

## 동자개 (*Pseudobagrus fulvidraco*)의 난모세포 성숙과 배란에 대한 스테로이드와 HCG의 *in vitro* 효과

임상구 · 백혜자\* · 한창희  
 동의대학교 생물학과, \*국립수산진흥원 어류양식과

### Effects of Steroids and HCG on *in vitro* Maturation and Ovulation of Oocyte in Banded Catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*

Sang-Koo LIM, Hea-Ja BAEK\* and Chang-Hee HAN

Department of Biology, Donggeui University, Pusan 614~714, Korea

\*Aquaculture Division, National Fisheries Research and Development Agency,

Kijang-gun, Pusan 619~900, Korea

The aim of this study was to determine the effect of steroids and human chorionic gonadotropin (HCG) on *in vitro* maturation and ovulation of oocyte in *Pseudobagrus fulvidraco*. Oocytes were incubated in the media Leibovitz L15 supplemented with the various concentration of  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha20\beta$ OHP),  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone ( $17\alpha$ OHP), progesterone ( $P_4$ ), estradiol- $17\beta$  ( $E_2$ ) and HCG.

After 60 hours incubation, the maturation ability of oocyte was assessed by the appearance of germinal vesicle breakdown (GVBD). GVBD was significantly enhanced by the addition of  $17\alpha20\beta$ OHP,  $17\alpha$ OHP,  $P_4$  and HCG ( $P < 0.05$ ). The highest GVBD was observed when  $17\alpha20\beta$ OHP and HCG were supplemented to media. When oocytes were cultured for 16 hours in media containing 10~1,000 ng/ml  $17\alpha20\beta$ OHP,  $17\alpha$ OHP and  $P_4$ , the rate of GVBD in oocytes cultured in the medium supplemented with 100 ng/ml  $17\alpha20\beta$ OHP (65%) was significantly higher than that with  $17\alpha$ OHP (40%) and  $P_4$  (35%). The effects of  $17\alpha20\beta$ OHP and HCG on GVBD were assessed by various concentration of these hormones. When oocytes were cultured for 60 hours in various media containing 1~1,000 ng/ml  $17\alpha20\beta$ OHP or 5~1,000 IU/ml HCG, the GVBD of oocytes was significantly increased in the medium with 10~100 ng/ml  $17\alpha20\beta$ OHP and 500 IU/ml HCG. When oocytes were cultured in the various media supplemented with 1~1,000 ng/ml  $17\alpha20\beta$ OHP or 5~1,000 IU/ml HCG for 60 hours, the media with 1~100 ng/ml  $17\alpha20\beta$ OHP or 50~1,000 IU/ml HCG significantly increased in the rate of ovulation. However supplementation with 1,000 ng/ml  $17\alpha20\beta$ OHP or 5 IU/ml HCG did not improve the rate of ovulation compared to controls.

This results indicate that supplementation of steroid and HCG except  $E_2$  can improve the *in vitro* maturation and ovulation of oocyte in *P. fulvidraco*; HCG and  $17\alpha20\beta$ OHP may be more effective than other steroids on oocyte maturation and ovulation in *P. fulvidraco*.

Key words : banded catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*, HCG, steroid, GVBD, ovulation, *in vitro*

### 서 론

경골어류에 있어서 난모세포의 최종성숙과 배란은 뇌하수체의 전엽에서 분비되는 생식소자극호르몬 (gonadotropin)의 통제하에 있으며, 난포에서 분비되는 여러 가지 성 스테로이드 호르몬들에 의하여 직간접적으로 조절되고 있다 (Goetz, 1983). 난 성숙 과정은 이러한 성 호르몬에 의하여, 배란 전에 난핵포붕괴 (germinal vesicle breakdown, GVBD), 세포질 응축, 제1극체 방출 등이 일어나며, 이러한 과정은 성공적인 수정을 위해 필수적이다 (Nagahama, 1987). 따라서 GVBD를 포함하는 난모세

포의 성숙은 11-deoxycorticoids 나 progestogens (Goetz, 1983)에 의해 유도되어지고,  $C_{21}$  스테로이드, 특히  $20\beta$ -hydroxyl group에서 매우 효과적이며, 그들 중에서  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha20\beta$ OHP)이 가장 효과적인 스테로이드라고 알려져 있다 (Scott and Canario, 1987). 그리고 연어류와 잉어과 어류에서도  $17\alpha20\beta$ OHP가 난모세포 2차 조정 인자인 성숙유도물질로 알려져 있다 (Goetz, 1983; Nagahama et al., 1983; Scott and Canario, 1987; Canario and Scott, 1988). 그러나  $C_{18}$ 과  $C_{19}$  스테로이드에서 난모세포성숙에 비효과적이라고 알려진 어종들은, 무지개 송어 (Jalabert, 1976), 강 송어 (Duffey

and Goetz, 1980), 메기 (Goswami and Sundararaj, 1974) 등이 있으며, C<sub>19</sub> 스테로이드는 testosterone에서 단지 높은 농도에서 난모세포 성숙이 유도되었다고 알려져 있다 (Pankhurst, 1985).

