발생과 생식 제1권 제1호, 67~77(1997)
Dev. Reprod. Vol. 1, No. 1, 67~77(1997)

과량의 생식소자극호르몬 처리를 받은 생쥐 폐쇄난포의 배란율과 초기배아 발생률의 변화

임천규 · 김정욱* · 이호준* · 윤용달
한양대학교 자연과학대학 생물학과
*삼성제일병원 제일의학연구소 불임연구실

Ovulation Rate and Early Embryonic Development of Mouse Atretic Follicular Oocytes Induced by High-dose Gonadotropin

Chun-Kyu Lim, Jeong-Wook Kim*, Ho-Joon Lee*, and Yong-Dal Yoon
Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University
** Infertility Research Laboratory, Cheil Medical Institute, Samsung Cheil Hospital and Women's Health Care Center*

ABSTRACT

Mammalian ovary consists of various growing stages of follicles. Ovarian follicular growth and differentiation, however, can be distinguished into recruitment, growth, selection and ovulation. While only minute of the selected follicles ovulate their oocytes, all the rest follicles disappear by atresia. This atresia is an important event of which physiological mechanism must be resolved.

The present study was carried out to investigate the effects of various doses of pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) on the oocyte quality, ovulation rate, and the early embryonic development in immature mice. Immature mice were administrated with 5, 20, or 40 IU PMSG. At every 12 hour up to 72 hour after treatment, body and ovary weights were measured. Oocytes were flushed from the oviducts under the dissecting microscope and observed under the inverted microscope. Late 2-cell embryos were collected from the mice which were superovulated by the same dosage of PMSG followed by 5 IU hCG 47 hours after PMSG-treatment.

The percentage of abnormal oocytes was higher in 20 or 40 IU PMSG-treated animals than 5 IU PMSG-treated ones. Ovulation occured at 12 hours after PMSG injection in all experimental groups. The percentage of retrieved abnormal oocytes increased in the 20 or 40 IU PMSG-treated groups but not in 5 IU PMSG-treated group. There was no significant difference in the mating rate among the groups [52.6% (10/19), 66.7% (10/15), 44.0% (11/25): 5, 20, 40 IU group respectively]; however, there was a significant ($p<0.01$) increase of embryo retrieval rates in 5 and 20 IU-treated groups compared with that in 40 IU-treated group [89.2% (239/268), 85.5% (224/262), 40.0% (18/45)].

There was significant ($p<0.01$) increase of embryo development rates in 5 IU-treated group compared with that in 20 and 40 IU-treated group [231/239(96.7), 179/224(79.9), 77.8(14/18)].

* 본 연구는 1995년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-95-4437)와 1995년도 한국과학재단 호르몬센터연구비(KOSEF-HRC-95-0401)의 일부로 이루어졌슴.

In conclusion, higher doses of PMSG injection increased the occurrence of abnormal oocytes ovulation in immature mice. The most of oocytes collected from 5 or 20 IU PMSG-treated group has fertilizability. But in mice injected with higher doses of PMSG, their oocytes exhibit less fertilizability and, even fertilized, all oocytes are not fully capable of development.

Key words: PMSG (pregnan mare's serum gonadotropin), Atresia.

서 론

포유동물의 난소내에는 다양한 시기의 난포와 간질세포 (interstitial cell)들로 구성되어 있다. 태아 시기에 원시생식세포 (primordial germ cell, PGC)에서 기원한 난원세포는 분화하여 primordial follicle 상태로 폐경기 이후까지 휴지기(resting stage)로 존재하는데, 이들 중 일부가 전 생식주기를 통하여 지속적으로 휴지기 난포군(resting pool)을 벗어나 성장을 시작하게 된다. 성장을 시작한 난포는 반드시 배란되거나 또는 폐쇄(atresia: a=not, tretos=perforated)라는 기작을 통하여 소멸하게 된다. 이러한 난포의 성장과 분화는 성장난포의 선정(recruitment), 성장 (growth), 배란선택(selection) 그리고 배란 (ovulation)이라는 과정으로 나누어 볼 수 있으며, 배란될 운명의 난포를 선택(selection)하는 시기에 선택된 난포만이 배란되게 되며, 선택되지 않은 대부분의 난포는 폐쇄를 통하여 소멸하게 된다.

이러한 난포폐쇄(follicular atresia)는 난포형성과정(folliculogenesis) 중 난포내 내분비적 환경에 의하여 소수의 배란되는 난포를 제외한 나머지 난포가 퇴화하여 소멸되는 것을 말한다 (Byscov, 1978; Tsafriri & Braw, 1984; Yoon, 1990). 즉 난포형성과정 중 생식세포의 퇴화는 소난포 및 성장중인 난포가 성장-성숙과정 중 각각의 시기에서 퇴화되는 것을 뜻한다. 그러나 난포폐쇄는 난포의 형성 전시기에서 퇴화하여 소멸하는 현상을 의미하는 것보다는 난포가 성장하여 강소를 형성한 후 배란과정을 거치지 않는 난포의 분화가 변형된 것으로 보여지며, 이러한 퇴화과정을 난포폐쇄라고 지칭한다 (Weir & Rowlands, 1977).

