

## Human Chorionic Gonadotropin (HCG) 에 의한 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 배정효과

박인석 · 김형배 · 최희정 · 이영돈\* · 손진기  
한국해양연구소 해양생물공학연구실, \*제주대학교 해양연구소

### Stimulation of Spermiation by Human Chorionic Gonadotropin (HCG) in Mature Flatfish, *Paralichthys olivaceus*

In-Seok Park · Hyung-Bae Kim · Hee-Jeng Choi · Young-Don Lee\*  
and Jin-Ki Son

*Marine Biotechnology Laboratory, KORDI, Ansan P.O. Box 29,  
Seoul 425-600, Korea*

*\*Marine Research Institute, Cheju National University,  
Cheju-do 695-810, Korea*

For the evaluation of hormonal control of sperm in cultured fish a method to quantify the spermiation response of mature flatfish to hormonal therapy is described.

Spermatocrit was determined after 30 min. in centrifuge condition of 12,000rpm. Sperm density was estimated by a standard hemacytometer method. However, sperm density can be predicted from spermatocrit since their relationship is linear as described by the regression equation,  $Y=1.14X-0.04$  ( $r=0.91$ ,  $P<0.0001$ ,  $n=50$ ), where  $Y$  is spermatocrit and  $X$  is sperm density. Sperm density levels ranged from 21.5 to  $98.4 \times 10^6$  spermatozoa per  $\mu\ell$  milt corresponding to spermatocrit values of 12 to 95%. Milt production by mature flatfish was highest (7.4ml per kg body weight) at 24h after injection of 1,000IU of human chorionic gonadotropin(HCG) per kg body weight and coincided with low spermatocrit(63%) and sperm density ( $67.4 \times 10^6$  spermatozoa per  $\mu\ell$  milt) levels. No significant differences was appeared in milt production, spermatocrit and sperm density between control and HCG-treated fish at 48h after HCG injection.

These results demonstrate that spermiation in mature flatfish can be reliably evaluated by a spermatocrit method and that HCG is effective in stimulating of spermiation in this species.

Key words : 배정(spermiation), 태반성 성선자극호르몬(HCG, human chorionic gonadotropin), 넙치(flatfish, *Paralichthys olivaceus*)

## 서 론

어류의 정자형성, 배정촉진을 위해 주사 및 어체내 이식되는 호르몬으로는 gonadotropin releasing hormone, gonadotropin 및 steroid 가 주로 사용되고 있으며 이들 호르몬에 의한 성성숙은 난소에 비해 정소가 비교적 용이하고 단순하다. gonadotropin 중 어류배정에 가장 효과적인 호르몬은 human chorionic gonadotropin (HCG) 으로서 goldfish 100-10,000IU/kg의 HCG에서 농도의존적 배정효과를 나타낸바 있으며, 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*), sea-bream (*Sparus aurata*), milkfish (*Chanos chanos*), European eel (*Anguilla anguilla*) 및 Japanese eel (*Anguilla japonica*)에서 역시 효과적인 배정을 나타내었다 (Donaldson and Hunter, 1983). 그렇지만 이러한 호르몬 조절에 의한 성숙 어류의 배정효과는 그 반응효과를 명확히하기 어려워 단지 착출정액의 양과 밀도를 기준한 배정반응의 측정과 아울러 spermatocrit 측정에 의한 배정의 질적 평가가 연어과 어류에 적용된 바 있다 (Shehadeh et al., 1973; Juario et al., 1980; Munkittrick and Moccia, 1987).

현재 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 국내에서 육상 및 가두리양식으로 사육되고 있으며, 인공종묘생산에 의한 완전양식이 이루어지고 있는 주요 해산어 양식어종이다. 이들의 다산란에 의한 안정적 종묘의 공급 및 우량종묘의 생산을 위하여 수온, 빛 등의 환경적요소의 조절 및 호르몬 처리에 의한 수정란 생산시 난자, 정자의 최적 조건 유도가 선행되는 종묘생산이 필요시 된다 (Min, 1988).