이들 성 스테로이드 호르몬들의 성 성숙 유도에 대한 효과는 난생 경골 어류에서는 priniformes와 siluriformes (Nagahama and Adachi, 1985; Canario and Scott, 1988), 대서양 민어 (Trant et al, 1986; Trant and Thomas, 1988), dab와 홍가자미 (Canario and Scott 1987, 1990), 무지개 송어, northern pike와 금붕어 (Jalabert, 1976), 등에서 연구되어져 왔으며, 태생 경골어류에서는 불락류 (Takemura et al, 1989) 등 많은 어종에서 보고가 되어 왔다. 그리고 HCG는 어류 난소의 최종 성숙과 배란 그리고 산란유도에 있어서 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 모두 효과적이라고 알려져 있으며, 값이 싸고 이용이 간편하여 인위적인 성성숙과 배란유도에 널리 사용되고 있다 (Goetz, 1983; Donaldson and Hunter, 1983). 그러나 이들의 성 성숙 유도 물질들을 사용하여 유용 대상 어류의 인위적인 성숙과 배란을 효과적으로 조절하기 위해서는 대상 어류의 최종성숙과 배란을 유도할 수 있는 각 호르몬들의 적정 농도 범위를 구명하여야 하며, 또한 이들 호르몬들의 작용 메카니즘을 밝혀야 한다.

본 연구에서는 실험실 또는 수조내에서 자연산란이 되지 않아 종묘 생산에 어려움이 많은 동자개 (*Pseudobagrus fulvidraco*)를 대상으로 인위적인 난모세포 최종성숙과 배란유도를 위하여 C<sub>21</sub>-steroid인 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17 $\alpha$ OHP), progesterone (P<sub>4</sub>)와 C<sub>19</sub>-steroid인 estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), 그리고 단백질성 호르몬인 human chorionic gonadotropin (HCG)에 대하여 난모세포의 최종성숙과 배란유도에 대한 각 호르몬들의 작용을 난황형성을 완료한 난모세포의 *in vitro* 실험에서 최종성숙과 배란에 대한 각 호르몬들의 농도별 효과를 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

성숙 및 산란기인 6월에서 7월사이 3년생 암컷 동자개를 전남 영산강 지류에서 채집하여, 일정 기간 사육하면서 복부가 팽대된 것을 실험어로 사용하였다. 실험어들의 전장은 14.8~15.5 cm, 체중은 36~42 g이었으며, GSI는 16.5~17.2%이었다.

### 난모세포 분리 및 배양

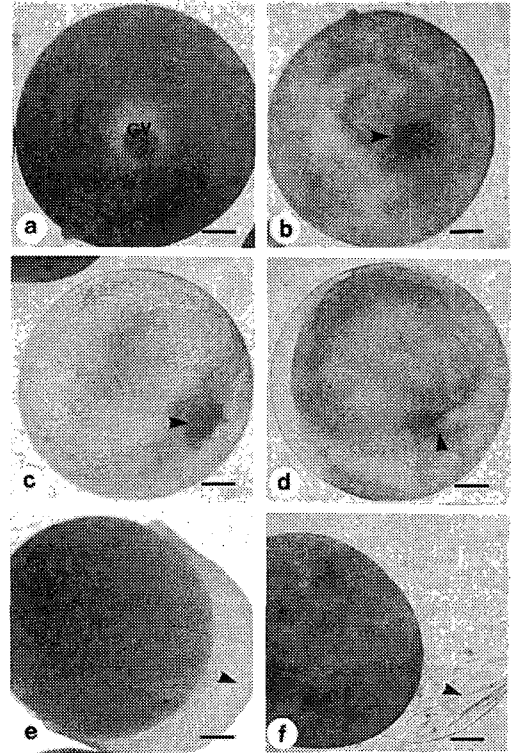


Fig. 1. Photomicrographs of banded catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*) oocyte during the course of hormones-induced oocyte maturation (b-d) and ovulation (e-f) *in vitro*. All oocytes were treated with a "clearing" fixative prior to observation. a, "Fullgrown" oocytes prior to incubation, germinal vesicle (GV) was positioned in the center of the oocyte and small lipid droplets surround a slightly eccentric germinal vesicle. b, The GV (an arrow) is on the surface of the coalesced lipid droplet approximately one-half the distance from the oocyte center. c-d, Oocytes in which the GV (an arrow) has migrated to surface of the oocyte and is beginning to spread laterally. e, Oocytes having undergone GVBD and beginning ovulation (an arrow). f, Ovulated oocytes (an arrow). Bars, 0.25 mm.