난포폐쇄는 대부분의 척추동물에서 일반적인 현상으로, 가임성 생식주기 중 1% 미만의 난포만이 성장하여 각 생식주기에서 배란되며, 출생시 존재하던 대부분의 난자는 퇴화하여 소멸한다. 난포폐쇄는 비배란기, 즉 태아기와 미성숙기, 임신기, 수유기 그리고 폐경기 (Hage *et al.*, 1978; Tsafriri & Braw, 1984) 뿐만 아니라 정상의 난소주기 (Turnbull *et al.*, 1977)를 포함한 모든 단계에서 일어난다. 또한 생식소자극호르몬에 의해 발정기가 유도되는 동물의 발정기에서도 나타나며 (Tsafriri & Braw, 1984), 사람의 경우에는 평생을 통하여 일어난다고 보고되어 있다 (Turnbull *et al.*, 1977; Tsafriri & Braw, 1984). 앞에서 언급하였듯이 대부분의 연구에서는 난포형성의 전시기 (total period of folliculogenesis)에서 퇴화하여 없어지는 난포를 "atresia"로 표현하고 있으나, 난소에 난포세포 (follicle cell)가 형성되고 휴지상태이던 난포가 강소형성 전까지 성장하는 과정에서의 난포 퇴화와 난포가 강소를 형성한 후, 즉 강소난포 (antral follicle)의 성장-성숙 시기에서 폐쇄로 인한 퇴화 과정은 구별되어야 한다.

이러한 난포의 성장, 선택, 배란에 관여한다고 알려진 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG)은 종특이적으로 휴지기의 성장이 억제되어 있는 non-growing pool에서 난포를 성장하는 난포로 변화시켜 더 많은 난포를 자라게 하거나, 난포폐쇄의 비율을 감소시켜 과배란을 유도한다고 알려져 있다. 미성숙 생쥐의 경우 PMSG는 폐쇄난포의 수를 감소시키며 (Peters *et al.*, 1975; Peters, 1979), 흰쥐에서는 강소난포의 폐쇄를 감소시켜, 정상 생식주기에서는 배란되지 않을 난포를 배란시키는 것으로 알려져 있다 (Braw & Tsafriri,

1980). 햄스터의 경우, PMSG는 휴지기의 난포 (reserve follicle)를 성장하는 난포군으로 보충(recruitment)시킬 뿐만 아니라 난포폐쇄의 비율을 감소시킨다고 보고되고 있다 (Chiras & Greenwald, 1978). 그러나 뇌하수체가 제거된 미성숙 흰쥐에서 과량의 생식소자극호르몬(gonadotropin)을 처리하면 폐쇄를 증가시킨다 (Harman *et al.*, 1975)는 보고가 있어 난소에 있어 PMSG의 작용은 처리농도에 따라 다른 현상을 나타내는 것으로 생각된다.

실제로 생식소자극호르몬을 사용하여 과배란을 유도하는 방법은 체외수정 및 배아이식술 (*in vitro* fertilization & embryo transfer program)에서 많은 수의 난자를 얻기 위하여 흔히 시행하는 방법이다. 그러나 과량의 생식소자극호르몬은 포유류에서 임신율을 감소시킨다고 보고되어 왔다 (Beaumont & Smith, 1975; Evans & Robinson, 1980; Armstrong & Evans, 1983). 일반적으로 미성숙 흰쥐에 생리적 용량 (physiological dose)인 4~8 IU의 PMSG를 주사하여 임신을 유도한 경우 회수된 배아의 수, 생존율 및 스테로이드 호르몬의 변화에 있어서 성숙한 흰쥐와 비교하여 차이를 보이지 않았고 정상적인 임신을 유지시킬 수 있으며, 또한 과배란 유도로 태어난 자손도 정상적으로 태어난 자손에 비해 생식능력의 차이가 없음이 보고되었다 (Nuti *et al.*, 1975). 이러한 결과들과는 달리 과량의 PMSG (16~40 IU)는 임신의 초기단계에서 배아의 손실을 유발하여 착상률이 낮은 것으로 보고되어 있다 (Miller & Armstrong, 1981a). 이는 배란 후 생식수관이 에스트로겐에 의하여 과다하게 자극되고, 배아의 발달과 자궁의 발달이 불균형을 이루기 때문이라고 보고되어 있다 (Miller & Armstrong, 1981b; Walton & Armstrong, 1982).

미성숙 흰쥐에 과량의 PMSG를 주사하면 배란은 빨리 시작되지만, 정상적인 난자와 수정란의 비율은 감소하는 것으로 보고되어 있다 (Walton *et al.*, 1983). 그리고 생쥐에서 PMSG를 주사하여 과배란을 유도하면 주사하지 않은 군보다 3~4배 많은 난자를 얻을 수 있다 (Biggers *et al.*, 1971). 그러나 이때 얻어지는 배아중에서 퇴화 (degeneration)되는 배아의 비율, 착상전에 손실되는 배아의 비율, 임신이 진행되는 동안의 배아 손실률을 살펴보면 PMSG 처리군이 더 높다고 보고되었다 (Sato & Marrs, 1986). 또한 PMSG 양의 증가에 따라 더 많은 배아를 얻을 수 있는 반면에, 수정률은 떨어지고 퇴화 (degeneration)되거나 절편화 (fragmentation)되는 배아의 비율도 증가하는 것으로 보아 난자 또는 배아의 질은 외부에서 주어지는 생식소자극호르몬의 영향을 받는 것으로 추측되고 있다 (Sato and Marrs, 1986).

