

한우에 있어서 다양한 용매에 용해시킨 FSH의 1회 주사에 의한 난소반응

임석기 · 전기준 · 우제석 · 최재관 · 양보석 · 오성중 · 윤상보
축산기술연구소

Superovulatory Response in Korean Cattle Following Single Injection of FSH Dissolved in Various Solvents

S. K. Im, G. J. Jeon, J. S. Woo, J. G. Choi, B. S. Yang, S. J. Oh and S. B. Yoon
National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

The present study was undertaken to compare the superovulatory response to single subcutaneous (s.c.) injection of FSH dissolved in various solvents with standard multiple intramuscular (i.m.) injection.

1. Standing estrus was observed 100% in group 1 and 7 after the superovulation treatment.
2. Average numbers of total embryos and transferable embryos were significantly higher ($p < 0.05$) for group 1 and 7 (3.5, 2.9 and 3.8, 3.5) compared with another group.
3. Serum progesterone also was significantly higher ($p < 0.05$) in group 1 and 7 (6.19ng/ml, 7.54ng/ml) compared with another group.

These data indicated that the single injection treatment using FSH diluted with PEG 30% was effective in superovulatory Korean cattle.

(Key words : superovulation, single injection, FSH, solvents)

서 론

다배란처리법은 소 수정란이식에 있어서 가장 중요한 기초기술이지만 아직도 정상수정란을 안정적으로 생산하기 위해서는 개선되어야 할 점이 많다. 현재 다배란처리에 주로 사용되는 호르몬은 난포자극호르몬 (follicle stimulating hormone: FSH)으로 이 FSH는 반감기가 4.5~5.0시간(De-moustier 등, 1988) 정도이기 때문에 1일 2회 12 시간간격으로 호르몬 종류에 따라 3~4일간 총 6~8회 동량 또는 감량방식으로 투여(Chupin과

Procureur, 1982)하는 방법이 일반적으로 실시되고 있으나 이는 공란우에 스트레스를 가중시키고 노동력을 증대시키며 또한 투여량, 투여시간 등의 기술적 오류를 범할 수 있다. Smith 등(1973)은 육우에서 FSH를 1~2회 주사하여 다배란만을 생산하기 위하여 FSH 흡수시간을 연장할 목적으로 polyvinylpyrrolidone(PVP)과 carboxymethyl cellulose (CMC)를 사용하였으며, 최근 Yamamoto 등(1992)은 PVP에 용해시킨 FSH를 1회 주사하여 다배란을 유기시킴으로서 기존의 방법과 동일한 성적을 얻었다고 보고하였다. 따라서 본 실험

Table 1. Chemical composition and nutritive value of diets

(unit : %)

Feeds	DM	CP	EE	NFE	C.Filber	C.Ash	TDN
Cornsilage	25.20	2.45	0.90	12.21	8.09	1.57	16.51
Grass	19.80	3.00	0.80	8.50	5.60	1.90	12.86
Concentrate	87.8	13.2	4.1	53.4	10.7	6.4	69.0

은 FSH용매제의 농도 및 종류에 따른 공란우의 난소반응을 검토하여 FSH 1회 주사에 의한 다배란유기 간이화법을 개발하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

본 시험에 공시된 공란우는 축산기술연구소 대관령지소에서 사육중인 한우 성빈우중 생식기의 상태가 양호하고 정상 발정주기가 2회 이상 확인된 경산우를 사용하였다.

2. 공란우 사양관리

공란우의 사양관리는 사사기에는 대관령지소에서 관리하는 방법인 08:00~09:00시와 17:00~18:00시 사이에 옥수수 사일리지(20.0kg/두/일)와 농후사료(2.5kg/두/일)를 급여하였으며 물은 자유음수 시켰다. 또한 방목기에는 방목지에서 청초를 자유채식시켰으며 농후사료는 급여하지 않았다. 급여사료의 영양가와 화학적 조성은 Table 1과 같다.