실험어는 ethyl 4-aminobenzoate로 마취시킨 후, 난황형성 직후의 난소 조직을 절취하여 TBSS (trout balanced salt solution), (Jalabert and Fostier, 1984)로 세척한 후 난소를 절단하여 더 작은 난소 조직으로 분리하였다. 결합조직과 혈관을 제거한 뒤 가는 핀셋으로 난모세포들을 하나씩 분리한 후 투명액 (ethanol : formaline : glacial acetic acid=6 : 3 : 1), (Stoeckel and Neves, 1992)으로 투명화 시킨 후 난핵포 (germinal vesicle, GV)의 위치를

확인하여 난황형성이 완료되었다고 판단되는 직경 1.64~1.68 mm 전후의 불투명한 알들로 GV가 거의 중앙에 위치한 난모세포를 분리하여 사용하였다 (Fig. 1, a). 모든 실험 과정 동안 사용되는 모든 기구는 고압증기로 멸균시킨 후 사용하였으며, 난모세포는 무균상태의 clean bench 속의 얼음조각 위에서 분리하였고, 24 ± 1°C에서 배양되었다. 그리고 모든 실험기는 동일한 어미로부터 얻어진 알들을 사용하여 3회 반복 실험을 하였다.

난모세포들은 20개씩 각 well (6-well plate)로 옮겨져 호르몬을 농도별로 투여한 Leibovitz L15 액으로 배양한 후, GVBD와 배란여부를 현미경하에서 관찰하였다. GVBD상태의 판정은 난모세포의 난핵이 동물극쪽으로 이동하면서 세포질이 점점 투명화되는 시기로 정하였으며, 난모세포가 여포로부터 방출되어 세포질이 투명하게 되었을 때를 배란시기로 정하였다. 난모세포의 GVBD와 배란과정은 Fig. 1에 나타내었다.

**호르몬**

실험에 사용된 4종의 스테로이드인 17α20βOHP, 17αOHP, P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>와 단백질성 호르몬인 HCG는 모두 Sigma 제로, 이중 스테로이드는 에탄올 농축액으로 냉동 보관하여 사용 직전 질소 가스로 건조시킨 뒤 사용하였다. 스테로이드 호르몬의 농도는 1, 10, 100, 1,000 ng/ml, HCG 농도는 5, 50, 500, 1,000 IU/ml로 각 농도에 대하여 16, 20, 24시간 또는 60시간 배양 후 최종성숙과 배란이 일어난 난모세포의 비율을 조사하였다. 실험에 사용된 TBSS과 배양액은 pH 7.6~7.7, 삼투압 305~310 mOsm로 조절한 후 millipore filter (0.22 μm)로 여과시켰다.

**통계학적 분석**

실험 결과는 Duncan's multiple range test와 Dunnett's test를 사용하여 분석하였으며, 모든 실험에 대한 유의수준은 P<0.05로 하였다.

**결 과**

**실험 1.**

스테로이드 호르몬인 E<sub>2</sub>, progestogen 그리고 단백질성 호르몬인 HCG의 난모세포에 대한 성숙유도 효과를 확인하기 위하여 난모세포의 GVBD에 대한 효능을 농도별로 실험한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

호르몬 자극에 대한 난성숙 반응에서 progestogens은 사용한 모든 농도에서 동자개의 난성숙 유도에 효과가 있었지만 E<sub>2</sub>는 영향을 끼치지 않음을 알 수 있었다.

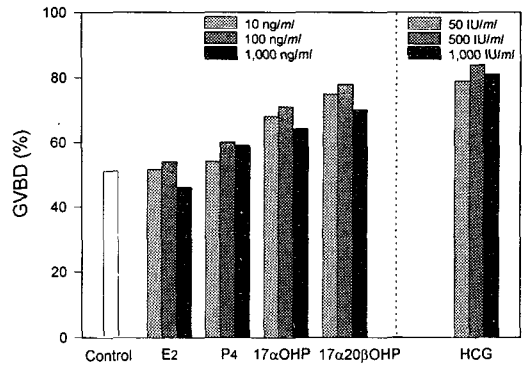


Fig. 2. The effects of 17α20βOHP, 17αOHP, P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> and HCG on *in vitro* maturation of oocyte in *Pseudobagrus fulvidraco*. Values represent the mean of two replicate incubation (20 oocyte/ml/well, incubated for 60 hours at 24 ± 1°C).

Progestogens중 17α20βOHP는 10과 100 ng/ml 농도에서 GVBD가 일어난 난모세포의 비율은 각각 75 ± 2.0%와 78 ± 3.5%로 대조구 51 ± 2.3%에 비하여 유의한 유도효과를 보였으며, 17αOHP 역시 10과 100 ng/ml에서 각각 68 ± 2.0%과 71 ± 1.2%로 GVBD 유도효과를 보였다. 그리고 P<sub>4</sub>은 저농도인 10 ng/ml에서 비효과적이었으나, 100과 1,000 ng/ml에서는 GVBD가 일어나는 난모세포의 비율이 각각 60 ± 1.0%과 58 ± 3.3%로 GVBD 유도에 효과적이었다. 한편 E<sub>2</sub>는 모든 농도에서 낮은 반응을 보여 GVBD에 비효과적임을 알 수 있었다. HCG는 5, 500, 1,000 IU/ml에서 각각 79 ± 2.3%, 81 ± 1.0% 그리고 84 ± 2.3%로 유의한 GVBD 유도효과를 보였다.

