

hCG 투여가 복제란 이식 한우 대리모의 임신과 Progesterone 농도에 미치는 영향

황성수¹, 양병철¹, 임기순¹, 고응규¹, 최선호², 민관식³, 윤종택³, 성환후^{1*}

¹농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학부, ²축산기술지원과, ³한경대학교 생물환경·정보통신전문대학원

Effects of hCG Treatment on the Pregnancy Rates and Progesterone Concentrations in Hanwoo Recipients with SCNT Embryos

Seongsoo Hwang¹, Byoung-Chul Yang¹, Gi-Sun Im¹, Yeoung-Gyu Ko¹, Sun-Ho Choi²,
Kwan-Sik Min³, Jong-Taek Yoon³ and Hwan-Hoo Seong^{1,*}

¹Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

²Technology Application Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

³Graduate School of Bio-& Information Technology, Hankyong University, Gyeonggi-do 456-749, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of hCG treatment on pregnancy and delivery rates in the Hanwoo recipients. There were significantly higher pregnancy and delivery rates in the recipients treated with hCG at 7 days after artificial insemination ($p < 0.05$), respectively. The SCNT embryos from bovine fetal fibroblast cells were transferred into the synchronized recipients. The recipients were administered saline ($n=89$) or hCG (1,500 IU) ($n=48$) at 7 days after heat, respectively. The pregnancy rate was significantly higher in the recipients treated with hCG compared to that of saline treated group ($p < 0.01$), however, the delivery rate was not different in both treated groups. The concentration of plasma progesterone (P4) was not different in both groups before hCG treatment, but the P4 level was increased significantly in hCG treated group after hCG injection ($p < 0.05$). Although the pregnancy rate was very high in early stage of pregnancy, it was decreased dramatically after 50 days of pregnancy and maintained basal level. Taken together, the treatment of hCG in the SCNT recipients after day 7 of heat was effective method to increase the P4 concentration and to increase the pregnancy rate. But it did not affect directly to delivery.

(Key words : hCG, pregnancy, delivery, progesterone, SCNT)

서 론

체세포 핵이식을 이용한 복제동물 생산 기법은 가축의 유전적 개량, 멸종위기 동물의 보존 및 바이오 신약·장기 생산용 동물의 생산 등에 광범위하게 적용되고 있다(Wilmut 등, 1997; Kato 등, 1998; Onishi 등, 2000; Polejaeva 등, 2000; Lee 등, 2005). 하지만 현재까지도 복제 기법은 핵이식 과정의 복잡성, 복제 태아의 높은 유산 또는 사산율 및 낮은 분만율 등의 문제점들이 극복되지 못하고 있는 실정이다(Stice 등, 1996; Hill 등, 2000; Tsunoda와 Kato, 2000).

수정란 또는 복제란 이식을 통한 산자 생산 프로그램에서 임신율을 높이기 위하여 다양한 발정 동기화 프로그램과 호르몬제의 개발이 이루어져 오고 있으며, 실제로 이를 통하여 양질의 난자 생산과 임신율 향상이 이루어지고 있는 실정이다. 최근에는 controlled internal drug release (CIDR) devices(Lafri

등, 2002; Sartori 등, 2003), progesterone releasing intravaginal device (PRID)(Alnimer와 Lubbadah, 2003; Nasser 등, 2004) 및 bovine somatotropin(bST)(Luna-Dominguez 등, 2000; Lee 등, 2007) 등의 물질이 발정 동기화 효율 향상 및 양질의 난자 생산을 위하여 주로 사용되어 오고 있으며, 결과적으로 임신율을 향상이 나타나고 있다.

Human chorionic gonadotropin(hCG)는 luteinizing hormone (LH)와 유사한 기능이 있다고 알려져 있으며, progesterone(P4)의 합성을 강화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hoyer와 Niswender, 1985). 이것은 hCG 주사에 의한 부황체(accessory corpus luteum)의 형성 때문이라고 보고되고 있다(Schmitt 등, 1996; Santos 등, 2001). 하지만 아직까지 hCG 투여와 수정란 이식을 통한 임신율 향상에 대하여는 극히 제한적으로 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 복제란 이식 초기에 hCG 투여가 체

* 본 과제는 농촌진흥청 축산과학원 경상과제 연구비 및 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20080401034074) 연구비로 실시되었음.