3. 용매제종류 및 농도

본 시험에 사용된 용매제종류 및 농도는 처리 1과 처리 2는 생리식염수, 처리 3과 처리 4는 carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma Chemical Co. U.S.A : 1500~3000cps)의 1%와 3%, 처리 5와 처리 6은 polyvinylpyrrolidone (PVP, Fisher Biotech, U.S.A : 40000M.W.)의 30%와 50%, 처리 7과 처리 8은 polyethylene glycol(PEG, Fisher Biotech, U.S.A : 8000 M.W.)의 30%와 50%용액을 사용하였다.

4. 공란우의 다배란처리 및 인공수정

다배란처리는 발정주기 10~13일째 대조구는

SUPER-OV (AUSA International, Inc, Canada) 75 unit를 10ml 생리식염수에 용해시켜 12시간 간격으로 1일 2회 12.5 unit씩 3일간 근육주사하였으며 나머지 처리구는 각 용매제의 농도에 따라 용해시켜 견갑부에 1회 75 unit를 피하주사하였다. 발정유기를 위하여 FSH처리 개시후 48시간에 PGF_{2α} 25mg (SANOFI Sante Nutrition Animale, France)을 근육주사하였으며 48시간후 발정을 확인하여 발정이 확인된 개체는 12시간후 12시간 간격으로 2회 2 straw씩 인공수정을 실시하였다. 사용된 동결정액은 축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 보증종모우 동결정액을 이용하였다.

5. 수정란 회수

다배란 처리된 공란우의 발정발현 7~8일째에 lidocaine hydrochloride (2% Lidocaine, Jeil Pharm. Co., Korea) 8ml로 경막외 마취를 실시하여 숙분을 제거한 다음 난소를 검사하여 황체의 수를 조사하였다. 수정란회수는 Foley catheter (Agtech, Rusch, U.S.A)를 경관 경유법으로 자궁체에 고정된 다음 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco. BRL Life Technologies, U.S.A)이 1% 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco, BRL Life Technologies, U.S.A)용액을 사용하여 비외과적 방법으로 관류액을 수정란회수기 (Embryo Collector, Fujihira Industry Co., Japan)로 회수하였다.

6. 수정란 평가

관류된 채란액을 87×15mm 멸균 petri dish (녹십자, 한국)에 옮겨 11~64배율의 실체현미경 (Olympus, Japan)으로 수정란을 회수한 다음 20%의 FBS가 첨가된 D-PBS용액이 들어있는 35×10mm tissue culture dish(Falcon, Becton Dic-

kinson Co., U.S.A)로 옮겨 Linder와 Wright (1983)의 기준에 따라 수정란을 발육단계와 질을 형태학적으로 평가하였다. 수정란의 발육단계는 상실배기(morula), 배반포기(blastocyst) 및 확장 배반포기(expanded blastocyst)로 구분하였으며, 수정란의 질은 우수(excellent), 우량(good), 보통(fair) 및 불량(변성란 및 미수정란)으로 구분하였고 이중 우수, 우량 및 보통을 나타내는 수정란을 정상수정란으로 선정하였다.

7. 혈액채취 및 혈청분리

공란우의 혈액은 발정일, 다배란처리전일, 다배란처리일, 채란일에 각각 경정맥으로부터 채취하여 실온에서 2시간 보관후 원심분리(2,500 rpm, 15분)하여 혈청을 분리한 후 호르몬분석전까지 -20℃ 이하에서 보존하였다.

8. 혈중 progesterone 농도 분석

혈청중 progesterone 농도는 Immuchen direct progesterone RIA kit(ICN Biomedicals, Inc. U.S.A)를 이용한 radioimmunoassay(RIA)법으로 반응시킨 다음 y-counter(Cobra, U.S.A)로 측정하여 계산하였다.

