

미숙 환쥐의 과도배란에 따른 난소의 조직학적 형태와 난모세포의 배란 및 수정에 estrogen의 전처치가 미치는 영향

경희대학교 의과대학 산부인과학교실

김문희 · 서병희 · 이재현

= Abstract =

The Effect of Estrogen Pretreatment on Ovarian Morphology and Ovulation, Fertilization of the Oocytes Following Super Ovulation in Immature Mice

Moon Hwoe Kim, M.D., Byung Hee Suh, M.D., Jae Hyun Lee, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kyung Hee University

Systemic estrogen therapy promotes multiple preantral follicular development in immature mice.

Estrogen pretreated ovaries might therefore be a useful source of cells for in vitro studies of oocytes maturation.

Silastic capsules (5.0 mm length; 3.18 mm outer diameter, 1.57 mm inner diameter) filled with diethylstilbesterol were implanted subcutaneously in experimental mice (ICR) for up to 6 days.

Ovarian weight and histology in diethylstilbesterol pretreated and control animal were assessed before and after pregnant mare serum gonadotrophin treatment and after human chorionic gonadotrophin.

The following results were obtained;

1. Ovarian weight was significantly increased by 6 days of diethylstilbesterol pretreatment. Subsequent ovarian weight gain in response to pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin was increased.
2. Diethylstilbesterol pretreatment stimulated the developed healthy preantral follicles.
3. Forty eight hours after pregnant mare serum gonadotrophin treatment, a larger number of the antral follicles which developed in diethylstilbesterol pretreated animals showed signs of atresia, whereas in the control ovaries there was a higher incidence of premature luteinization.
4. Forty eight hours after human chorionic gonadotrophin, numerous corpora lutea and occasional luteinized unruptured follicles were present in both control and diethylstilbesterol ovaries.
5. Ovulation rate, fertilization rate and subsequent preimplantation development in vitro were not adversely affected by diethylstilbesterol pretreatment. However, there was considerable variation in the ovulation rate the number of animals with more than 60 ovulations was greater in the diethylstilbesterol group (52.4%) as compared to the control (33.3%).

I. 서 론

Estrogen은 과립막세포분열 자극과 여포자극호르몬과 황체화호르몬의 과립막세포에 대한 감수성을 향상시킨다(Richard et al, 1979). 뇌하수체가 적출된 미숙환쥐에서 동시에 작용되는 여포자극 호르몬의 자극없이 estrogen은 난포내에서 여포자극호르몬 수용체 용량전체에 걸쳐 자극한다(Louvet et al, 1976). 또한 여포자극호르몬과 함께 작용하면 estrogen은 과

립막세포 수용체의 농도에서 여포자극호르몬 자극 증가를 원활하게 촉진시켜 주며(Tonetta et al 1983), estrogen여포자극호르몬 접합작용은 난포막세포의 황체화호르몬 수용체 유도를 조장한다(Richard, 1980). estrogen은 진행된 배란 전기 발육을 통해 여포자극 호르몬과 황체화호르몬 작용에 대한 과립막세포를 감작시키며(Richard, 1980; Veldhuis et al, 1982) 과립막세포 유즙분비호르몬(prolactin) 수용체계의 여포자극호르몬에 의한 유도에 직접적으로 영향력을 준다(Wang et al, 1982). 성선자극호르몬에 대한 과

립막세포 반응의 estrogen 조절은 여포자극호르몬과 황체화호르몬 자극 cyclic AMP 축적의 증가를 포함하고(Brinster, 1965) 과립막세포내의 유용한 cyclic AMP 부착 부위 수의 증가와 관련이 있다 (Dorrington, 1983).

한편 외인성 estrogen의 전신적 처치가 미숙원주에서 다발성 난포전장(preantral follicle)의 발육을 조장시키므로 estrogen이 전처치된 난소들은 난모세포 성숙의 시험관내(In vitro)연구를 위한 세포들의 유용한 원천일지 모르나 이들 난포내에 있는 난모세포에는 어떤 영향을 미치는지 대해서 알려져 있지 않다. 이런 estrogen 전처치가 과도배란 (superovulation)을 유도시킨 미숙원주 난소의 조직학적 형태에 어떤 영향이 미치는가에 관한 것을 관찰하였다.

그리고 Lewis와 Gregory(Lewis et al, 1929)는 처음으로 혈청이 포함된 배양액에서 수정된 토끼의 난자를 낭포기(blastocyst)까지 분화시켰으며 Hammond는 (Hammond, 1949) 계란단백질이 포함된 배양액에서 원주의 8 세포기 배아를 낭포기까지, Whitten (Whitten, 1956)은 glucose, serum, albumin과 Krebs-Ringer bicarbonate를 사용하였고 McLaren(McLaren et al, 1958)은 배양한 낭포기의 배아를 다시 원주의 자궁에 전이하였다.