이상의 연구들을 종합하여 볼 때 과량의 생식소자극호르몬의 처리로 배란을 유도하면 정상적인 성장-성숙이 이루어지지 않는 난포, 즉 폐쇄난포 역시 자극되어 배란될 가능성이 높다. 그리고 이러한 난자도 수정되고 배 발생이 진행될 것이 확실하다. 따라서 본 연구에서는 과량의 PMSG를 주사하여 시간에 따른 배란 양상과 난소내 난포의 폐쇄에 미치는 영향, 비정상 난자의 발생률을 관찰하고, PMSG의 농도가 초기 배아의 발생에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 생후 3주의 미성숙 생쥐 (ICR 계) 암컷을 삼성제일병원 사육실에서 사료와 물을 충분히 공급하면서, 일주일 동안 적응(14 시간 조명, 10 시간 소등)시킨 후에 사용하였으며, 실험시기에 vaginal smear를 통하여 발정주기를 조사하여 사춘기 (puberty)가 시작된 개체는 제외시켰다.

2. 배란율과 난자의 핵상 관찰

4주령 ICR 계 생쥐 암컷에 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma Chem. Co., Chem-Bio. Ltd.) 5, 20, 40 IU를 각각 복강주사하였다. 주사 후 12, 24, 36, 48, 60, 72시간째에 1.56 mg의 pento-

barbital sodium (Nembutal Sodium Solution, Abbott Lab)을 복강주사하여 마취시킨 후 체중을 측정하였다.

체중을 측정한 후 경추파괴방법으로 도살하여 난소를 적출하고 무게를 측정 (Sartorius, MP 8~6)하였다.

또한, 수란관을 적출하여 1 ml의 0.4% bovine serum albumin (BSA)을 첨가한 modified Tyrode's solution (T6 medium)이 들어있는 시계접시에 옮겼으며, 수란관에 배양액을 관류시켜 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 난구세포 (cumulus cell)에 싸여 있는 경우 0.1% hyaluronidase에 1분간 처리하여 난구세포를 제거하여 난자의 상태를 관찰하였다. 난자의 상태는 해부현미경 (Wild, Heerbrugg)하에서 50배 배율로 관찰하였고, 도립현미경 (Nikon, Diaphot 300)을 사용하여 200배 배율로 확인하였다. 난자의 상태는 핵막이 있는 시기 (germinal vesicle, GV), 제 1 감수분열 중기, 제 2 감수분열 중기, 퇴화, 분절화로 나누어 관찰하였고, 퇴화 또는 분절화된 난자를 비정상 난자로 구분하였다.

3. 초기배아의 발생률 관찰

배란을 유도하기 위하여 ICR 계 암컷 생쥐에 5, 20, 40 IU PMSG를 복강주사하였다. PMSG 주사 47시간 후에 human chorionic gonadotropin (hCG) 5 IU를 복강주사한 후, ICR 계 수컷 생쥐와 합사시킨 후 다음날 질전 (vaginal plug)의 유무를 조사하였으며, 교미여부는 질내 정자의 존재로 확인하였다. hCG 주사 50시간 후 경추파괴방법으로 도살하여 수란관을 적출하였고, 적출한 수란관을 전배양시킨 배양액에 넣어 배양액으로 관류시켜 2-세포기의 배아를 회수하였다. BSA가 0.4% 첨가된 T6 배양액으로 4회 세척하여 미리 준비한 배양용기의 microdrop내로 10개씩 분배하였다. 분배 후 배아의 상태를 기준으로 미수정란, 2-세포기 배아, 3-세포기 배아, 4-세포기 배아, 퇴화된 난자를 각각 확인한 후, 37℃, 5% CO_2, 95% air 배양기 (Queue 2210, Queue Systems Inc.)에서 배양하면서 24시간 간격으로 120시간까지 배아의 발생양상을 도립현미경 (Nikon, Diaphot 300)으로 관찰하였다.

4. 통계학적 유의성 검정

각 실험값들의 통계학적 유의성 검정은 ABstat (rel 6.54, Anderson-bell Co.)의 χ^2 test와 Sutudent's 't' test를 이용하였으며, p값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. PMSG를 단독 처리한 생쥐에서 체중 및 난소무게의 변화

각 실험군의 체중과 난소의 무게를 Table 1에 나타내었다. 체중은 각 실험군에서 또한 각 처리군내에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

난소의 무게는 5 IU군에서 2.88±1.14 mg, 4.36±1.63 mg, 5.30±2.38 mg, 4.74±2.11 mg, 5.54±2.88 mg, 3.81±1.45 mg으로 점진적으로 증가하여 60시간에 최고값을 나타내었다. 그리고 12시간과 24시간 사이에서 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였으며, 60시간과 72시간 사이에서 유의한 ($p<0.05$) 감소를 보였다. 20 IU군에서는 4.06±1.90 mg, 4.75±2.57 mg, 8.08±3.23 mg, 7.40±2.08 mg, 8.10±2.93 mg, 7.57±3.72 mg으로 60시간에 최고값을 나타내었고, 24시간과 36시간 사이에서 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였으나, 다른 시간군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 40 IU군에서는 3.08±0.86 mg, 5.33±1.70 mg, 5.36±2.01 mg, 8.48±1.71 mg, 7.61±2.52 mg, 6.54±3.67 mg으로 48시간에 최고값을 나타내었고, 12시간과 24시간 사이에서, 36시간과 48시간 사이에서 각각 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였다.

처리한 PMSG 농도에 따른 시간별 난소무게의 변화를 살펴보면, 12시간군에서는 20 IU군이 5 IU군에 비하여 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였다. 24시간군에서는 각 군간에 유의한 차이를 나타내지 않았고, 36시간군에서는 20 IU군이 5 IU군과 40 IU군에 비하여 유의한

Table 1. Body weights and ovary weights in mice treated with varying doses of PMSG. Data are expressed as the mean ± SD.