9. 통계분석

본 실험결과의 통계분석은 Chi-square검정에 의하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 용매제종류 및 농도에 따른 발정유기 시간

한우에 있어서 용매제종류 및 농도에 따른 다배란처리시 공란우의 발정유기 성적은 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 처리 1과 처리 7에서 100% 발정이 유기되었으나 처리 2와 처리 8에서는 30 및 40%만이 발정유기되었으며 PGF_{2α} 투여후 발정발현시간은 48~60 시간에 33.3~100%가 발정이 유기되었다. 이와 같은 결과는 Yamamoto 등(1995)이 FSH-R을 PVP 30%에 용해시켜 1회 근육 주사시 투여량에 따라 10~57.1%의 발정유기율을 나타내었고 PGF_{2α} 투여후 40~60시간에 45~100% 발정이 유기되었다는 결과와 비교하여 발정유기율은 본 시험에서 높았으나 발정유기 시간은 비슷한 경향을 나타냈다. 본 시험에서 발정유기율이 높은 이유는 FSH 종류, 투여량, 용매제 종류, 농도 등의 차이에서 기인한 것으로 생각된다.

2. 공란우의 난소반응

Table 3은 다배란처리후 공란우에 대한 수정란 회수 성적을 나타내었다.

Table 3에서 보는 바와 같이 대조구인 처리 1에서 황체수, 회수란수 및 이식가능란수가 각각 5.7, 3.5 및 2.9개였으나 처리 2의 경우 생리식염수에 희석하여 1회 주사시 1.7, 0.7 및 0.3개로 거의

Table 2. Relationship between the time of observed estrus and solvent

Treatment groups	No. of cows treated	No. of cows observed estrus(%)	Time of observed estrus after PGF _{2α} treatment	
			48~60h	61~72h
T ₁ (Saline, 10ml)	10	10(100)	10 (100)	-
T ₂ (Saline, 10ml)	10	3(30)	2(66.7)	1(33.3)
T ₃ (CMC, 1%)	10	9(90)	6(66.7)	3(33.3)
T ₄ (CMC, 3%)	10	9(90)	6(66.7)	3(33.3)
T ₅ (PVP, 30%)	10	9(90)	3(33.3)	6(66.7)
T ₆ (PVP, 50%)	10	7(70)	4(57.1)	3(42.9)
T ₇ (PEG, 30%)	10	10(100)	6(60.0)	4(40.0)
T ₈ (PEG, 50%)	10	4(40)	2(50.0)	2(50.0)

Table 3. Superovulatory responses

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
No. of cows	10	10	10	10	10	10	10	10
No. of detected estrus	10	3	9	9	9	7	10	4
No. of corpus luteum	5.7 ^a	1.7 ^c	3.0 ^b	3.1 ^b	3.0 ^b	3.0 ^b	5.5 ^a	3.0 ^b
No. of recovered embryos	3.5 ^a	0.7 ^c	1.3 ^b	1.4 ^b	1.3 ^b	1.3 ^b	3.8 ^a	1.8 ^b
No. of transferable embryos	2.9 ^a	0.3 ^c	1.0 ^b	1.2 ^b	1.1 ^b	0.8 ^b	3.5 ^a	1.3 ^b

^{a,b,c} Different superscripts with the same column denote significant differences(p<0.05).

Table 4. Peripheral levels of P₄ at various points(ng/ml)

Group	Before FSH injection		After FSH injection	
	Estrus	day 7	Estrus	day 7
T ₁	< 0.1	3.14	0.41	5.86 ^a
T ₂	< 0.1	2.81	0.14	3.20 ^b
T ₃	< 0.1	2.30	0.13	3.43 ^b
T ₄	< 0.1	3.28	0.11	3.87 ^b
T ₅	< 0.1	3.12	0.17	3.75 ^b
T ₆	< 0.1	2.76	0.12	3.69 ^b
T ₇	< 0.1	3.54	0.32	7.54 ^a
T ₈	< 0.1	2.76	0.24	3.06 ^b

^{a,b} Different superscripts with the same column denote significant differences(p<0.05).