**실험 2.**

분리된 난모세포를 대상으로 알의 최종성숙 유도에 효과가 높은 3종의 스테로이드 호르몬들의 GVBD 유도효과를 농도별, 시간별로 실험하였다 (Fig. 3). 17α20βOHP는 16시간 후 대조구 5%에 비하여 GVBD가 일어난 난모세포의 비율은 높은 농도 100과 1,000 ng/ml에서 각각 65 ± 1.0%와 60 ± 1.2%로 가장 빠른 GVBD 유도효과를 나타내었다. 17αOHP는 100 ng/ml에서 40 ± 2.9%로 GVBD에 효과적인 반면 10과 1,000 ng/ml에서는 각각 4%, 6%로 대조구 5%와 비슷한 GVBD 유도효과를 나타내었다. P<sub>4</sub>는 100과 1,000 ng/ml에서 각각 35 ± 3.2%와 22 ± 2.0%의 GVBD 유도효과를 보인 반면, 10 ng/ml에서는 7%의 유도효과를 보였다. GVBD 유도 20시간 후에 100 ng/ml에서는 3종의 스테로이드 모두에서 대조구의 31 ±

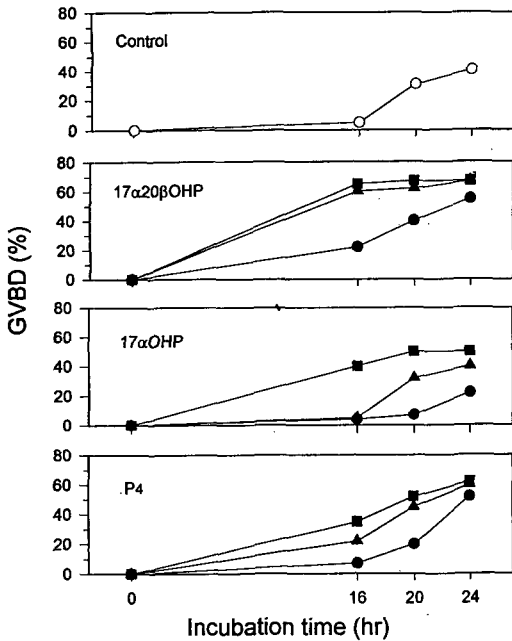


Fig. 3. The effects of 17α20βOHP, 17αOHP and P<sub>4</sub> on *in vitro* maturation rate of oocytes in *Pseudobagrus fulvidraco*. Each percentage represents GVBD according to maturation time. Values represents the mean of three replicate incubations (20 oocytes/ml/well, incubated for 24 hours at 24 ± 1°C). ○ control, ● 10 ng/ml, ■ 100 ng/ml, ▲ 1,000 ng/ml.

2.0%에 비하여 50% 이상으로 유의한 GVBD 유도효과를 나타내었으며, 특히 17α20βOHP는 1,000 ng/ml에서 62 ± 1.3%로 가장 높은 GVBD 유도효과를 나타내었다. 17αOHP는 10과 1,000 ng/ml에서 각각 7%와 32%의 값을 나타내어 낮은 GVBD 유도효과를 나타내었다. P<sub>4</sub>는 1,000 ng/ml에서 45 ± 2.0%로 대조구와 비슷한 GVBD 유도효과를 나타내었으며, 10 ng/ml에서는 20%로 GVBD에 비효과적임을 알 수 있었다.

24시간에 대한 농도별 GVBD 유도효과는 17α20βOHP가 100과 1,000 ng/ml 농도에서 대조구 41 ± 2.3%에 비하여 둘 다에서 67%로 가장 높은 GVBD 유도효과를 나타내었으며, 1,000 ng/ml 농도에서도 유의한 GVBD 유도효과가 있었다. 17αOHP는 100 ng/ml 농도에서 50 ± 1.3%로 유의한 GVBD 유도효과를 나타내었으나, 10과 1,000 ng/ml 농도에서는 각각 22 ± 2.4%와 40 ± 1.3%로 대조구에 비하여 GVBD유도에 비효과적임을 알 수 있었다. P<sub>4</sub>는 10, 100과 1,000 ng/ml 농도에서 각각 52 ± 2.0%, 60 ± 1.5%, 62 ± 1.3%로 대조구에 비하여 앞의 모든 농도에서 유의한 GVBD 유도효과가 있음을 알 수 있었다.