그후 배양방법은 1960년대에 Brinster(Brinster, 1965)가 pyruvate와 lactate 등을 사용하는 등 계속적인 발전을 하여 1970년대에 이르러서는 특히 원주 난자의 배양을 위한 배양액들로서 여러 연구자들의 보고가 있었으며(Fraser et al, 1975; Hopp et al, 1973; Miyamoto et al, 1973; Miyamoto et al, 1972; Oliphant et al, 1973; Wolf et al, 1976) 급기야 1978년 Steptoe와 Edwards(Edwards et al, 1980)에 의해 인간에서 시험관내 배아 배양까지 이르렀다. 그러나 외인성estro-

gen의 전신적 처치가 난포내 난모세포에 작용하여 어떤 영향을 미치고 있는지 확실히 알지 못하므로 이것을 알기 위한 과도배란에 따른 배란정도와 시험관내 수정 및 초기 배아난할에 대한 관찰을 조사 연구한 바를 발표한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

동일한 환경에서 사육한 10g내외의 생후 21~23일이 된 Inbred ICR계통의 원주 83마리를 사용하였다. 이 중 42마리는 실험군으로 하고 남은 41마리는 대조군으로 각각 배정시켰다.

2. 실험방법

1) Diethylstilbesterol(이하 DES로 약함) 투여

길이 50cm의 Dow corning silastic tube(외경3.18mm, 내경 1.57mm)에 순수한 DES(Sigma제)를 투입하여 24시간동안 방치한 후 5.0mm의 길이로 잘라 접착제로 양 끝을 폐쇄시켜 capsule을 만든다. 이 capsule들을 24시간동안 phosphate buffer solution에 넣어서 capsule 표면으로 스며 나오게 하여 평형상태를 이루게 하여 주었다.

실험군의 원주를 Ether로 마취시킨후 경부의 피부를 절개하여 이 capsule을 피하조직에 삽입한 후, 다시 봉합하여 동일조건하에서 6일간 사육시켰다. Capsule 삽입후 6일에 각각 10마리씩의 대조군과 실험군의 원주들을 경구탈구(cervical dislocation)로 치사시킨후 난소의 무게를 측정하고 그리고 난소를 10% formalin 용액에 고정하여 통상 조직표본제작법에 따라 파라핀포매 하였다. 다음 4 μ 두께로



Fig. 1. Fertilized 1 cell ovum stage. It shows large male pronucleus and small female pronucleus(X 50).

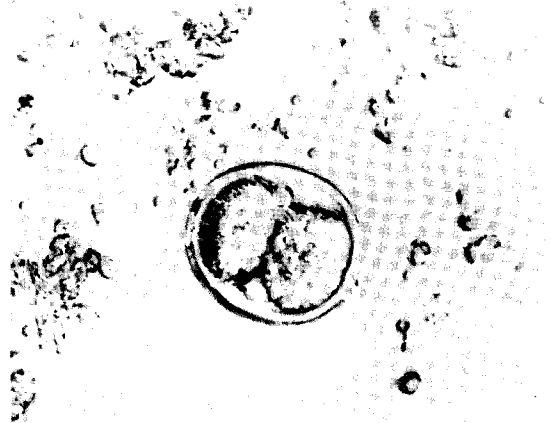


Fig. 2. Fertilized 2 cell mouse embryo. It shows two equal sized nice round egg and polar body(X 50).

절편하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시한 후 현미경으로 관찰하였다.

2) Pregnant mare serum gonadotrophin(이하 PMSG로 약함) 투여

DES 실험으로 치사시키고 남은 63마리의 흰쥐들에 PMSG 7.5IU를 복강내에 주사하여 48시간 후에 이중 실험군 11마리, 대조군 10마리를 치사시키고 난소의 무게를 측정하고 앞서 기술한 바와 같은 방법으로 난소의 조직학적 소견을 비교관찰하였다.

3) Human chorionic gonadotrophin(이하 HCG로 약함)

다시 48시간 후에 PMSG 실험후 남은 42마리의 흰쥐들에 HCG 7.5IU를 복강내에 주사하여 과도배란을 유발시켰다. 이때 수정이 가능한 수컷쥐와 1 : 1의 비율로 동서케 하였다. 그후 24시간 후에 질전(vaginal plug)이 형성되면 성교가 이루어진 것으로 간주하였다.

4) 배란과 수정

이들 42마리의 실험군(21마리)과 대조군(21마리)의 흰쥐는 성교의 확인후 24시간이되면 난관을 자궁과 난소로부터 절단하여 1ml의 배양액이 담겨진 petri dish로 옮긴후 난관에 관류법(flushing technique)을 시행하여 변성된 난모세포, 1세포 및 2세포 등 모든 세포들을 세어서 배란된 숫자를 계산하였다.

수정의 확인(Edwards et al, 1980)은 제 2극체(2nd polar body)가 나타나고 특징적인(nucleoli)을 가진 잘 발달된 전핵(pronucleus)이 형성 되거나(Fig. 1) 난황(vitellus)안에 침입된 정자의 일부가 보이는 경우로 정하였다. 다정자수정(polyspermia)과 난자분열(fragmentation)을 제외한 1세포 및 2세포의 배아들을 정상적인 수정으로 간주하였다. 정상적인 1세포기

(Fig.1) 2세포기 배아(Fig.2)들을 pasteur pipette로 2 ml T₁의(modified Tyrodes)배양액이 담긴 organ culture dish에 넣어 5% CO₂와 37°C를 유지한 배양기에 배양시켰다. 그후 4일간 매일 inverted binocular microscope로 관찰하여 배아 초기의 분할정도를 비교하였다(Fig. 3).역시 이 경우에도 이들의 난소무게를 측정하였으며 같은 방법의 염색법으로 난소의 조직화학적 소견을 관찰하였다. 배양액은 T₁에 10% calf serum을 섞어서 만들었다(Wood et al 1984).