	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
5 IU (n=16)						
Body weight (g)	21.7 ±2.47	22.5 ±1.15	23.8 ±2.18	23.8 ±3.02	24.3 ±1.02	23.3 ±1.73
Ovary weight (mg)	2.88±1.14[a]	4.36±1.63[b]	5.30±2.38[c]	4.74±2.11[d]	5.54±2.88[e]	3.81±1.45[f]
20 IU (n=16)						
Body weight (g)	22.7 ±1.99	23.3 ±0.80	24.5 ±1.25	23.5 ±2.39	24.6 ±2.30	24.5 ±2.12
Ovary weight (mg)	4.06±1.90[g]	4.75±2.57[h]	8.08±3.23[i]	7.40±2.08[j]	8.10±2.93[k]	7.57±3.72[l]
40 IU (n=16)						
Body weight (g)	22.8 ±2.48	22.3 ±1.19	23.1 ±2.15	23.5 ±1.76	24.7 ±1.31	23.6 ±1.67
Ovary weight (mg)	3.08±0.86[m]	5.33±1.70[n]	5.36±2.01[o]	8.48±1.71[p]	7.61±2.52[q]	6.54±3.67[r]

Significancy, $p<0.05$; ab, ef, hi, mn, op, ag, ci, dj, ek, fl, dp, eq, fr, io.

($p<0.05$) 증가를 보였다. 또한 48, 60, 72시간군에서는 20 IU군과 40 IU군이 모두 5 IU군에 비하여 유의한 ($p<0.05$) 증가를 보였고, 20 IU군과 40 IU군 사이에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 난소의 무게는 전반적으로 시간이 지남에 따라 증가하다가 감소하는 경향을 보였다.

2. PMSG를 처리한 생쥐에서 배란 양상

PMSG 처리 후 시간에 따른 배란 양상을 Fig. 1에 나타내었다. 모든 실험군에서 PMSG 처리 후 12시간부터 배란이 시작되어, 5 IU군과 20 IU군은 36시간에 82.5%(7/8), 100%(8/8)로, 40 IU군은 24시간에 82.5%(7/8)로 각각 최고의 배란율을 나타내었다. 20 IU군과 40 IU군은 PMSG 처리 후 12시간부터 생쥐의 60% 이상에서 배란되었고, 5 IU군은 24시간부터 60% 이상의 개체에서 배란되었다.

3. PMSG 처리 후 배란된 난자의 성숙도

최고의 배란율이 나타난 후에 배란율이 감소한 결과로 나타나는 것은 배란된 난자의 일부가 소실되었음을 의미한다. 그러므로 각 시기의 배란 난자의 핵상 및 난자의 성숙도를 조사하였다. PMSG를 주사한 후 PMSG의 투여량과 각 시간별로 수란관에서 회수된 난자의 상태를 Fig. 2, 3, 4에 나타내었다. 퇴화된 난자의

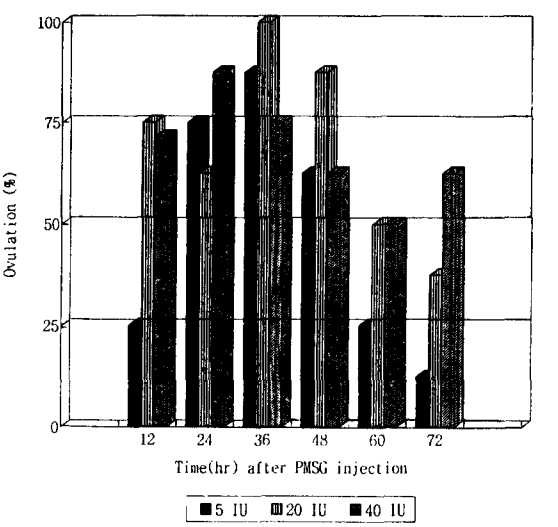

Fig. 1. Percentage of ovulated mice after injection of 5, 20, or 40 IU PMSG.

Immature mice were administered with 5, 20, or 40 IU PMSG. At every 12 hr up to 72 hr after treatment, the mice were killed by cervical dislocation and ovulation rate was assessed by counting oviductal oocytes. Data are expressed as percentage of ovulated mice per total number of treated mice (n=8).

수는 PMSG의 농도가 증가할수록, 시간이 지날수록 증가하였다.

5 IU군에서는 전체 난자 가운데 퇴화된 난자의 비율이 전시간대를 통하여 거의 일정한 비율로 유지되었으

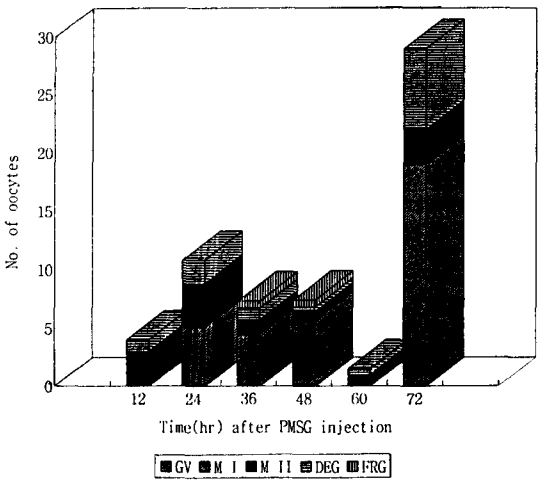

Fig. 2. Meiotic stages of mouse oocytes collected from oviducts after injection of 5 IU PMSG.

The meiotic stage of ovulated oocytes were observed on the inverted microscope. Data are expressed as mean number of ovulated oocytes /ovulated mice (GV, germinal vesicle; M I, metaphase Ⅰ; M Ⅱ, metaphase Ⅱ; DEG, degeneration; FRG, fragmentation).