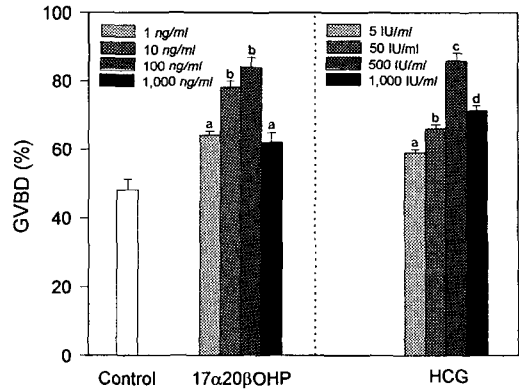


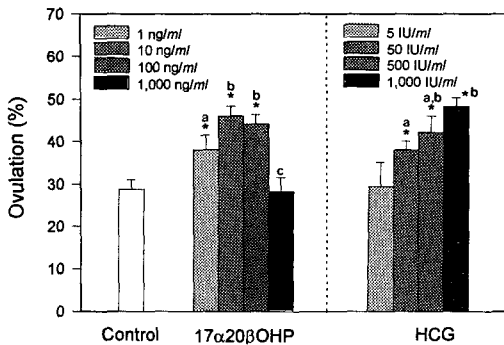
Fig. 4. The effect of 17α20βOHP and HCG on *in vitro* GVBD of oocytes in *Pseudobagrus fulvidraco*. Value represents the mean ± SEM of three replicate incubation (20 oocytes/ml/well, incubated for 60 hours at 24 ± 1°C). Asterisks denote means significantly different from all other values. a-d, Within each treatment, values with different letters are significantly different (P<0.05).

실험 3.

GVBD에 효과적인 progestogen 중 가장 효과적인 17α20βOHP와 일반적으로 GVBD에 효과적이라고 알려진 HCG의 GVBD 유도효과에 대한 적정 농도 한계를 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. 17α20βOHP (1, 10, 100, 1,000 ng/ml)와 HCG (5, 50, 500, 1,000 IU/ml)농도 모두에서 대조구의 48 ± 3.2% 보다 유의한 GVBD 유도효과를 나타내었으며, 17α20βOHP는 다음 농도 1, 10, 100, 1,000 ng/ml에 대하여 각각 64 ± 1.2%, 78 ± 2.0%, 84 ± 2.9%, 그리고 62%로 나타났으며, HCG는 5, 50, 500, 1,000 IU/ml 농도에 대하여 GVBD효과는 59 ± 1.0%, 66 ± 1.2%, 86 ± 2.3% 그리고 71 ± 1.5%의 GVBD 유도효과를 나타내었다. 따라서 17α20βOHP의 100 ng/ml와 HCG에서의 500 IU/ml에서 가장 높은 GVBD 유도효과를 나타낸 반면, 17α20βOHP와 HCG에서 각각 1,000 ng/ml와 5 IU/ml에서 가장 낮은 GVBD 유도효과를 나타내었다.

실험 4.

난경 1.6~1.8 mm인 난세포를 대상으로 17α20βOHP와 HCG에 대한 배란유도 효과를 농도별로 실험한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 17α20βOHP는 1, 10, 100 ng/ml 농도에서 각각 38 ± 3.5%, 46 ± 2.3% 그리고 44 ± 2.3%로 대조구 28 ± 1.3%에 비하여 유의한 배란유도 효과를 나타낸 반면 1,000 ng/ml에서는 28 ± 3.5%로 배란유도에 비효과적이었다. HCG는 50, 500, 1,000 IU/ml에서 각각 38



**Fig. 5.** The effects of 17α20βOHP and HCG on *in vitro* ovulation of the *Pseudobagrus fulvidraco*. Each value represents the mean ± SEM of three replicate incubations (20 oocytes/ml/well, incubated for 60 hours at 24 ± 1°C). Asterisks denote means significantly different compared to control group. a-c, Within each treatment, values with different letters are significantly different (P<0.05).

± 2.0%, 48 ± 2.3%, 그리고 42 ± 4.0%로 대조군 28%에 비하여 유의한 배란유도 효과를 나타낸 반면, 낮은 농도 5 IU/ml에서는 배란유도에 비효과적이었다. 따라서, 배란유도 효과는 17α20βOHP와 HCG에서 각각 10 ng/ml과 1,000 IU/ml에서 가장 높은 배란유도 효과를 보였다.

## 고 찰

어류의 난성숙과 배란유도에 대한 연구는 많이 있어 왔으며 (Jalabert, 1976; Goetz, 1983; Pankhurst, 1985; Canario and Scott, 1990; Wallace et al., 1993), 인위적인 난성숙과 배란을 유도하기 위한 호르몬 적정 투여량과 난성숙 시간 등의 계획으로 양질의 수정란을 얻는다면 훨씬 경제적인 것이다. 따라서 성성숙에 관여하는 호르몬 종류 및 그들의 역할과 이들 상호간의 조절 메카니즘의 이해가 필요하다. 어류의 난모세포의 성숙에 관한 앞의 많은 보고들에서 보면 20β-hydroxylated 스테로이드는 일반적으로 20α-hydroxylated나 20-keto 스테로이드 그리고 5β-reduced 스테로이드 보다 효과적이라고 알려져 있으며, 이에 대한 유사한 결과는 연어과 어류, *Salmo gairdneri* (Canario and Scott, 1988), yellow perch, *Perca flavescens* (Goetz and Bergman, 1978; Goetz and Theofan, 1979), killifish, *Fundulus heteroclitus* (Greeley et al., 1986), 대서양민어, *Micropogonias undulatus* (Trant and Thomas, 1988), 송어, *Mugil cephalus* (Wanshu and Thomas, 1987), 금붕어, *Carassius auratus* (Jalabert, 1976; Nagahama et al., 1983)에서 보고되고 있다. 몇몇 연구들에서는 21-hy-

droxyl과 20β-hydroxylated group 둘 다를 포함하는 스테로이드를 실험에 이용하였다.