III. 실험성적

1) Diethylstilbesterol 투여후 6일째(생후 28일째)

실험군에서는 대조군에 비하여 난소의 크기가 더 커졌으며 그리고 더 많은 수의 다발성 난포전강의 자극현상을 보였다. 또한 실험군에서는 대부분 오직 건강난포전강의 양상만을 보인 반면, 대조군에서는 크기가 적게 보이는 난소에 원시난포(primitive follicle), 난포전강(preantral follicle) 및 난포강(antral follicle)등 한 시점에서 여러기의 다른 난포양상을 보여 주었다(Fig. 4, 5).한편 난소의 무게는 대조군이 평균 1.83±0.13mg인데 반하여 실험군에서는 3.18±0.14mg인바 거의 2배 가까운 증가를 보였다(Table 1).

2)PMSG 투여 48시간후(생후 30일째)

역시 대조군에 비하여 실험군에서 더 커진 난소조직을 볼 수 있었고 소수의 난포전강 외에 다수의 아주 잘 발달되고 충분한 난포액을 가진 배란전 난포(preovulatory follicle)들과 퇴화현상(atresia)을 보이는 다수의 난포강들이 있었다. 대조군에서PMSG



Fig. 3. In vitro fertilized 8-10 cell mouse embryo stage. It show 8-10 cell stage which developed from 2 cell or 1 cell ova cultured in vitro(X 50).

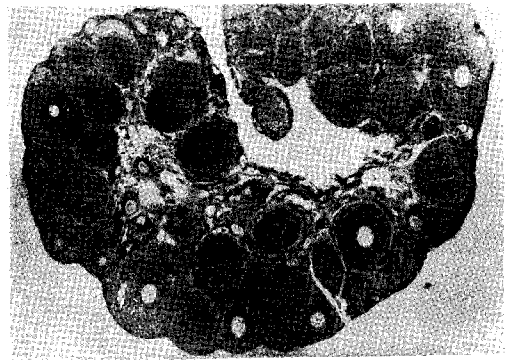


Fig. 4. After 6 days DES, day 28. It shows only apparently healthy multiple preantral follicles in large ovarian tissue(X 25).

Table 1. Ovarian weight (mg)

| | After DES | 48hr. after PMSG | 48hr. after HCG |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Control group | 1.83 ± 0.13(10) | 5.98 ± 0.20(11) | 7.48 ± 0.74(21) |
| Experimental group | 3.18 ± 0.14(10) ^{***} | 8.95 ± 0.32(10) ^{***} | 11.85 ± 1.41(21) [*] |

^{*}P<0.05, ^{***}P<0.01 compared with control mean ± S.D., (): number of mouse

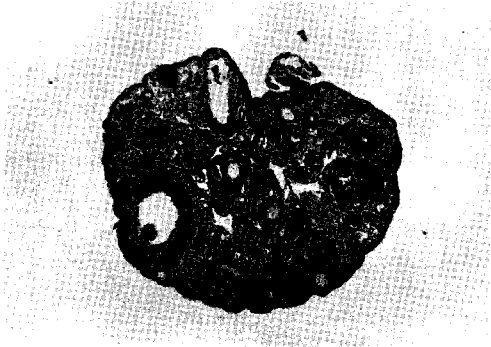


Fig. 5. Control, day 28. It shows various stage of follicles is primordial, preantral, antral follicles in smaller ovarian tissue(X 25).



Fig. 6. 48hr. after PMSG, day 30. It shows well developed preovulatory follicles and more of the antral follicles which showed signs of atresia(X 50).

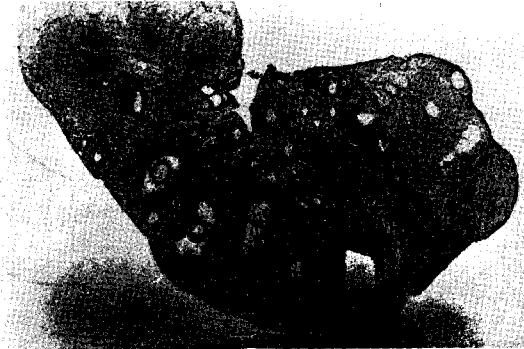


Fig. 7. Control, day 30. It shows a higher incidence of premature luteinization(X 50).

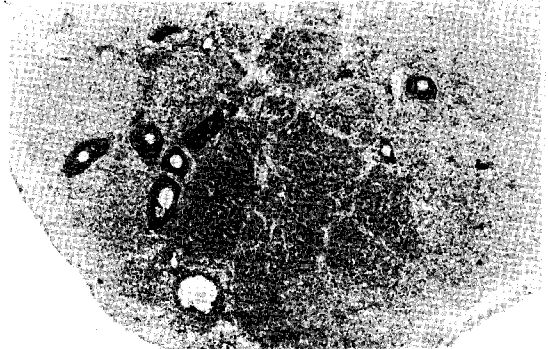


Fig. 8. 48hr. after HCG, day 32. It shows numerous corpora lutea with all lutein cells and occasional luteinized unruptured follicles in larger ovarian tissue (X 50).