따라서 본 연구에서는 넙치에서 효과적인 인공수정을 이루기 위한 연구의 일환으로 spermatocrit 측정 및 정액생산, 정자능도를 병행측정하여 HCG

의 단독주사에 의한 성숙넙치에서의 배정효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

실험어로 수컷 넙치(평균전장 47.9±4.7cm, 평균체중 1.2±0.3kg)가 사용되었다. 실험어는 해수와 산소가 공급 되는 직경 5m의 육상실내 사육조에서 사육되었으며, 이때 수위는 중앙의 높이 2m의 배수관으로 유지하였다(Fig. 1). 실험시의 해수수온은 20±1°C, 비중은 1.025, pH는 8.2~8.5이었다. Park 등(1988)의 방법에 의거 100ppm lidocaine/NaHCO<sub>3</sub>로 실험어를 마취후 전장 및 체중을 측정하였다. 실험어의 생식공 부위를 깨끗이 닦은후 이물질을 제거하였으며, 가벼운 압박으로 정액을 손으로 착출하였다(Fig. 2-a). 착출된 정액은 1.0ml 용량의 1회용 주사기로 수집하였으며 수집된 정액은 분석시까지 냉장보관하였다.

spermatocrit 측정을 위한 안정된 원심분리 조건을 구하기 위하여 3마리의 배정중인 넙치로부터 정액을 nonheparinized microhematocrit capillary tube (i. d. 1.1~2.2mm×75mm, Fisher Scientific) 와 sealing compound (Fisher Scientific) 을 사용하여 microhematocrit centrifuge (Hettich, Japan) 에서 12,000rpm으로 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 분간 원심분리 하였다. spermatocrit은 hematocrit meter (Hettich) 로 측정하여 백분율로 나타내었으며, 처리시 평균간 변이는 Duncan's multiple range test에 의한 변위분석 비교로 이루어졌다. 산란시기에 1개월에 걸쳐 50마리의 수컷으로부터 정액을 채취하였으며, 채취된 정액은 blood diluting pipette 를 사용하여 0.9% NaCl로 희석하였으며, 희석된 정액은 hemocytometer counting chamber에 채워

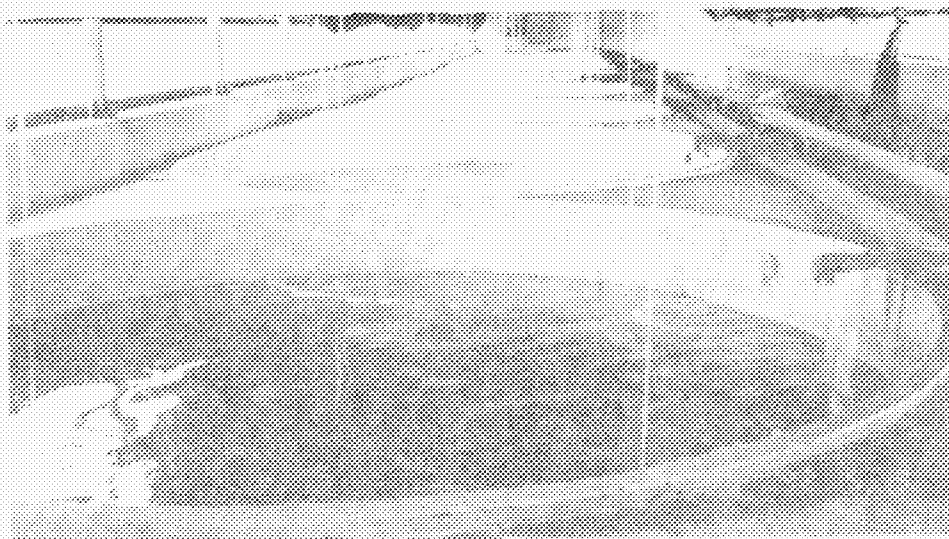


Fig. 1. Indoor tank(5m diameter) provided with flow-through seawater and aeration used in this study.