다배란이 유지되지 못하였으며 처리 7인 PEG 30%에 용해후 1회 주사시 5.5, 3.8 및 3.5개로 처리 1의 대조구와 비슷한 성적을 얻을 수 있었다.

이는 1회 주사에 의하여 다배란이 충분히 유지될 수 있다는 것을 시사하는 결과로서 Takedomi 등 (1993)이 p-FSH를 25% PVP에 용해후 1회 주사시 5.0개의 정상수정란을 얻었으며 생리식염수에 용해후 1회 주사시 0.2개의 정상수정란을 얻었다는 보고와 비슷한 경향이었으나 Yamamoto 등 (1994)이 FSH-R을 30% PVP에 용해후 근육내 1회 주사시 이식가능한 수정란을 7.2개 얻었다는 보고보다는 낮은 경향이었는데 이는 투여된 호르몬의 종류에 기인된 것으로 사료된다.

3. 혈중 Progesterone 농도

Table 4는 다배란처리시 공란우의 혈중 progesterone농도를 측정된 결과를 나타내었다.

Table 4에서 보는 바와 같이 혈중 progesterone 수준은 체란일에서 대조구는 5.86ng/ml, 처리 7 (PEG 30%)에서 7.54ng/ml로 다배란이 많이 된

구가 혈중 progesterone이 높다는 것이 입증되었다. 이는 Yamamoto 등 (1994)이 체란일에서 progesterone수준이 10.4ng/ml이었다는 보고보다는 적은 수준이었으나 이는 다배란수에 따른 차이에서 기인된 것으로 생각된다.

이상의 결과로 볼 때 한우에 있어서 다배란유기시 PEG 30%로 FSH를 용해시켜 1회 주사를 하는 것이 가장 효과적이라고 생각하지만 처리시기, 투여량 등 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 한우 다배란처리시 노동력을 절감하고 공란우의 스트레스를 방지하여 정상수정란을 안정적으로 생산할 수 있는 1회 주사시 FSH의 용해제의 종류와 농도를 선정하기 위하여 다양한 용매제에 용해시킨 1회 주사와 기존의 다회주사에 의한 난소반응을 비교 검토하였다.

1. 공란우에 다배란 처리후 발정유기는 처리 1과 7에서 100% 유기되었다.
2. 채란수와 정상수정란 수는 처리 1과 처리 7에서 (3.5, 2.9와 3.8, 3.5) 다른 처리구에 비해 유의하게 많았다($p < 0.05$).
3. FSH 주사후 7일째 혈중 progesterone 농도 역시 처리 1과 처리 7에서(6.19ng/ml, 7.54ng/ml) 다른 처리구에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$).

참고문헌

- Chapin D and Procureur R. 1982. Use of pituitary FSH to induce superovulation in cattle : Effect of injection regime. *Theriogenology*, 17:81(Abstr.).
- Demoustier MM, Becker J-F, Van Der Zwalmen P, Closset J, Gillard J-L and Ectors F. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, 30:379-386.
- Lindner GM and Wright RW, Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20:407-416.
- Smith LE, Jr., Sitton GD and Vincent CK. 1973. Limited injections of follicle stimulating hormone for multiple births in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 37:523-527.
- Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G and Sasamoto S. 1993. Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 39:327(Abstr.).
- Yamamoto M, Suzuki T, Ooe M, Takagi M and Kawaguchi M. 1992. Efficacy of single vs. multiple injection superovulation regimens of FSH using polyvinyl-pyrrolidone. *Theriogenology*, 37:325 (Abstr.).
- Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M and Suzuki T. 1994. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinyl-pyrrolidone. *Theriogenology*, 41:747-755.
- Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M and Suzuki T. 1995. Dose response to a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone for superovulation in cows, *J. Reprod. Dev.*, 41:93-96.

(접수일자 : 1998. 8. 31/채택일자 : 1998. 12. 21)