투여 전과 비교해서 더 큰 난소조직을 보이나 실험군보다는 일반적으로 각기의 난포양상이 작게 보였다. 그리고 배란전 난포와 난포강의 조기 황체화현상(premature luteinization)이 있었다(Fig. 6, 7). 실험군의 평균 난소 무게는 8.95 ± 0.32mg으로 대조군의 5.98 ± 0.20mg보다 훨씬 무거운 무게를 보이며, 실험군과 대조군에서 공히 PMSG 투여 전 보다 약 3 배 가까운 무게의 증가를 보였다(Table 1).

3) HCG 투여 48시간후(생후 32일째)

역시 대조군에 비하여 실험군에서 더 커진 난소

조직을 보여 주었고 양군에서 수많은 황체조직들과 소수의 황체화된 비파열난포(luteinized unruptured follicle)들을 보이고 있다. 실험군에서 더 많은 황체들을 보이고 있으며 이 황체들은 모두 황체세포(luteal cell)들로 구성되어 있었다(Fig. 8, 9).

실험군에서의 난소무게는 평균 11.85 ± 1.41mg으로 대조군의 7.48 ± 0.74mg보다 무거운 무게였다.

4) 배란(ovulation)에 대한 영향

배란의 과정은 변성된 난모세포(degenerated oocy-

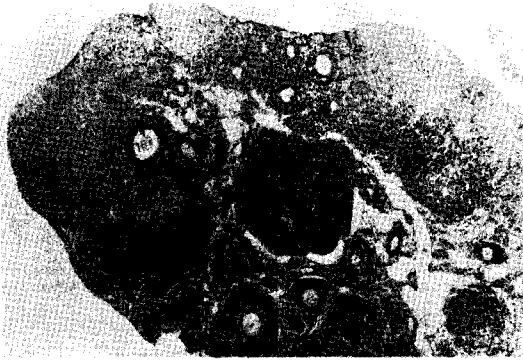


Fig. 9. Control, day 32. It shows moderate number of corpora lutea and occasional luteinized unruptured follicles in smaller ovarian tissue(X 50).

Table 2. The number of ovulations

| | Number of ovulations |
|--------------------|----------------------|
| Control group | 37.7 ± 8.3 |
| Experimental group | 54.0 ± 14.7 |

te), 1 세포 및 2 세포 등 난관의 관류법으로 발견할 수 있는 모든 세포들을 세어서 평균치를 구하였다. 실험군에서 54.0±14.7개로 대조군의 37.7±8.3개 보다 많은 수의 배란이 유도 되었고, 60개 이상의 많은 배란을 유발할 수 있었던 흰쥐의 수에서도 실험군에서 52.4%로서 대조군의 33.3%보다 높은 비율을 보였다(Table 2, 3).

5) 수정(Fertilization) 및 배아 초기 난할(cleavage)에 대한 영향

정상 수정은 실험군에서 22.7±4.3개로 대조군의 23.3±7.5개와 비슷한 수준을 보였으며 또한 2 세포기 이상으로 난할되는 비율은 실험군이 75.0%, 대조군이 82.1%로서 오히려 대조군에서 약간 높은 경향을 보이고 있다(Table 4, 5)

IV. 고 찰

난포전강(preantral stage)으로 발달되는 과정은 뇌하수체가 절제된 쥐에서도 볼 수 있는데(Jones et al 1959) 이것은 난포형성 과정이 뇌하수체성 성선자극호르몬과 관련이 없다는 것을 지적해준다. 그러나 연구되어온 모든 포유동물에서 난포형성 과정의 마지막 단계 즉 큰 난포전강의 배란전 난포(pre-ovulatory follicle)로의 성숙은 절대적으로 여포자극호르몬과 황체화호르몬의 자극에 좌우된다. 주요 형태학적 및 세포학적인 사건들은 (1) 난포강(ant-

Table 3. The number of animals with more than 60 ovulations

| | Number | % |
|--------------------|--------|------|
| Control group | 7/21 | 33.3 |
| Experimental group | 11/21 | 52.4 |

Table 4. The number of normal fertilization

| | The number of embryos normal fertilization |
|--------------------|--|
| Control group | 23.3 ± 7.5 |
| Experimental group | 22.7 ± 4.3 |

Table 5. In vitro cleavage percent of mouse embryo

| | The proportion of % with more than 2 cell embryo |
|--------------------|--|
| Control group | 82.1 |
| Experimental group | 75.0 |

ral cavity)의 획득, (2) 과립막세포 aromatase의 유도 및 활성화, (3) 황체호르몬 생합성 과정에 포함된 효소들의 자극 및 활성화, (4) 과립막세포에서 황체화호르몬 수용체의 유도 등이다(Zelenznik et al, 1984). 난포강액 형성에 대해 자세히 알지는 못하지만 여포자극호르몬의 영향과, 아마도 황체화호르몬 자극하에서 과립막세포에 의한 proteoglycan의 생산이 이 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져있다(Miyamoto et al, 1973).