호르몬 효능에 대한 HCG와 스테로이드의 농도별 실험에 대한 결과로 동자개는 C<sub>21</sub> group에서는 반응 효과가 있는 반면, esteroegen에서는 비효과적이라고 생각되었다. 일반적으로 esteroegen과 androgen은 난모세포에서 최종 성숙 유도에 비효과적이라고 알려져 있지만 (Goetz, 1983), 일본산 송사리인 medaka에서는 estradiol이 GVBD에 효과적인 것으로 보고하였으나 (Hirose, 1976), 같은 실험에서 Iwamatsu (1978)은 아무런 효과가 없다고 보고하였다. 동자개에서 E<sub>2</sub>는 최종성숙 유도 실험에서 대조군과 값의 차이가 거의 없는 것으로 보아 GVBD 유도에 중요한 스테로이드가 아닌 것으로 생각되었다. C<sub>21</sub> 스테로이드의 난성숙 유도에 대한 역할은 많은 어종에서 연구가 있었으며, 17α20βOHP가 가장 효과적인 스테로이드로 알려져 있다. C<sub>21</sub> 스테로이드 분자중 20β-hydroxyl group은 난모세포 성숙을 활성화시키는 데 가장 큰 효과를 가진다고 보고하였다. 그 다음 중요한 분자는 17α position이다 (Greeley et al., 1986). 무지개 송어에서는 11-oxygenated corticosteroids가 난성숙 유도에 비효과적인 (Jalabert, 1976) 반면, 몇몇 어종에서는 효과적이라고 보고된 바 있다 (Goswami and Sundararaj, 1974).

Progestogens중에서 17α20βOHP가 가장 효과적인 스테로이드라고 알려져 있으며 (Goetz, 1983; Scott and Canario, 1987), 동자개의 난성숙 유도 결과 P<sub>4</sub>와 이의 유도체인 17αOHP, 17α20βOHP 중에서 17α20βOHP가 반응이 가장 높은 것으로 보아 난모세포의 최종 성숙유도에 17α20βOHP가 중요한 스테로이드라고 생각되었다 (Fig. 2).

동자개 난성숙 반응 속도는 17α20βOHP에서 16시간후부터 유효한 성숙 반응효과가 보였으며 그후 점진적인 증가를 나타내며, P<sub>4</sub>, 17αOHP에서보다 17α20βOHP가 가장 빠른 속도로 반응 효과를 나타내었다. 다른 경골어류의 난모세포 성숙과정의 시간에 대한 직접적인 연구는 찾아보기 힘들다. 이것은 아마 성숙의 정확한 개시 시간과 형태학적 단계를 정의하는 데 어려움이 있기 때문일 것이다 (Masui and Clarke, 1979). 배양 기간은 난모세포 배양온도가 21°C~26°C일 때 일반적으로 최소한 24~36시간 배양하였고, 록베스, *Ambloplites rupestris* (Goetz and Cetta, 1985), 대서양민어 (Trant and Thomas, 1988), medaka, *Oryzias latipes* (Iwamatsu, 1980) 또한, 배양온도 10~18°C에서는 최소한 48~96시간이 소요되었다 (Wallace and Selman, 1978; Pankhurst, 1985; Canario and Scott, 1990). 따라서 난모세포 성숙과정에 있어서 온도에 대한 시간이 성숙에 가장 중요한 요소중 하나임이 분명

하다고 생각되어진다. 본 종은 24°C에서 농도에 따라 차이를 보이지만 16시간 후에 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP가 GVBD에 가장 빠른 반응속도를 나타내었다 (Fig. 3).

HCG와 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP의 농도별 GVBD 유도효과를 *in vitro*에서 알아보기 위한 비교 실험에서는 정확한 농도를 결정하기가 쉽지는 않지만, 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP에서 동자개는 10~100 ng/ml로 무지개송어의 5~90 ng/ml 농도로 비슷하며, 따라서 비교적 낮은 농도에서 GVBD에 효과적이었다. 반면, goldeye, *Hiodon alosoides*에서 100~600 ng/ml와 snook, *Centropomus undecimalis* 등에서 600 ng~1  $\mu$ g/ml 정도로 높은 농도에서 효과적이었다. 또한 무지개 송어와 대서양 연어는 자연에서의 성숙과 산란기간 중 혈중 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP의 최고 값은 각각 320 ng/ml과 70~80 ng/ml으로 보고되었다 (Fostier and Jalabert, 1986; Fitzpatrick et al., 1986).

HCG에서도 마찬가지로 종에 따라 *in vitro*에서 다양한 결과를 보여 주고 있는데 goldeye에서 10~500 IU/ml가 GVBD 유도에 효과적이었으며, 청보리멸, *Sillago japonica*에서는 100~1000 IU/ml로서 동자개 100~1,000 IU/ml와 동일한 농도에서 반응 효과가 있었다 (Fig. 4).

