과 관련된 많은 보고들에 의하면 일반적으로 estrogens과 androgens은 난의 최종 성숙 유도에 비효과적이며(Goetz, 1983; Haider and Inbaraj, 1989), 예외로 일본산 송사리, medaka에서는 estradiol이 GVBD 유도에 효과적인 것으로 보고하였으나(Hirose, 1976), 같은 실험에서 Iwamatsu (1978)는 estradiol이 아무런 효과를 보이지 않았다고 하였다. 이러한 연구 결과들을 바탕으로 본 연구에서 범가자미의 난성숙 유도에 estrogens과 androgens이 어떠한 영향을 미치는가에 초점을 두지 않았지만, 예비 실험 결과로부터 이들 스테로이드성 호르몬은 난성숙을 자극하는데 관여하지만 최종 성숙을 유도할 만큼 주요 스테로이드 호르몬은 아닌 것 같았다.

C<sub>21</sub>-스테로이드 중에서 난성숙 유도에 대한 progestogens의 역할은 많은 어종에서 언급되었으며, 특히 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP가 가장 효과적인 스테로이드로 알려져 있다(Goetz, 1983). 몇몇 어종에서는 11-oxygenated corticosteroids도 난성숙 유도에 효과적이라고 보고된 바 있다(Goswami and Sundararaj, 1974). 본 연구 결과 P4와 이의 유도체인 17 $\alpha$ OHP, 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP 중에서 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -OHP에 대한 반응이 가장 높은 것으로 보아 범가자미 난모세포의 최종 성숙 유도에 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

*In vitro* (생체외)와 *in vivo* (생체내) 실험에서 경골어류의 난성숙과 배란을 유도하는데 널리 사용되고있는 단백질성 호르몬 HCG (Goetz, 1983)와 위에서 언급한 스테로이드성 호르몬, 17 $\alpha$ -20 $\beta$ OHP를 비교 테스트한 실험에서 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP (100 ng/ml)가 HCG (500 IU/ml)보다 더 효과적인 것으로 나타났으나 유의한 차는 없는

것으로 보아 이 두 호르몬 자극에 대한 난모세포의 성숙 (GVBD) 반응이 높은 것으로 생각된다. 다른 가자미류, *Limanda limanda* 와 *Pleuronectes platessa*에서는 HCG가 조금 더 높은 유도효과를 보였지만 결론적으로 이 두 호르몬에 대한 효능은 비슷한 것으로 보고하였다(Canario and Scott, 1990). 이는 본 실험 결과와 일치하였다.

본 연구에서  $17\alpha 20\beta$ OHP와 HCG의 효과적인 농도를 정확하게 결정하기는 어렵지만  $17\alpha 20\beta$ OHP는 다른 어류에 비해 낮은 농도 즉, 100 ng/ml 이하에서 더 민감한 반응을 나타내는 것 같았다. 일반적으로 스테로이드성 호르몬은 1  $\mu$ m/ml (Wallace et al., 1993), 담수어류의 경우 20 ng~1  $\mu$ m/ml로 다양하다(Canario and Scott, 1988; Jalabert and Fostier, 1984).

$17\alpha 20\beta$ OHP와 HCG 자극에 대한 난모세포의 민감한 반응은 세포의 크기와 난핵의 초기 이동 상태에 따라 다르며, 난소 내 난모세포군의 성장 패턴에 따라 서로 차이를 보이는 것 같다.

앞으로  $17\alpha 20\beta$ OHP가 범가자미 난소의 대사 물로 확인되는지, 성숙에 관여하는 다른 내분비 호르몬과의 상호 조절에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

범가자미 난모세포의 최종성숙(GVBD=germinal vesicle breakdown) 유도를 위한 HCG (human chorionic gonadotropin)와 스테로이드 호르몬들의 효능 비교실험이 *in vitro*에서 이루어졌다. 실험에 사용한 스테로이드 호르몬, progestogens (progesterone,  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone,  $17\alpha$ -hydroxy,  $20\beta$ -dihydroprogesterone)중에서는  $17\alpha$ -hydroxy,  $20\beta$ -dihydroprogesterone ( $17\alpha 20\beta$ OHP)이 매우 효과적으로 나타났으며,  $17\alpha 20\beta$ OHP와 HCG와의 비교실험에서는 이들 모두 GVBD 유도에 효과적인 것으로 나타났다. 특히  $17\alpha 20\beta$ OHP는 저농도 (10~50 ng/ml)에서도 효과적이며, HCG는

사용한 농도(50, 100, 500 IU/ml)사이에 유의한 차를 보이지 않았다.