본 연구에서도 아직 미성숙된 뇌하수체를 소유한 미숙흰쥐에 DES로 처리하여 난소무게가 대조군보다 더 커지고(Table 1) 자극된 난소조직에서 건강한 많은 다발성 난포전강들을 볼 수 있었던 반면 대조군에서는 원시난포, 난포전강, 난포강 등 여러기의 난포들이 발견되어 전술된 난포 형성과정이 뇌하수체성 성선자극호르몬과 관련이 없을 것이라는 보고를 뒷받침 하고 있다. 이때 난소무게는 3.18±0.14mg으로 대조군의 1.83±0.13mg보다 더 무겁고 크기가 Fig. 4, 5와 같이 더 커져 있었다.

성선자극호르몬으로 치료하는 동안 난소의 시각적 검사로도 많은 큰 난포강의 존재를 알 수 있었다.(Zelenznik et al, 1980)

성선자극호르몬 중 여포자극호르몬의 세포학적인 주요 역할은 (1) 황체화호르몬의 조절하에서 난막(theca)에 의해 생산되는 androgen과 결합하여 aromatase를 활성화시켜 난포로 하여금 많은 량

의 estradiol을 생산케한다.(Hillier et al, 1981) (2) 황체호르몬 생산과 관련된 효소의 작용을 증가시켜서 배란후 황체로의 전이에 따른 황체호르몬을 급격히 생산할 수 있도록 난포를 변화 시킨다. (3) 과립막 세포에 황체화호르몬을 위한 수용체를 유도하여서 난포로 하여금 배란을 하게한다.(Trickson et al, 1979)

한편 황체화호르몬은 여포자극호르몬으로 조치된 난포의 마지막 성숙을 유도하여 기능성 황체로 발전시키며 난포내 난막세포에 국한되어 난포내 androgen치를 유지하는 기질(substrate)의 역할 및 aromatase의 조자극제(costimulant)로서 제공된다 (Mc Natty et al, 1983; Zelenznik et al, 1980).

본 연구에서 estrogen의 전 처치로 자극된 난소조직에서 많은 건강한 난포전장을 얻은 후, 순수한 성선자극호르몬 추출물인 PMSG를 투여하여, 실험군에서 많은 난포강으로의 발육을 보인 반면, estrogen으로 전 처치되지않은 미숙회귀체인 대조군에서는 상당수에서 난포의 조기 황체화현상을 보였다.

이것은 성선자극호르몬과 관련이 없이 난포 형성 과정을 이룰 수 있지만 이 호르몬 작용의 결과로 estradiol이 합성되어 지는바, 성선자극호르몬이 정상적인 기능을 하는 성숙회귀의 경우에 해당되는, estrogen으로 전 처치한 실험군의 예에서 다수의 건강한 배란전 난포강(preovulatory follicle)들을 얻어서 estrogen과 성선자극호르몬과의 밀접한 상호작용을 알 수 있었다.

성선자극호르몬 작용이 없는 estrogen은 난포발육을 자극하여 난포퇴화(follicle atresia)를 감소시킨다.(Hillier et al, 1978). estrogen은 직접 과립막세포증식과 난포크기를 증가시키며 성선자극호르몬의 모든 난포내 여포자극호르몬 수용체의 양과 과립막세포 감수성의 증가를 유도한다.(Richards et al, 1980). 그래서 적절한 estrogen과 여포자극호르몬 처치는 여포자극호르몬 단독 투여보다 난포강의 성장과 형성의 발달에 더욱 도움을 주나 아주 정제된 여포자극 호르몬 단독 으로는 오직 약간의 난소 estrogen의 양만을 증가시킨다.(Richards et al, 1980). 즉 여포자극 호르몬만으로는 정상 estrogen합성을 자극하지 못하고 또한 여포자극호르몬이나 estrogen은 난포막세포와 간질세포의 형태를 변성시키지 못하는데 이 세포들은 여포자극호르몬 수용체를 갖고 있지 않다. estrogen은 여포자극호르몬과 같이 이용되어 야만 과립막세포 수용체의 농도가 증가될 뿐 아니라 수용체의 유도를 촉진시켜 준다(Tonetta et al, 1983). estrogen은 성숙 배란전 발육을 통하여 여포자극 호르몬과 황체화호르몬에 대해 과립막세포의 감수성을 계속 증가시킨다. 이 성선자극호르몬에 대한 과

립막세포 반응의 estrogen 조절은 여포자극호르몬과 황체화호르몬으로 자극된 cyclic AMP 축적의 증가와 이들 세포내에서 이용되는 cyclic AMP부착 장소의 수가 증가되는 것과 관련이 있다 (Dorrington et al, 1983).

Estrogen은 성숙난자로 운명 지워지는 물질들을 생산하는 데에 관여하는 간장과 난관의 작용을 조절하며 이형성합성(heterosynthetic) 대사물들은 수정과, 수정후 초기의 사건들에서 많은 다른 역할들을 이행하는 넓은 범위의 물질들을 포함하고 있다 (Tata, 1983). 배란기전에 관련된 estrogen이 난포내 주도자로서 중추적인 역할을 한다고 하며 estradiol은 배란전 난포의 주요 내분비 생성물로 난포가 배란전 발육의 후기에 도달함에 따라 최고의 양이 혈류안으로 방출되어진다. estradiol 최고치의 순환말 초혈액농도에서 뇌하수체전엽으로부터 황체화호르몬의 배란유도 분비에 폭발적인 작용을 한다.