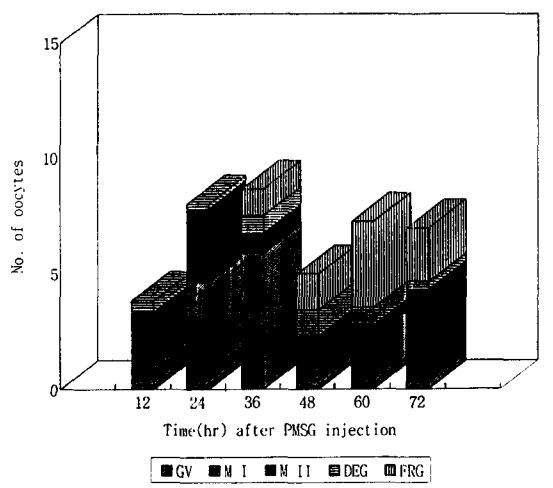

Fig. 3. Meiotic stages of mouse oocytes collected from oviducts after injection of 20 IU PMSG.

The meiotic stage of ovulated oocytes were observed on the inverted microscope. Data are expressed as mean number of ovulated oocytes /ovulated mice (GV, germinal vesicle; M I, metaphase Ⅰ; M Ⅱ, metaphase Ⅱ; DEG, degeneration; FRG, fragmentation).

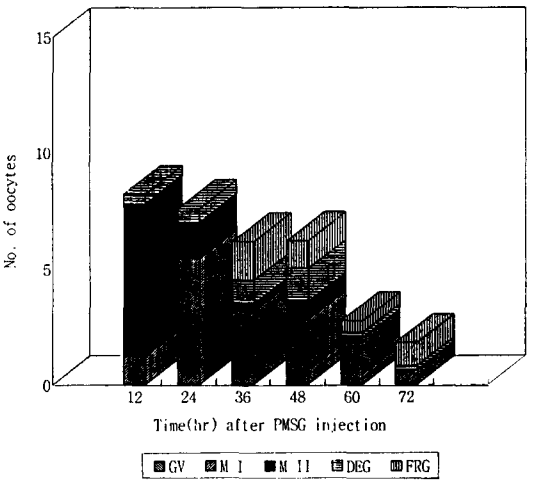

Fig. 4. Meiotic stages of mouse oocytes collected from oviducts after injection of 40 IU PMSG.

The meiotic stage of ovulated oocytes were observed on the inverted microscope. Data are expressed as mean number of ovulated oocytes /ovulated mice (GV, germinal vesicle; M I, metaphase Ⅰ; M Ⅱ, metaphase Ⅱ; DEG, degeneration; FRG, fragmentation).

나, 20 IU군과 40 IU군은 36시간부터 그 비율이 이전 시간에 비해 증가하였다. 20 IU군과 40 IU군에서 퇴화된 난자의 비율은 5 IU군에 비하여 높았으며, 20 IU군에서는 60시간째에 퇴화된 난자가 가장 높은 비율 (62.1%)을 나타내었다. 모든 실험군에서 GV상태의 난자는 극히 적었고 (9.1% 이하), 대부분의 난자는 제 1 감수분열 중기 상태였다.

4. PMSG 농도에 따른 초기 배아의 발생

1) 교미율과 2-세포기 이상 배아의 비율

PMSG에 의해 유도, 성장한 난포내 난자의 수정률과 배아 발생률을 조사하기 위하여 각 농도의 PMSG에 의해 성장, 성숙한 난포를 hCG 처리에 의해 배란을 유도하였다. hCG 처리 후 5 IU 군은 19개체, 20 IU군은 15개체, 40 IU군은 25개체를 각각 교미시켰다. 그 중에서 5 IU군은 10개체, 20 IU군은 10개체, 40 IU군은 11개

Table 2. Early embryonic development collected form the mice treated with varying doses of PMSG

	PMSG dosage		
	5 IU (n=19)	20 IU (n=15)	40 IU (n=25)
Mating rate (%)	10/19 (52.6)	10/15 (66.7)	11/25 (44.0)
Embryo recovery rate (%)	10/10 (100.0)	10/10 (100.0)	5/11 (20.0)
Total oocytes & embryos	268	262	45
No. of embryos (%)	239 (89.2) [a]	224 (85.5) [b]	18 (40.0) [c]
No. of blastocysts (%)	231 (96.7) [d]	179 (79.9) [e]	14 (77.8) [f]
No. of hatching or hatched blastocysts (%)	211 (91.3)	161 (89.9)	12 (85.7)

Significancy, $p<0.01$; ac, bc, de, df

처가 교미되어 각 군별로 52.5, 66.7, 44.4%의 교미율을 나타내었다. 이중 5 IU군과 20 IU군에서는 교미된 모든 개체에서 배아를 회수할 수 있었지만 40 IU군에서는 교미된 11개체 중에서 5개체에서만 배아를 회수할 수 있었고, 나머지 6개체에서는 난자만 회수하거나 난자도 회수할 수 없었다 (Table 2).