* Correspondence : E-mail : seonghh@rda.go.kr

세포 복제란 이식 한우 대리모의 호르몬 분비, 임신율 및 분만율에 미치는 영향에 대하여 살펴보고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 발정 동기화

공시동물은 농촌진흥청 축산과학원에서 사육하고 있는 정상적인 발정 주기를 나타내는 한우 3~9년 생의 미경산 및 경산우 166두(4~7산차)를 시험에 공시하였다. 인공수정을 실시한 암소를 대조군으로 사용하였다. 대리모에 대한 발정 동기화는 발정 주기와 상관없이 1.9 g의 progesterone이 함유된 controlled internal drug release(CIDR; InterAg, Hamilton, New Zealand) device를 사용하였다. CIDR 삽입 후 6일째 아침과 오후에 각각 22.5 mg 용량의 prostaglandin F_{2α}(PGF_{2α}, im; Lutalyse, Pharmacia, Kalamazoo, MI, USA)를 주사하여 발정을 유도시켰다.

2. 체세포 복제란 이식 및 hCG 처리

공여세포의 준비 및 핵이식 과정은 Yang 등(2008)과 동일한 방식으로 실시하였다. 간단히 요약하면 임신 45일 경의 한우 태아를 적출하여 태아 섬유아 세포주를 확립하여 공여세포로 사용하였다. 융합이 끝난 핵이식 난자는 10 μM calcium ionophore(Sigma Aldrich Chemicals, St. Louis, USA)에 5분간 처리한 다음, 2 mM 6-dimethyl-aminopurine(6-DMAP; Sigma Aldrich Chemicals, St. Louis, USA)에서 3시간 동안 배양을 실시하였다. 재구축된 난자는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액에서 38.5°C, 5% O₂ 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 7일 동안 배양을 실시하였다. 한 개 내지 두 개의 복제란을 동기화 처리된 대리모에 이식하였다. 체세포 복제란을 이식한 대리모에게 발정 후 7일째에 hCG(Chorulon, Intervet, Inc., Millsboro, DE) 1,500 IU를 둔부에 근육주사하였다. 한편, 다른 복제란 이식 대리모들에게는 3 ml의 생리식염수를 주사하여 대조군으로 하였다.

3. 혈액 채취

복제란 이식 후의 progesterone의 변화 양상을 측정하기 위하여 발정일을 기준으로 약 3~5일 간격으로 헤파린 처리된 튜브(BD Vacutainer[®] and CPT[™], NJ, USA)를 이용하여 모든 복제란 이식우에서 채혈하였다. 혈장은 4°C에서 15분간 2,000 × g로 원심분리한 후 호르몬 분석 때까지 -80°C에 보관하였다.

4. 호르몬 분석

Progesterone(P4) (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA)의 농도 분석은 radioimmunoassay(RIA) 방법으로 3반복하여 측정하였다. 동위원소(¹²⁵I) 측정은 γ-counter(Titertek,

Gamma 4, USA)를 이용하였다.

5. 임신 진단

임신 진단은 이식 후 14~19일째에 채혈을 실시하여 비임신 진단 키트(제네디아 프로테스트, 녹십자, 한국)와 재발정 확인으로 일차적 임신 진단을 실시하였다. 복제란 이식 후 50~70일 사이에 초음파 진단기(Sono 600 linear-array real-time B-mode ultrasound scanner, Medison Co. Ltd., Seoul, Korea)와 직장질법을 이용하여 실시하였다.

6. 통계적 유의성 검정

임신율 및 분만율은 two-sample *t*-test 방법으로 검정을 실시하였고, 혈장 P4 수준은 SAS 프로그램의 ANOVA(Release 9.1, Cary, NC, USA: Inst. Inc. 2002) 방법으로 검정을 실시하였다. 유의성 검정은 *p*<0.05 수준에서 유의차를 인정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 복제란 이식 초기에 hCG 투여가 체세포 복제란 이식 한우 대리모의 호르몬 분비, 임신율 및 분만율에 미치는 영향에 대하여 살펴보고자 수행하였다.