뇌하수체를 절제한 미숙 쥐에서 estrogen은 과립막세포의 증식을 자극하고 난포퇴화의 빈도를 감소시키며 여포자극호르몬의 난소 흡수 자극 (Goldenberg et al, 1972) 및 과립막세포-황체화호르몬의 수용체 유도에 참여하였다(Richards et al, 1976). 반면에 내인성이던 혹은 전신적으로 투여되었던 간에 androgen은 난포발달에 관한 estrogen의 자극적 현상을 억제하였으며 난포전장 퇴화현상(preantral follicular atresia)을 야기시켰다(Wang et al, 1982).

Estrogen이 난포내 주도자로서 중추적 역할을 한다는 것을 바탕으로 미숙 쥐에 외인성 estrogen의 전신적 투여로 난소 크기의 증가 및 난포전장의 발육을 자극한다는 것을, 본 실험에서 증명할 수 있었다. 즉 외인성 estrogen도 과립막세포층에 직접적으로 작용을 하며 난포 크기를 증가시켜 난포강의 성장과 형성발육에 도움을 주었으나 난포막세포와 간질세포의 형태에는 영향을 주지 못하였다.

쥐는 다발정형포유류로서 임신 혹은 위임신(pseudopregnancy)에 의해서 중단되지 않는 한 발정이 4~5일 간격으로 되풀이 되고 이것은 뇌하수체와 난소성호르몬의 주기적인 상호작용에 의해서 이루어진다. 배란은 교미와 관계없이 발정기에 자발적으로 일어나며 여포자극호르몬에 의해서 난포세포의 증식이 자극되면 황체화호르몬의 혈중농도가 올라가서 난포액의 급격한 증가가 일어나므로 난포가 파괴되어 배란이 일어나게 된다. 배란은 한 주기의 리듬과 관계가 있어서 규칙적인 명암의 주기로 사육되고 있으면 주로 새벽에 잘 일어나고, 수정은 난관의 팽대부 혹은 상단근처에서 일어나게 된다. 배란후 10~12시간까지는 수정이 이루어지고 정상

적인 배아로 진행되지만 그 이상 경과되면 난자로서의 기능을 소실하여 난관이나 자궁내에서 퇴화되어 흡수된다. 쥐의 난관에서 분비물은 많은 양의 bicarbonate를 포함하고 있으며 그 농도는 혈액의 농도와 비슷하고 바닷물 보다는 10~15배 정도 높은 것으로 알려졌는데(Zelenznik et al, 1980) 이것은 Biggers(Biggers et al, 1967)에 의해 쥐의 수정란 배양에 있어서 필수적으로 필요한 것으로 보고되었다.

외인성으로 작용을 하는 여포자극호르몬과 황체화호르몬을 주성분으로 하는 PMSG와 HCG를 주사하여 다수의 배란을 유도할 수 있는데 HCG를 주사한지 11~13시간 이내에 배란이 발생되므로 배란된 난자의 나이는 HCG를 주사한 시기와 난자를 채취한 시기 사이의 기간으로 추정할 수 있다.

PMSG에 의한 과도배란(superovulation)의 방법은 높은 배란전 estrogen치를 유도해 주고, 초기 난포기에서 높은 여포자극호르몬치로의 도달로 마지막 난포성숙을 위한 불일치(asynchrony)를 억제할 수 있는 많은 수의 난포들을 얻을 수 있다. 경우에 따라서는 억제되지 않는 불일치를 갖는 많은 난포들의 모집을 초래하는 바람직하지 못한 과도배란에서는 이들 난포들에 포함되어 있는 난모세포에 결함을주는 내분비환경이나 비정상적인 황체기환경 및 수정난할, 착상실패 등의 빈도를 증가시킨다고 한다(McNatty et al, 1983).

본 연구에서 PMSG 투여후 실험군에서 난소가 대조군에 비하여 더 큰 난소조직을 보여주고 조직학적 소견상 다수의 건강하고 바람직한 배란전난포강을 얻은 반면 estrogen으로 전처치 되지 않은 대조군에서는 초기 황체화된 난포들을 보였다. 이때 난소의 무게는 $8.95 \pm 0.32\text{mg}$ 으로서 대조군의 $5.98 \pm 0.20\text{mg}$ 에 비하여 더 무겁고 실험군이나 대조군 모두 다 PMSG투여전에 비하여 약 3배에 가까운 무게를 보였다.

HCG는 영양배(trophoblast)에서 분비되는 호르몬으로 황체화호르몬과 비슷한 생물학적인 작용을 갖고 있어 이것의 투여는 황체화호르몬 썩기작용(LH surge)의 역할이 기대되는 일치성 난포들(synchronized follicles)을 얻는데 있다.