난모세포의 배란유도에 있어서 gonadotropin과 스테로이드에 대한 *in vitro* 연구에서 yellow perch (Goetz and Bergman, 1978; Goetz and Theofan, 1979), medaka (Hirose, 1971) 그리고 goldeye (Pankhurst, 1985) 등에서는 배란유도가 쉬운 반면, 배란이 어려운 것은 gonadotropin 혹은 스테로이드 그리고 gonadotropin과 스테로이드 (Jalabert et al., 1978; Goetz, 1983; Goetz et al., 1987; Canario and Scott, 1990) 또는 prostaglandin의 적당한 분비가 없는 것과 관련이 있을 것이다 (Goetz et al., 1987). HCG에 대한 연구는 값이 싸고 사용이 편리하여 *in vivo*와 *in vitro*에서 난성숙과 배란을 유도하는 데 널리 사용되며, 분자량이 25,000~40,000 dalton인 당이 풍부한 단백질호르몬이다. 이러한 HCG와 어류에서 최초로 분리 동정된 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP를 사용하여 배란유도를 위한 농도별 실험 결과 HCG는 50~1,000 IU/ml에서, 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP는 1~100 ng/ml에서 유의한 반응효과가 나타났다. 반면, HCG는 낮은 농도 (5 IU/ml)에서 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP는 높은 농도 (1,000 ng/ml)에서 비효과적인 것으로 나타났다. 결과적으로 HCG와 17 $\alpha$ 20 $\beta$ OHP는 난모세포의 성숙유도에 효과가 큰 것으로 생각되며, 난모세포의 여러 발달 단계에서 보면 난모세포 성숙과 배란은 난모세포의 크기와 핵 이동 정도에 따라서도 차이가 있는 것으로 보여진다.

## 요 약

동자개 난모세포의 성숙과 배란에 있어 스테로이드와 HCG (human chorionic gonadotropin)의 효과에 대한 실험이 *in vitro*에서 이루어졌으며, 난모세포들은 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17 $\alpha$  OHP), progesterone (P<sub>4</sub>), estradiol-17 $\alpha$  E<sub>2</sub>)과 HCG가 첨가된 Leibovitz L15 배지에서 성숙되어졌다. 60시간 배양후에 난모세포의 성숙능력은 난핵포붕괴(geminal vesicle breakdown, GVBD) 비율에 의해 평가되었다. GVBD 비율은 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP, 17 $\alpha$  OHP, P<sub>4</sub> 그리고 HCG의 첨가에 의해 유의하게 (P<0.05) 증가하였으며, 그 중 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP HCG에서 가장 높은 GVBD 비율을 보였다. 난모세포들 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP, 17 $\alpha$  OHP, P<sub>4</sub>가 10~1,000 ng/ml 포함된 배지에서 16시간 배양한 결과, 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP 10~100 ng/ml (65%)의 GVBD 비율은 17 $\alpha$  OHP (40%)와 P<sub>4</sub> (35%)에서 보다 나은 효과를 보였다. GVBD유도에 대한 효과는 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP에서 10~100 ng/ml배지, HCG를 첨가하여 60시간 배양한 배란유도 실험에서 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP 10~100 ng/ml에서, HCG는 50~500 IU/ml의 배지에서 배란율이 유의하게 증가하였다. 그러나 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP 1,000 ng/ml와 HCG 5 IU/ml의 배지에서는 대조구의 배란율과 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과로 E<sub>2</sub>를 제외한 스테로이드와 HCG는 동자개의 난모세포 성숙과 배란을 *in vitro*에서 유도할 수 있으며, 17 $\alpha$  20 $\alpha$  OHP와 HCG는 다른 스테로이드에 비해 높은 유효의 난모세포 성숙과 배란을 유도하였다.

## 참 고 문 헌

- Canario, A. V. M. and A. P. Scott. 1988. Structure activity relationships of C<sub>21</sub> 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. Effect of steroids and human chorionic gonadotropin on *in vitro* oocyte final maturation in two marine flatfish: The dab, *Limanda limanda*, and the plaice, *Pleuronectes platessa*. Gen. Comp. Endocrinol., 77, 161~176.
- Canario, A. V. M. and A. P. Scott. 1987. 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one: The oocyte maturation-including steroid in dab, *Limanda limanda*. In *Proceedings of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish Marine Science Research Laboratory St. John's Newfoundland, Canada*. 250pp.