본 연구를 수행하기 위한 예비 실험으로 인공수정을 실시한 대리모에 인공수정 후 7일째에 1,500 IU 농도의 hCG를 근육주사한 결과, 생리식염수를 처리한 대조군에 비하여 유의적으로 높은 임신율(*p*<0.05) 및 분만율(*p*<0.05)을 나타내는 것을 확인하였다(Table 1). 인공수정한 암소에서의 hCG의 효과를 복제란 이식 한우 대리모에서 확인하기 위하여 태아 섬유아세포를 이용한 체세포 복제란을 이식한 대리모에 각각 생리식염수와 hCG를 주사한 결과는 Table 2와 같다. 생리식염수를 주사한 대리모의 경우 임신율은 hCG를 처리한 대리모에 비하여 유의적으로 낮은 임신율을 나타내었다(*p*<0.01). 분만율의 경우 역시 hCG를 처리한 대리모에서 다소 높게 나타났으나, 통계적 유의성은 인정되지 않았다.

Thatcher 등(2001)은 인공수정 후 6일 정도에 P4 농도가 정상치에 비하여 낮은 경우 비임신될 확률이 높다고 보고하였다. 일정 수준 이상의 P4 농도는 배 발달을 촉진시키는 효과가 있다고 하였는데, 이는 임신 초기 배 발달이 P4의 농도와 매우 밀접한 연관이 있기 때문이라고 보고되었다(Thatcher 등, 1994; Mann 등, 1999). 본 연구에서 생리식염수 또는 hCG를 주사한 복제란 이식 대리모에서 날짜에 따른 P4 농도의 변화를 살펴본 결과, 이식 후 hCG 처리 전까지는 두 처리군에서 P4 농도의 차이는 나타나지 않았으나, hCG를 주사한 대리모의 경우 hCG 처리 직후부터 P4 농도가 유의적으로 높게 유지되는 양상을 나타내었다(*p*<0.05) (Fig. 1). 이러한 현상은 Schmitt 등(1996)의 보고에서와 같이 hCG 주사에 의한 부황체(accessory

corpus luteum)의 형성 때문일 것으로 추측할 수 있다. 또한, Santos 등(2001)과 Stevenson 등(2007)도 젖소에서 인공수정

후 5일째에 hCG를 처리할 경우, 부황체의 발달을 유도하여 P4의 분비를 촉진시키고 결과적으로 높은 임신율이 나타난다고 보고하였다.

Table 1. Effect of hCG treatment on the pregnancy and delivery rates in artificially inseminated Hanwoo cows

Treatment	No. of animals (%)		
	Transferred	Pregnant	Delivered
Control	15	8 (53.3)	7 (46.6)
hCG	14	10 (71.4)*	10 (71.4)*

Control: received 3 ml of saline solution; hCG: received an i.m. injection in the neck area of 1,500 IU of hCG (Chorulon, Intervet, Inc., Millsboro, DE).

* $p < 0.05$.

본 연구에서는 체세포복제란 이식 대리모에서 높은 임신율에 비하여 분만율이 낮은 이유를 확인하기 위하여 임신 기간 동안 지속적으로 임신 유지를 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. 임신 초기 임신율은 상당히 높게 나타났으나, 임신 약 50일경에 급격하게 낮아진 다음 이후 점차적으로 낮은 수준으로 유지되는 것을 확인하였다.

Table 2. Effect of hCG treatment on delivery rate in the recipients pregnant by SCNT embryos

Treatment	No. of animals (%)		
	Transferred	Pregnant	Delivered
Control	89	20 (22.4)	6 (6.74)
hCG	48	29 (61.4)*	5 (10.4)

Control: received 3 ml of saline solution; hCG: received an i.m. injection in the neck area of 1,500 IU of hCG (Chorulon, Intervet, Inc., Millsboro, DE).

* $p < 0.01$.

임신을 향상에 대한 hCG 처리 효과가 긍정적인 것만은 아닐 수도 있다는 보고도 있었다. hCG 처리가 임신율에 별다른 영향을 미치지 못하거나(Carruthers 등, 1986; Funston 등, 2005), 또는 임신 초기 높은 P4 농도가 유산을 억제하지는 못한다는 보고도 있었다(Stevenson 등, 2008). 비록 본 연구에서와 같이 복제란 이식 대리모에서 hCG 처리에 의하여 임신 초기에 높은 임신율의 향상이 나타나기는 하였지만, hCG 처리에 의한 P4 농도의 증가만이 태아의 발달 및 임신의 유지에 충분하지 못하다는 것을 알려준다고 하겠다. 이러한 현상은 체세포 복제의 특성상 체세포 복제 배반포 발달율이 향상됨에 따라 임신 초기에는 착상이 되더라도 높은 유산율, 과체중 및 형태적 이상(Hill 등, 1999; De Sousa 등, 2001) 또는 착상 실패와 태반의 비정상적 발달(Rideout 등, 2001; Tamashiro 등, 2002) 등의 문제점이 태아의 발달 과정에서 나타나 분만율이 낮아지는 원인이라 할 수 있다.