본 연구에서 HCG 투여후 조직학적 소견은 실험군에서 더 큰 난소조직을 보여 주었고 한편 더 많은 황체화된 세포로 구성된 황체들을 볼 수 있었다. 이때 실험군의 난소무게는 $11.85 \pm 1.41\text{mg}$ 으로 대조군의 $7.48 \pm 0.74\text{mg}$ 보다 무거웠다. PMSG와 HCG 투여후 estrogen으로 전처치된 실험군이 대조군에서 보다 더 건강하고 바람직한 조직학적 소견을 얻었으나 estrogen의 전처치 여부가 배란, 수정 및

난할과정에 특별한 역할을 못 미치는 결과를 얻은 바, 여기에서의 과도배란이 성공적인 방법인지 여부는 알 수 없었다.

Austin(Austin, 1951)과 Chang(Chang, 1951)은 자궁내에서 정자의 capacitation을 보고 하였고 Brinster(Brinster, 1965)는 난관을 시험관내로 이식한 쥐의 수정란을 낭포기까지 발달시키고 토끼, 쥐, 햄스터 등의 동물들을 이용하여 난자의 성숙, 배양액에서의 수정 및 초기배아의 난할 등 많은 연구들이 진행되어 왔다. 특히 시험관내 수정을 위해 각 종(species)에 따른 배양액들의 개발이(Barister, 1981) 인간에서 체외수정(in vitro fertilization and embryo transfer)을 가능케 하였다. 배양액에서 이런 쥐의 배아 배양은 현재 인간의 체외수정 프로그램에서 배양액의 적합성 여부를 판정하는 방법(mouse quality control assay)으로서 필수적으로 선택되어 이용되고 있는 실정이다(Ackerman, 1984).

Estrogen이 성숙난자로 운명지워지게 하는데 관여하는 물질의 생산처인 간장과 난관의 작용을 조절하고 초기배아의 골격, 세모막, 핵산 등에 간접적으로 영향을 미치고 있다는 보고(Tata, 1983)에 근거를 두고 본 실험에서 두번째 목적으로 외인성 estrogen이 배란과 수정 및 초기배아의 난할에 대해 미치는 영향을 알아본 바 본 실험의 실험군에서 54.0 ± 14.7 개로 대조군의 37.7 ± 8.3 개 보다 많은 수의 배란이 유도되었다. 그리고 60개 이상의 많은 배란을 유발한 흰쥐의 수도 실험군에서 52.4%로서 대조군의 33.3% 보다 높은 비율이었다. 즉 대조군보다 많은 수의 배란을 보였다. 그러나 수정은 실험군에서 22.7 ± 4.3 개로 대조군의 23.3 ± 7.5 와 비슷한 수준이며 그리고 2세포기 이상 난할되는 비율은 실험군 75.0%, 대조군이 82.1%로서 오히려 대조군에서 약간 높은 경향으로 수정과 초기배아의 난할에 있어서는 양군에 있어서 비슷한 성적을 보여주었다.

저자는 이 실험을 통하여 외인성 estrogen의 전신적 요법으로 난소의 과립막세포에 직접적 자극효과와 건강한 난포강으로의 발달을 유도할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 estrogen과 동반된 과도배란의 처치가 배란과 수정 및 초기배아의 난할 과정에 적어도 나쁜 영향을 끼치지 않는다는 결론을 얻을 수 있어 외인성 혹은 내인성이면 간에 estrogen은 배란기전에서 주도적 역할자의 하나라는 것을 알 수 있었다.

V. 결 론

DES로 전처리한 생후 21~23일 된(체중 10g 내외) Inbred ICR계통의 흰쥐에 PMSG와 HCG를 이용하여 과도배란(superovulation)을 유발시킨 후estrogen이 미숙쥐(생후 28~32일 사이)에서 난소의 조직학적 형태와 배란, 수정 및 초기 배아 난황에 미치는 영향에 관련된 사항 등을 관찰하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 난소의 무게는 Diethylstilbesterol로 전처리한 후 6일째에 $1.83 \pm 0.13\text{mg}$ 에서 $3.18 \pm 0.14\text{mg}$ 으로 유의하게 증가되었다.

2. Diethylstilbesterol로 전처리된 실험군에서 난포전강들의 발육이 있었다.

3. Pregnant mare serum gonadotrophin으로 처리 후 48시간에는 실험군에서 더 많은 난포강의 퇴화를 보인 반면 대조군에서는 조기황체화를 흔히 볼 수 있었다.

4. Human chorionic gonadotrophin을 투여 후 48시간에는 실험군에서 더 많은 황체조직을 볼 수 있었다.

5. 60개 이상의 배란을 일으켰던 흰쥐는 실험군에서 52.4%로서 대조군의 33.6%보다 유의하게 높았다. 그러나 2세포기 이상으로 난황되는 비율은 실험군이 75.0%, 대조군이 82.1%로서 오히려 대조군에서 약간 더 높은 율을 보였다.