과배란을 유도한 후 수정되어 2-세포기로 발생한 배아의 비율을 조사하기 위하여 PMSG 주사 후 47시간에 hCG 5 IU를 주사하고 교미시킨 후 50시간째에 수란관에서 배아를 획득하여, 2-세포기 이상으로 발달한 배아의 비율을 Table 2로 요약하였다. 교미된 생쥐의 수란관으로부터 5 IU군에서는 총 268개 (26.8±16.2/개체), 20 IU군에서는 262개 (26.2±27.1/개체), 40 IU군에서는 45개 (9±2.8/개체)의 난자 또는 배아를 얻을 수 있었다. 이 중에서 2-세포기 이상인 배아의 수는 5 IU군에서는 239개, 20 IU군에서는 224개, 40 IU군에서는 18개로 그 비율은 각각 89.2, 85.5, 40.0%로 5 IU군과 20 IU군은 유의한 차이를 보이지 않았지만, 40 IU군은 5 IU군과 20 IU군에 비하여 배아 회수율이 유의하게 ($p<0.01$) 감소하였다 (Table 2).

2) 2-세포기 배아의 포배기로의 발생률

각 처리군에서 수획된 2-세포기 이상의 배아를 72시간동안 체외배양했을 때 포배로 발생하는 배아의 비율을 조사하여 Table 2에 요약하였다. 2-세포기 배아를 회수한 후 72시간에 포배기에 도달한 배아의 숫자는 5 IU군은 239개 중 231개, 20 IU군은 224개중 179개, 40 IU군은 18개 중 14개였다. 따라서 2-세포기 이상의 배아 중 포배기에 도달한 배아의 비율은 각각 96.7, 79.9, 77.8%로, 포배기에 도달한 배아의 비율은 20 IU군과 40 IU군이 5 IU군에 비하여 유의하게 ($p<0.01$) 낮았고, 20 IU군과 40 IU군 사이에는 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 2). 이 결과로 보아 일단 수정이 되고 배아가 포배기로 발생하는 과정은 5 IU 처리군보다 20 또는 40 IU 처리군보다 다소 낮았으나 발생과정에서 커다란 지연은 없는 것으로 관찰되었다.

3) 탈각률에 미치는 영향

생식소자극호르몬을 과량 처리한 생쥐에서 회수한 2-세포기 배아를 체외배양하여 포배로 발달한 배아가 탈각하는 비율을 측정하여 Table 2에 요약하였다. 2-세포기의 배아를 회수한 후 120시간에 탈각중이거나 탈각을 완료한 배아는 5 IU군은 231개 중 211개, 20 IU군은 179개 중 161개, 40 IU군은 14개 중 12개로, 포배기 배아중 각각 91.3, 89.9, 85.7%가 탈각중이거나 탈각을 완료하여 탈각률은 각 실험군간에 유의한 차이를 나타내지 않았으나 PMSG 농도가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다 (Table 2).

고 찰

본 실험의 결과로부터 PMSG 처리는 생쥐에서 주사

후 12시간째부터 배란을 일으키며, 생리적 용량인 5 IU와 20 IU 처리시 24~36시간, 40 IU 처리시 12~24시간에 가장 높은 배란율을 나타내었다. 과량의 PMSG (20 or 40 IU)를 투여했을 경우 비정상 난자의 비율이 PMSG 농도에 비례하여 증가하는 것으로 관찰되었다.

미성숙 흰쥐에서 뇌하수체를 절제한 후 PMSG에 의한 배란 양상을 조사한 실험결과에서 endogenous한 황체형성호르몬 (luteinizing hormone, LH) 분비가 PMSG 처리후 53~57 시간에 일어난다는 것이 보고되었다 (Strauss & Meyer, 1962). 또한 미성숙 흰쥐에 40 IU의 PMSG를 처리했을 때 첫번째 배란은 38~46 시간 후에 이루어지는 것으로 보고되었고 (Walton *et al.*, 1983), 20 IU 또는 40 IU의 PMSG를 처리했을 경우 첫번째 배란은 24시간 또는 36시간 후에 이루어진다는 보고가 있다 (Yun *et al.*, 1987). 그러나 본 실험에서는 미성숙 생쥐에서 첫번째 배란이 흰쥐에서보다 빠르게 PMSG 처리 후 12시간째부터 일어났으며, 5 IU군의 경우 20 또는 40 IU군의 경우와는 달리 24시간 이후에 배란율이 크게 증가하였다. 이와 같이 생쥐에서 흰쥐와는 다른 배란양상을 보인 것은 흰쥐에 비하여 생쥐 체중이 적고, 따라서 동일한 PMSG 농도임에도 상대적으로 생쥐에서는 고농도 효과를 보이기 때문으로 생각된다. 그러나 이러한 차이가 종특이적 변화일 가능성도 배제할 수 없다.