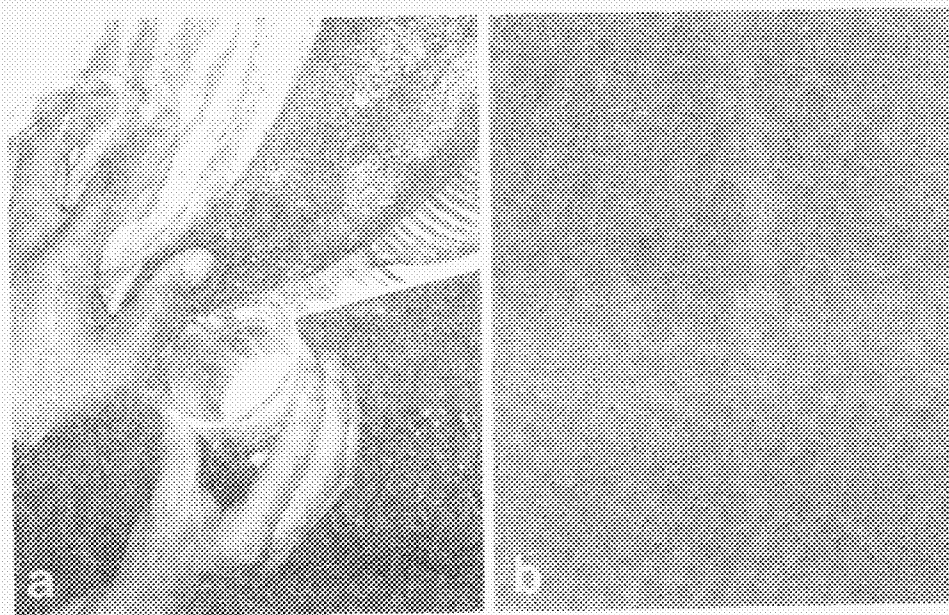


Fig. 2. a, Milt collection by hand-stripping. Fish were anesthetized with 100ppm lidocaine/ $\text{NaHCO}_3$ , and then each fish was weighted and laid on its dorsal side. The urogenital area was wiped clean and dried with absorbent paper. Urine and some feces were initially forced out by gentle massage of the abdomen. ; b, External morphology of flatfish (*Paralichthys olivaceus*) spermatozoa(400x mag.).

진 후 400×의 배율하에서 계수하였다. 정자밀도는  $\mu\text{l}$  정액당 정자의 수로 계산하고, 정자밀도와 spermatocrit의 관계는 두변량 사이에서 1차식으로 표현하였다.

HCG처리에 의한 배정효과를 알아보기 위하여 HCG주사시, HCG주사후 24시간 및 HCG주사후 48시간에 대조군 및 HCG처리군을 대상으로 spermatocrit, 정자밀도 및 정액생산을 조사하였다. 사육조에서 임의로 표본된 성숙넙치 수컷 20마리가 정액을 보였으며 이들 20마리의 성숙넙치 수컷이 실험에 사용되었다. Park 등(1988)의 방법으로 마취후 각 실험어는 50g 단위로 체중을 측정하였고, Garcia and Gapasin(1988)의 방법에 의해 아가미 뚜껍에 tagging하였다. 실험어는 대조군(n=10), HCG처리군(n=10)으로 구분하였다. HCG처리군을 대상으로 1ml용량의 1회용 주사기로 생리식염수에 희석된 HCG를 1,000IU/kgBW 농도로 복강 주사하였으며 대조군은 단지 체중 kg당 1ml의 생리식염수를 복강주사하였다. 주사후 각 실험어는 Fig. 1과 유사한 사육조에 공동수용하였다.

정액은 주사시, 주사후 24시간 및 주사후 48시간에 손으로 착출하였으며, 착출정액을 대상으로 spermatocrit와 정자밀도는 상기 기술법에 의해 측정하였고 아울러 정액생산(착출정액량/kg체중)을 측정하였다. 주사시, 주사후 24시간, 주사후 48시간에서 대조군 및 HCG처리군간의 spermatocrit, 정자밀도 및 정액생산에서의 유의한 차이의 정도는 student's t-test로 판별하였다.