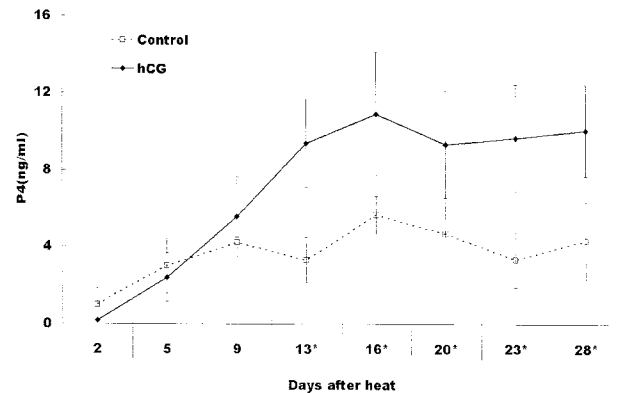


Fig. 1. The effect of hCG treatment on the plasma P4 concentrations during early pregnancy in the Hanwoo recipients following transfer of SCNT embryos. Control ($n=48$): received 3 ml of saline solution; hCG ($n=89$): received an i.m. injection in the neck area of 1,500 IU of hCG (Chorulon, Intervet, Inc., Millsboro, DE). All the samples were measured three times. * $p < 0.05$.

이상의 결과를 종합하여 보면, 체세포 복제란 이식 한우에 hCG를 처리할 경우 P4 농도의 증가와 더불어 높은 임신율이 나타나는 결과를 확인할 수 있었다. 하지만 분만율까지는 직접적으로 영향을 미치지 못하는 못하였다. 따라서 임신 유지와 관련하여 체계적인 연구가 필요하다고 사료된다.

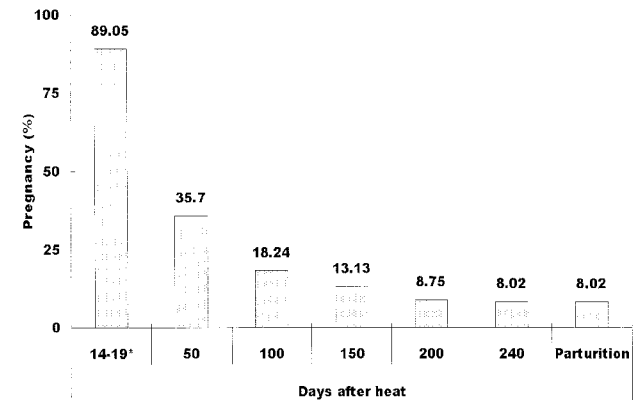


Fig. 2. Change of pregnancy rate during gestation periods in the Hanwoo recipients following transfer of SCNT embryos. * Diagnosis by Genedia Protest Kit (GreenCross, Korea) and observation of estrus.

결론

본 연구는 복제란 이식 후 hCG의 추가적인 투여가 대리모의 임신 및 분만에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다. 인공수정을 실시한 암소에서 hCG 처리가 높은 임신을 및 분만을 나타냄을 확인하였다($p < 0.05$). 소 태아 섬유 아세포를 이용하여 복제란을 생산한 다음, 동기화 처리된 복제란 이식 한우 대리모에 이식을 실시하였다. 복제란 이식 과정에서 두 처리군으로 구분하여 생리식염수($n=89$)와 hCG(1,500 IU) ($n=48$)를 각각 처리하였다. hCG를 주사한 대리모에서 유의적으로 높은 임신을 나타내었으나($p < 0.01$), 분만율은 두 처리군 간에 통계적 차이는 나타나지 않았다. hCG를 주사한 복제란 이식 대리모에서 임신 초기 P4 농도 변화를 살펴본 결과, 이식 후 hCG 처리 전까지는 생리식염수 투여 대조군의 P4 농도와 차이가 나타나지 않았으나, hCG 처리 직후부터 P4 농도가 유의적으로 높게 유지되는 양상을 나타내었다($p < 0.05$). 임신 기간 동안 지속적으로 임신을 확인한 결과, 임신 초기 임신율은 상당히 높게 나타났으나, 임신 약 50일경에 급격하게 낮아진 다음 이후 점차적으로 낮은 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하여 보면, 체세포 복제란 이식 한우에 hCG를 처리할 경우 P4 농도의 증가와 더불어 높은 임신율이 나타나는 결과를 확인할 수 있었으나, 분만율까지는 직접적으로 영향을 미치는지는 못하였다.