미성숙 흰쥐나 성숙 또는 미성숙 생쥐에 PMSG와 hCG를 처리하면 교미율이 증가하며 (Walton *et al.*, 1983; Elmazar *et al.*, 1989), 성숙 또는 미성숙 생쥐에서 자연배란군과 생식소자극호르몬을 투여한 과배란군에서 얻을 수 있는 착상전 배아의 수를 비교하면, 과배란군에서 더 많은 배아를 얻을 수 있다고 보고되었다 (Vogel & Spielmann, 1992). 또한 생쥐에서 소량의 PMSG (0.75~1.5 IU)를 투여한 군과 과량의 PMSG (3~10 IU)를 투여한 군을 비교하면 과량의 PMSG를 처리한 군에서 더 많은 배아를 얻을 수 있다는 보고도 있다 (Beaumont & Smith, 1975; Sato & Marrs, 1986; Shirley *et al.*, 1986; Vogel & Spielmann, 1992). 그러나 PMSG 농도는 체외수정률에 영향을 주어 PMSG 농도가 증가할수록 체외수정률이 유의하게 감소한다고 알려져 있다 (Sato & Marrs, 1986). 그러나 이러한 영향과 원인에 대한 체계적 연구가 없었다. 본 실험에서는 미성숙 생쥐를 사용하였기 때문에, 이 시기에 정상적인 방법으로 교미를 유도할 수 없으므로 PMSG 처리가 PMSG를 처리하지 않았을 때에 비해 교미율을 증가시켰는지는 확인할 수가 없었으나, PMSG 농도의 차이는 교미율에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (Table 2). 비록 각 실험군간에 교미율에는 차이가 없으나 40 IU군에서는 교미된 개체의 50% 이상에서 배아 또는 난자를 얻을 수 없었다. 또한 수란관으로부터 얻은 배아의 수는 5 IU군과 20 IU군은 유의한 차이를 보이지 않아 체내수정률에 있어 차이를 보이지 않았으나, 40 IU군에서 얻은 배아의 수는 오히려 5 또는 20 IU군에서 얻은 배아의 수보다 더 적었고, 체내수정률도 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 과량의 PMSG 처리가 난포에 나쁜 영향을 주어 배란되지 않고, 대부분의 난포가 폐쇄되어 그 수가 적은 것으로 생각되며, 그 중의 일부 난포로부터 난자가 배란되어 수정되었거나, 배란되었어도 난자의 상태가 좋지 않아 수정도 되지 않고 수란관에 머물다가 퇴화된 것으로 생각된다.

미성숙 또는 성숙 생쥐에 PMSG를 처리하여 얻은 배아의 착상전 및 후의 생존율은 자연배란군에서 얻은 배아의 생존율보다 낮아 최고 50%의 배아가 손실된다고 알려져 있으며 (Vogel & Spielmann, 1992), 임신 3일째 착상전 배아의 세포수와 mitotic index를 비교해 보면 과배란군이 자연배란군보다 적은 것으로 보고되어 있다 (Elmazar *et al.*, 1989). 배아의 손실은 대부분 착상이 이루어지기 전인 임신 2일과 4일 사이, 즉 난할이 진행되는 동안 일어나고 (Allen & McLaren, 1971; Beaument & Smith, 1975), 일부는 착상이 이루어지는 시기를 전후하여, 임신 중간에, 그리고 분만 직후에 일어난다고 보고되었다 (Edwards & Fowler, 1959). 또한 외부에서 생식소자극호르몬을 투여할 경우

그 양이 배아의 발생에 영향을 주게 된다고 알려져 왔다. 생쥐에서는 자연배란군과 PMSG를 처리한 군에서 배아를 회수할 경우, PMSG 처리군에서 퇴화되거나 분절화된 비정상 배아가 더 많이 나타날 뿐만 아니라 PMSG 투여량이 증가할수록 회수된 배아중에서 비정상 배아가 차지하는 비율이 증가하는 것으로 보고되었다 (Sato & Marrs, 1986). 본 실험에서도 각 실험군으로부터 얻은 배아의 초기발생 양상에 있어서 5 IU군이 20 IU군과 40 IU군에 비하여 포배기로의 발생률이 유의하게 높아 위의 보고들과 일치하는 결과를 보였다 (Table 2). 배아회수율에 있어 5 IU군과 20 IU군 사이에는 유의한 차이가 없었으나 배아의 발생률이 차이가 나는 것은 20 IU의 PMSG는 40 IU보다 그 영향이 약하지만 역시 난포에 좋지 않은 영향을 주어 배란되어 수정은 되었으나, 초기발생에 있어 5 IU의 PMSG를 처리한 대조군보다 발생능력이 떨어져서 발생이 진행되는 동안 퇴화된 것으로 생각된다. 그러나 탈각률에 있어서는 각 실험군간에 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 2). 이것으로 보아 일단 포배기까지 발생이 진행되면 그 이후의 발생은 PMSG에 의해 유발된 개체내의 생리적 변화가 모두 극복되거나, 또는 이러한 생리적 변화와는 상관없이 발생이 진행되는 것으로 생각된다.

결론적으로 본 실험을 통하여 미성숙 생쥐에 과량의 PMSG를 투여했을 때, 농도가 증가할수록 난소내 난포에 나쁜 영향을 주어 퇴화된 비정상 난자의 비율을 증가시키고, 배란되지 않고 퇴화되어야 할 난자의 배란을 유도하는 것으로 생각된다. 또한 5~20 IU의 PMSG는 정상적으로 배란될 난자와 배란되지 않고 퇴화될 난자를 모두 배란되도록 유도하여, 결과적으로 배란되는 난자의 수가 증대되어 과배란 현상을 나타내는 것으로 생각되며, 이들 수정란은 정상적인 초기 발생과정을 수행하는 것으로 관찰되었다. 그러나 40 IU의 PMSG는 배란 또는 수정에 나쁜 영향을 주어 회수되는 난자나 배아의 수와 질, 그리고 수정 이후의 발생률이 감소되는 것으로 사료된다.