## 참 고 문 헌

- Canario, A. V. M. and A. P. Scott. 1988. Structure-activity relationships of  $C_{21}$  steroids in an *in vitro* oocyte maturation bioassay in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol. 71 : 338-348.
- Canario, A. V. M. and A. P. Scott. 1990. Effects of steroids and human chorionic gonadotrophin on *in vitro* oocyte final maturation in two marine flatfish : the dab, *Limanda limanda*, and the plaice, *Pleuronectes platessa*. Gen. Comp. Endocrinol. 77 : 161-179.
- Goetz, F. W., 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In "Fish physiology", Vol IX/B : Reproduction (W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson, eds.), pp 117-170. Academic Press, New York.
- Goswami, S. V. and B. I. Sundararaj, 1974. Effects of  $C_{18}$ ,  $C_{19}$  and  $C_{21}$  steroids on *in vitro* maturation of oocytes of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Gen. Comp. Endocrinol. 23 : 282-285.
- Haider, S. and R. M. Inbaraj, 1989. Relative *in vitro* effectiveness of estradiol- $17\beta$ , androgens, corticosteroids, progesterone and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of Indian major carps, *Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala* and *Catla catla*. Fish Physiol. Biochem. 6 : 289-295.
- Hirose, K., 1976. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Placoglossus altivelis*). J. Fish Res. Board Can. 33 : 989-994.
- Idler, D. R., U. H. M. Fagerlund and A. P. Ronald. 1960. Isolation of pregn-4-ene-17,  $20\beta$ -diol-3-one from the plasma of pacific salmon (*Oncorhynchus nerka*). Biochem. Biophys. Res. Comm. 2 : 133-137.
- Iwamatsu, D. 1978. Studies on oocyte maturation of the medaka, *Oryzias latipes*. V. On the structure of steroids that induce matu-

- ration *in vitro*. J. Exp. Zool. 204 : 401-408.
- Jalabert, B. and A. Fostier, 1984. The modulatory effect *in vitro* of oestradiol-17 $\beta$ , testosterone or cortisol on the output of 17 $\alpha$ -hydroxy, 20 $\beta$ -dihydroprogesterone by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ovarian follicles stimulated by the maturational gonadotropin s-GtH. Reprod. Nutr. Develop. 24 : 127-136.
- Jalabert, B., A. Fostier, B. Breton and C. Weil, 1991. Oocyte maturation in vertebrates. In : "Vertebrate endocrinology : fundamentals and biomedical implications", Vol. 3, pp 23-90 (P. K. T. Pang and M. P. Schreibman eds.), Academic Press. N. Y.
- Masui, Y., 1985. Meiotic arrest in animal oocytes. In "Biology of Fertilization" Vol. 1 : Model systems and oogenesis (C. B. Metz and A. Monroy, eds.); pp 189-219. Academic Press, New York.
- Nagahama, Y. and S. Adachi., 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Develop. Biol. 109 : 428-435.
- Scott, A. P. and A. V. M. Canario, 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. In "Proceedings of the IV, International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, St. John's, Newfoundland, Canada, August 1987" (D. R. Idler, L. W. Crim. and J. M. Walsh, eds.), pp 224-234. Marine Sciences Research Laboratory, St. John's, Newfoundland, Canada.
- Stoeckel, J. N. and R. J. Neves, 1992. Comparison of methods for viewing the germinal vesicle in fish oocytes. Progressive Fish-Culturist 54 : 115-118.
- Thibault, C. and M. Gerard, 1987. Role des cellules folliculaires dans les differents aspects de la maturation de l'ovocyte. Contracep. fert. sexual. 15 : 319-328.
- Wallace, R. A., S. M. Boyle, H. J. Grier, K. Selman and T. R. Petrino, 1993. Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in captive female snook, *Centropomus undecimalis*. Aquaculture, 116 : 257-273.