## 결 과

정액은 12,000rpm으로 원심분리시 10분이상에서 분획되기 시작하였고 spermatocrit는 30분까

지 감소하는 경향을 보였으며 30분, 40분, 50분 및 60분에서는 안정적인 spermatocrit를 나타내었다(Fig. 3). 원심분리 시간 및 안정적인 spermatocrit를 고려시 spermatocrit측정을 위한 조건은 12,000rpm으로 30분간의 원심분리가 적절한 것으로 판별되었다. Fig. 2-b는 정자밀도 계산시 적정 정자밀도의 정자외형으로 정자밀도와 spermatocrit는  $Y=1.14X-10.04$  (Y는 spermatocrit, X는 정자밀도)로 매우 연관된( $r=0.91$ ,  $P<0.0001$ ,  $n=50$ ) 회귀곡선을 나타내었다(Fig. 4). 정자밀도는  $21.5\sim 98.4\times 10^6$ 정자/ $\mu\text{l}$ 정액으로 12~95%의 spermatocrit에 해당하였다.

Table 1에 나타나듯이 HCG처리군의 24시간후 spermatocrit는  $63.0\pm 5.4\%$  ( $P<0.01$ )로 대조군의  $82.3\pm 2.3\%$ 에 비해 유의하게 낮았으나, HCG처리후 48시간의 HCG처리군의 spermatocrit는 대조군과 비교시 유의한 차이를 나타내지 않았다. HCG처리후 48시간까지 대조군의 spermatocrit는 감소하였으나 HCG처리군은 HCG처리후 24시간 이후 감소된 spermatocrit가 회복되는 경향을 보였다. 정자밀도는 HCG처리후 24시간에  $67.4\pm 4.2(\times 10^6$ 정자/ $\mu\text{l}$ 정액)로 대조군의  $84.5\pm 3.8(\times 10^6$ 정자/ $\mu\text{l}$ 정액)에 비해 유의하게 낮았으나( $P<0.05$ ) HCG처리후 48시간의 HCG처리군의 정자밀도는 대조군과 비교시 유의한 차이가 나타나지 않았다. 정자밀도에 있어서도 spermatocrit와 마찬가지로 HCG처리군은 HCG처리후 24시간 이후 감소된 정자밀도가 회복되는 경향을 보였다. HCG처리후 24시간의 spermatocrit와 정자밀도는 대조군에 비해 유의하게 감소되는 반면 정액생산은  $7.5\pm 2.4\text{ml/kg BW}$ 로 대조군의  $1.1\pm 0.2\text{ml/kg BW}$ 와 비교시 유의하게( $P<0.01$ ) 증가된 차이를 나타내었다. HCG주사 후 48시간에서의 대조군과 HCG처리군간에는 유의한 차이를 보이지 않았으며 HCG처리군의



Fig. 1. Indoor tank (5m diameter) provided with flow-through seawater and aeration used in this study.