요 약

미성숙 생쥐에 5, 20 또는 40 IU의 PMSG를 처리한 후 수란관에서 난자를 회수하여 배란양상과 난자의 상태를 관찰하였다. 그리고 5, 20 또는 40 IU의 PMSG를 처리하여 회수한 배아의 발생양상을 관찰하였을 때 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PMSG 처리 후 난소의 무게는 5, 20 IU군에서는 60시간에, 40 IU군에서는 48시간에 최고값을 나타내었으며 시간의 증가에 따라 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. 그리고 처리 후 12시간부터 배란이 시작되어 5, 20 IU군에서는 36시간에, 40 IU군에서는 24시간에 최고의 배란율을 나타내었다.
2. PMSG 처리 후 회수된 비정상 난자의 비율은 5 IU 군에서는 전시간대를 통하여 일정하게 유지되었으나, 20 또는 40 IU 군에서는 36시간 이후 크게 증가하였고, 5 IU 군에 비하여 그 비율이 높았다.
3. 각 실험군에서 52.5, 66.7, 44.4%의 교미율을 보여 유의한 차이를 보이지 않았으나 40 IU 군에서는 교미된 11개체 중 5개체에서만 배아를 회수할 수 있었다.
4. 각 실험군에서 89.2%(239/268), 85.5% (224/262), 40.0% (18/45)의 배아회수율을 보여 40 IU 군이 5 또는 20 IU 군에 비해 유의하게 감소하였고, 2-세포기 이상의 배아중 포배기 까지 발생한 배아의 비율은 96.7% (231/239), 79.9% (179/224), 77.8% (14/18)로 20 또는 40 IU 군이 5 IU 군에 비하여 유의하게 감소하였다. 그리고 각 실험군이 91.3% (211/231), 89.9% (161/179), 85.7% (12/14)의 탈각률을 보여 각 실험군이 유의한 차이를 보이지 않았다.

인용문헌

Allen J, McLaren A (1971): Cleavage rate of mo-

use eggs from induced and spontaneous ovulation. J Reprod Fertil 27:137-140.

Armstrong DT, Evans G (1983): Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology 19:31-42.

Beaumont HM, Smith AF (1975): Embryonic mortality during the pre- and post-implantation periods of pregnancy in mature mice after superovulation. J Reprod Fertil 45:437-448

Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG (1971) : The culture of mouse embryo *in vitro*. In: Daniel JC (ed.) Methods in Mammalian Embryology. Freeman, San Francisco, pp 86-116.

Braw RH, Tsafriri A (1980): Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. J Reprod Fertil 59:267-272.

Byscov AG (1978): Folliular atresia. In:Jones RE (ed.) The Vertebrate Ovary. Plenum Publishing Corporation, New York, pp 535-562.

Chiras DD, Greenwald GS (1978): Ovarian follicular development in cyclic hamster treated with a superovulatory dose of Pregnant Mares' Serum. Biol Reprod 19:895-901.

Edwards RG, Fowler R (1959): Foetal mortality in adult mice after superovulation with gonadotropin. J Exp Zool 41:299-322.

Elmazar MM, Vogel R, Spielmann H (1989): Maternal factors influencing development of embryos from mice superovulated with gonadotropins. Reprod Toxicol 3:135-138.

Evans G, Robinson TJ (1980): The control of fertility in sheep: Endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. J Agricul Sci Camb 94:69-88.

Hage AJ, Groen-Klevant AC, Welschen R (1978): Follicle growth in immature rat ovary. Acta Endocr Copenh 88:375-382.

Hamelstein-Braw R, Byscov AG, Peters H, Faber M (1976): Follicular atresia in the infant human ovary. J Reprod Fertil 46:55-59.

Harman SM, Louvet JP, Ross GT (1975): Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia. Endocrinology 96:1145-1152.

Miller BG, Armstrong DT (1981a): Superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin cause delayed implantation and infertility in immature rats. Biol Reprod 25: 253-260.

Miller BG, Armstrong DT (1981b): Effects of superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol and progesterone levels and early embryo development in immature rats. Biol Reprod 25:261-171.

Nuti KM, Sridharan BN, Meyer RK (1975): Reproductive biology of PMSG-primed immature female rats. Biol Reprod 13:38-44.

Peters H (1979): Some aspects of early follicular development. In:Midgley AR, Sadler WA(ed) Ovarian Follicular Development and Function. New York: Raven Press, pp 1-13.

Peters H, Byscov AG, Himelstein-Braw R, Faber M (1975): Follicular growth:The basic event in mouse and human ovary. J Reprod Fertil 45:559-566.

Sato F, Marrs RP (1986): The effect of pregnant mare serum gonadotropin on mouse embryos fertilized *in vivo* or *in vitro*. J *In Vitro* Fertil Emb Trans 3:353-357.

Shirley B, Wortham JW, Condon-Mahony M (1986): Mating and embryo yield of mice in-

jected with gonadotropins on specific days of the estrous cycle and in acyclic periods. Exp Biol 46:83-88.

Tsafriri A, Braw R (1984): Experimental approach to atresia in mammals. Oxford Rev Reprod Biol 6:226-265.

Turnbull KE, Braden AWH, Mattner PE (1977): The pattern of follicular growth and atresia in the bovine ovary. Aust J Biol Sci 30:229-241.

Vogel R, Spielmann H (1992): Genotoxic and embryotoxic effects of gonadotropin-hyperstimulated ovulation in murine oocytes, preimplantation embryos, and term fetuses. Reprod Toxicol 6:329-333.

Walton EA, Armstrong DT (1982): Implantation and later fetal development in immature rats given a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin, later neutralized by antiserum. Biol Reprod 27:841-846.

Walton EA, Evans G, Armstrong DT (1983): Ovulation response and fertilization failure in immature rats induced to superovulate. J Reprod Fertil 67:91-96.

Weir BJ, Rowlands JW (1977): Ovulation and atresia. In Zuckerman S and Weir BJ (eds) The Ovary, Vol. 1, Academic Press, New York, pp 265-301.

Yoon YD (1990): Mechanism of follicular atresia: (I) Morphological and functional changes, Kor J Embryo Transfer 5:1-20.

Yun YW, Yuen BH, Moon YS (1987): Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin on oocyte quality and ovulatory and steroid hormone responses in rats. Gamete Res 16:109-120.