참고문헌

- Alnimer M and Lubbadah W. 2003. Effect of using progesterone releasing intravaginal device with ovsynch program on reproduction in dairy cattle during summer season. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:1268-1273.
- Carruthers TD, Manns JG and Rutter LM. 1986. Failure of human chorionic gonadotropin injections to sustain gonadotropin-releasing hormone-induced corpora lutea in postpartum beef cows. *Biol. Reprod.* 35:846-849.
- De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK and Wilmut I. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol. Reprod.* 65:23-30.
- Funston RN, Lipsey RJ, Geary TW and Roberts AJ. 2005. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 83:1403-1405.
- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA and Westhusin ME. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63:1787-1794.
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM and Stice SL. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51:1451-1465.
- Hoyer PB and Niswender GD. 1985. The regulation of steroidogenesis is different in the two types of ovine luteal cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63:240-248.
- Kato Y, Tani Y, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Lafri M, Ponsart C, Nibart M, Durand M, Morel A, Jeanguyot N, Badinand F, De Mari K and Humblot P. 2002. Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. *Theriogenology* 58: 1141-1151.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten S and Hwang WS. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436:641.
- Lee HJ, Hwang SS and Yoon JT. 2007. Effects of bovine somatotropin (bST) administration combined with controlled internal drug release (CIDR) on embryo quality and pregnancy of Hanwoo (Korean native beef cattle) during commercial embryo transfer program. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20:194-199.
- Luna-Dominguez JE, Enns RM, Armstrong DV and Ax RL. 2000. Reproductive performance of Holstein cows receiving somatotropin. *J. Dairy Sci.* 83:1451-1455.
- Mann GE, Lamming GE, Robinson RS and Wathes SC. 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 54:317-328.
- Nasser LF, Reis EL, Oliveira MA, Bo GA and Baruselli PS. 2004. Comparison of for synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients. *Theriogenology* 62:1577-1584.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata K, Hanada H and Perry ACF. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289:1188-1190.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KHS. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407:86-90.

- Rideout WM 3rd, Eggan K and Jaenisch R. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293:1093-1098.
- Santos JE, Thatcher WW, Pool L and Overton MW. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2881-2894.
- Sartori R, Suarez-Fernandez CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM and Wiltbank MC. 2003. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 60:1319-1330.
- Schmitt EJP, Barros CM, Fields PA, Fields JM, Diaz T, Kluge JM and Thatcher WW. 1996. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 74:1915-1929.
- Stevenson JS, Portaluppi MA, Tenhouse DE, Lloyd A, Eborn DR, Kacuba S and DeJarnette JM. 2007. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *J. Dairy Sci.* 90:331-340.
- Stevenson JS, Tiffany SM and Inskip EK. 2008. Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. *J. Dairy Sci.* 91:3092-3101.
- Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL and Matthews L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54:100-110.
- Tamashiro KL, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R and Sakai RR. 2002. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat. Med.* 8:262-267.
- Thatcher WW, Moreira F, Santos JE, Mattos RC, Lopes FL, Pancarci SM and Risco CA. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55:75-89.
- Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick G and Schmidt EP. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72:16-30.
- Tsunoda Y and Kato Y. 2000. The recent progress on nuclear transfer in mammals. *Zool. Sci.* 17:1177-1184.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Yang BC, Im GS, Kim DH, Yang BS, Oh HJ, Park HS, Seong HH, Kim SW, Ka HH and Lee CK. 2008. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 103:25-37.

(접수일: 2008. 9. 16 / 채택일: 2008. 9. 23)