REFERENCES

- Ackerman, S.B.: *Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human in vitro fertilization. Gamete Research*, 9:145-152, 1984.
- Austin, C.R.: *Observation in the penetration of sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. Series B*. 4:581-596. 1951.
- Bavister, B.D.: *Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success. Fertilization and embryonic development in vitro. pp. 41-60, Plenum Press. New York. 1981.*
- Biggers, D.G. et.al.: *The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. Nat. Acad. Scie. U.S.* 58:560, 1967.
- Brinster, R.L.: *Studies on the development of mouse embryos in vitro IV, Interaction of energy sources. J. Reprod. Fert.* 10:227-240, 1965.
- Chang, M.C.: *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature.* 168:697, 1951.
- Dorrington, J.H., et. al.: *Hormonal interactions in the control of granulosa cell differentiation. J. Steroid Biochem.* 19:17-32, 1983.
- Edwards, R.G., Steptoe, P.C., and Purdy, J.M.: *Establishing full term human pregnancies with cleaving embryos grown in vitro. Br. J. obstet. Gynecol.* 87:757-768, 1980.
- Erickson, G.F. et. al.: *Induction of functional LH receptors in rat granulosa cells cultured in a chemically defined medium. Nature.* 279:336, 1979.
- Fraser, L.R., and Drury, L.M.: *The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of mouse eggs. Biol. Reprod.* 13:513-518, 1975.
- Goldenberg, R.L. et. al.: *Estrogen and follicle stimulating hormones interactions on follicle growth in rats. Endocrinology.* 90:1492, 1972.
- Hammond, J. Jr.: *Recovery and culture of tubal mouse ova. Nature.* 163:28-29, 1949.
- Hillier, S.G. et. al.: *Control of Preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:874, 1981.
- Hillier, S.G. et. al.: *Independence of steroidogenic capacity and LH receptor induction in developing granulosa cells. Endocrinology.* 102:937-946, 1978.
- Hillier, S.G., and Ross, G.T.: *Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogenprimed hypophysectomized immature female rats. Biol. Reprod.* 20:261, 1979.
- Hoppe, P.C., and Pitts, S.: *Fertilization in vitro and development of mouse ova. Biol. Reprod.* 8:420-426, 1973.
- Ireland, J.J., and Roche, J.F.: *Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotrophins. Endocrinology.* 112:150-156, 1983.
- Jones, E.C., and Krohn, P.L.: *Influence of the anterior pituitary on the aging process in the ovary. Nature.* 183:1155, 1959.
- Lewis, W.H., and Gregory, D.W.: *Cinematographs of living developing rabbits eggs. Science.* 69:226, 1929.
- Louvet, J-P, and Vaitukaitis, J.L.: *Induction of follicle stimulating hormone receptors in rat ovaries by estrogen priming. Endocrinology. pp. 758-764, 1976.*
- McLaren, A., and Biggers, J.D.: *Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryo. Nature.* 182:877, 1958.
- McNatty, K.P. et. al.: *Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. J. chin. En-*

- doc. Metab.* 56:1022-1031, 1983.
- Miyamoto, H., and Chang, M.C.: *The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs in vitro.* *J. Reprod. Fertil.* 32:193-205, 1973.
- Miyamoto, H., and Chang, M.C.: *Fertilization in vitro of mouse and hamster eggs after the removal of follicular cells.* *J. Reprod. Fertil.* 30:309-312, 1972.
- Mueller, P.L. et. al.: *FSH Stimulates ovarian synthesis of proteoglycans in the estrogen stimulated hypophysectomized immature female rat.* *Endocrinology.* 102:824, 1978.
- Oliphant, G., and Brackett, B.G.: *Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extracts.* *Fertil. Steril.* 24:948-955, 1973.
- Richard, J.S.: *Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular differentiation.* *Physiol. Rev.* 60:51-89, 1980.
- Richard, J.S., Jonassen, J.A. et. al.: *Adenosine 3', 5' monophosphate, LH receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: Effects of estradiol and FSH.* *Endocrinology.* 104:765-773, 1979.
- Richards, J.S., and Rolfes, A.I.: *Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles.* *J. Biol. Chem.* 255:5481-5489, 1980.
- Richards, J.S., and Midgley, A.R.: *Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development.* *Biol. Reprod.* 14:82, 1976.
- Tata, J.R.: *Introduction. Molecular biology of egg menstruation.* pp. 1-5, Pitman book. London. 1983.
- Tonetta, S.A., and Ireland, J.J.: *Estradiol required for increase in FSH receptor? Biol. Reprod. (Suppl. No.1) 28:Abstr. 58, 1983.*
- Veldhuis, J.D., Klase, P.A., et. al.: *Facilitative interactions between estradiol and luteinizing hormone in the regulation of progesterone production by cultured Swine granulosa cells: relation to cellular cholesterol metabolism.* *Endocrinology.* 111:441-449, 1982 b.
- Wang, C., Hsueh, A.J.W.: *Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells.* *J. Biol. Chem.* 257:6077-6083, 1982.
- Whitten, W.K.: *Culture of tubal mouse ova.* *Nature.* 176:96, 1956.
- Wolf, D.P., Inoue, M., and stark, R.A.: *Penetration of Zona-free mouse ova.* *Biol. Reprod.* 15:213-221, 1976.
- Wood, C., and Trounson, A.: *In Vitro fertilization and embryo growth, clinical in vitro fertilization.* pp. 104, Springer-Verlag. Berlin. 1984.
- Zeleznik, A.J., and Hillier, S.G.: *The role of Gonadotrophins in the selection of the preovulatory follicles.* *Clinical Obstetrics and Gynecology.* 27:927, 1984.
- Zeleznik, A.J. et. al.: *Progesterone does not inhibit gonadotrophin-induced follicular maturation in the female rhesus monkey.* *Endocrinology.* 105:1820, 1980.