- Donaldson, E. D. and G. A. Hunter. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. In *Fish Physiology* Academic Press. New York., IXB, pp. 351~403.
- Duffey, R. J. and F. W. Goetz. 1980. The *in vitro* effects of 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone on germinal vesicle breakdown in brook trout (*salvelinus fontinalis*) oocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41, 563~565.
- Fitzpatrick, M. S., G. Kraak, and C. B. Shreck. 1986. Profiles of sex steroids and gonadotropin in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62, 437~451.
- Fostier, A. and B. Jalabert. 1986. Steroidogenesis in rainbow trout (*salmo gairdneri*) at various preovulatory stages; Changes in plasma hormone levels and *in vivo* and *in vitro* responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish. Physiol. Biochem.*, 2, 87~99.
- Goetz, F. W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. In *Fish Physiology*, Academic Press. New York., Vol. IXB, pp. 117~170.
- Goetz, F. W. and H. L. Bergman. 1978. The effects of steroids on final maturation and ovulation of oocytes from brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*). *Bol. Reprod.*, 18, 293~298.
- Goetz, F. W. and F. Cetta. 1985. *In vitro* stimulation of final maturation in oocytes of rock bass (*Ambloplites rupestris*). *Reprod. Nutr. Dev.*, 25 (1A), 33~38.
- Goetz, F. W. and G. Theofan. 1979. *In vitro* stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes: Effects of 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone and prostaglandins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37, 273~285.
- Goetz, F. W., M. Ranjan, A. K. Berndtson and P. Duman. 1987. The mechanism and hormone regulation of ovulation: The role of prostaglandins in teleost ovulation. In *Proceeding of the IIIrd International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Marine Science Reserch Laboratory, St. John's Newfoundland. Canada, pp. 235~238.
- Goswami, S. V. and B. I. Sundararaj. 1974. Effect of C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub> and C<sub>21</sub> steroids on *in vitro* maturation of oocyte of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 23, 282~285.
- Greeley, M. S., Jr. Calder, D. R. Taylor, M. H. Hols and R. A. Wallace. 1986. Oocytes maturation in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). Effects of steroids on germinal vesicle breakdown of intact follicles *In vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62, 281~289.
- Hirose, K. 1971. Biological study on ovulation *in vitro* of fish. I. Effects of pituitary and chorionic gonadotropins on ovulation *in vitro* of Medaka, *Oryzias latipes*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 37, 585~591.
- Hirose, K. 1976. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Placoglossus altivelis*). *J. Fish Res. Board Can.* 33; 989~994.
- Iwamatsu, M. 1978. Studies on oocyte maturation of the medaka, *Oryzias latipes*. V. On the structure of steroids that induce maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 204, 401~408.
- Iwamatsu, M. 1980. Studies on oocyte maturation in the medaka, *Oryzias latipes*. VIII. Role of follicular constituents in gonadotropin and steroid-induced maturation of oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 211, 231~239.
- Jalabert, B. and A. Fostier. 1984. The modulator effect *in vitro* of estradiol-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. 1976. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*), *J. Fish. Res. Board Canada.*, 33, 974~988.
- Jalabert, B., B. Breton and A. Fostier. 1978. Precocious induction of oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Problems when using 17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\beta$ -dihydroprogesterone. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 18, 977~984.
- Masui, Y. and H. J. Clarke. 1979. Oocyte maturation. *Int. REV. Cytol.*, 57, 185~282.
- Nagahama, Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zool. Sci. (Tokyo)*, 4, 209~222.
- Nagahama, Y. and S. Adachi. 1985. Identification of a maturation-inducing steroid in teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhoduru*). *Dev. Biol.*, 109, 428~435.
- Nagahama, Y., K. Hirose, G. Young, S. Adachi, K. Suzuki and B. Tamaoki. 1983. Relative *in vitro* effectiveness of 17 $\alpha$ 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnen derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 51, 15~23.
- Pankhurst, N. W. 1985. Final maturation and ovulation of the goldeye, *Hiodon losoides* (*Rafinesque*), *in vitro*. *Canadian. J. Zool.*, 63, 1003~1009.
- Scott, A. P. and A. V. M. Canario. 1987. Status of oocyte maturation-inducing steroids in teleosts. In

- Proceedings of the 1rd International Symposium on reproductive Physiology of Fish*. Marine Sciences Research Laboratory, St. John's Newfoundland, Canada. pp. 224~234.
- 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.
- Trant, J. M. and P. Thomas. 1988. Structure activity relationships of steroids in inducing germinal vesicle breakdown of Atlantic croaker oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71, 307~317.
- Trant, J. M., P. Thomas and C. H. L. Shackleton. 1986. Identification of  $17\alpha$ ,  $20\beta$ ,  $21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one as the major ovarian steroid produced by the teleost, *Micropogonias undulatus* during final oocyte maturation. *Steroids*, 47, 89~99.
- Takemura, A., K. Tamano and K. Yamauchi. 1989. The *in vitro* effects of various steroid hormones and gonadotropin on oocyte maturation of the viviparous rockfish, *Sebastes taczanowski*. *Bull. Fac. fish Hokkaido univ.*, 40 (1), 1~7.
- Wallace, R. A. and K. Selman. 1978. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. I. Preliminary observations on oocyte maturation *in vivo* and *in vitro*. *Dev. Biol.*, 62, 354~369.
- Wallace, R. A., S. M. Boyle, S. M. Grier, H. J., 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.
- Wanshu, H. and P. Thomas. 1987. The *in vitro* effects of steroids, human chorionic gonadotropin and cyanoketone on germinal vesicle breakdown of striped mullet (*Mugil cephalus* L.) oocytes. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 5., 1~8.

---

1996년 8월 9일 접수

1997년 3월 3일 수리