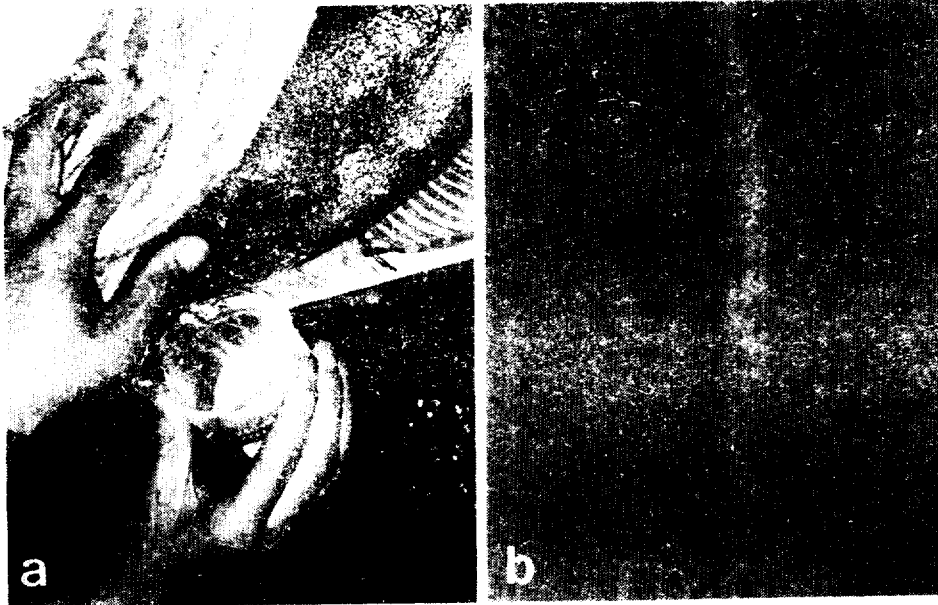


Fig. 2. a, Milt collection by hand-stripping. Fish were anesthetized with 100ppm lidocaine/ $\text{NaHCO}_3$  and then each fish was weighted and laid on its dorsal side. The urogenital area was wiped clean and dried with absorbent paper. Urine and some feces were initially forced out by gentle massage of the abdomen.; b, External morphology of flatfish (*Paralichthys olivaceys*) spermatozoa (400x mag.).

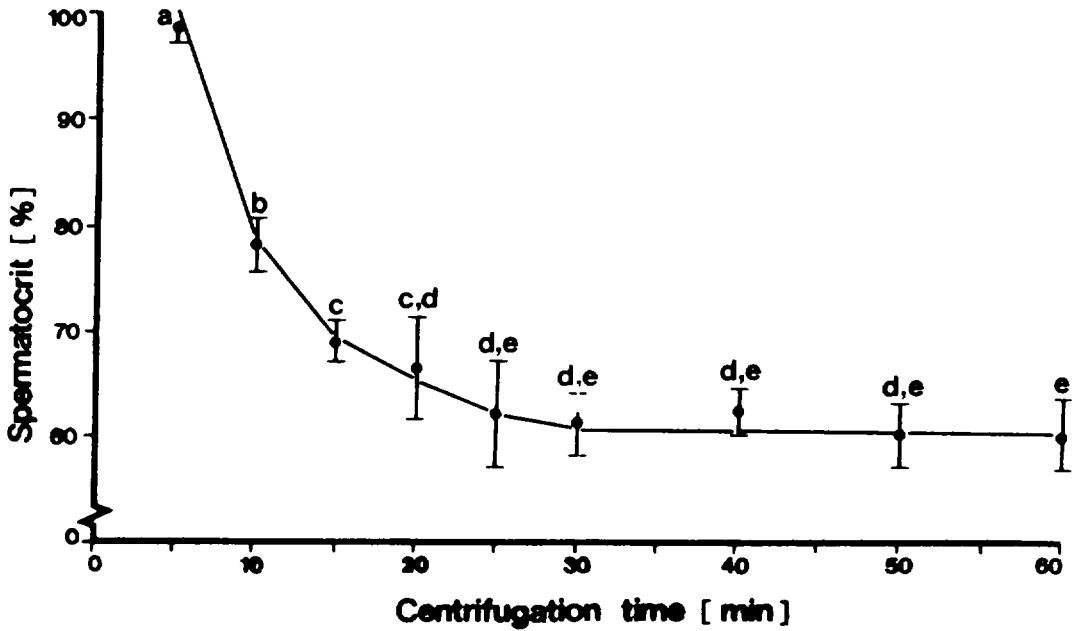


Fig. 3. The effect of centrifugation time on spermatocrit of flatfish (*Paralichthys olivaceus*). Milt in nonheparinized microhematocrit capillary tubes was centrifuged at 12,000 rpm. Points identified by the same letter are not significant different by Duncan's multiple range test ( $P > 0.05$ ). Each point represents the means  $\pm$  s.d of triplicate tubes.

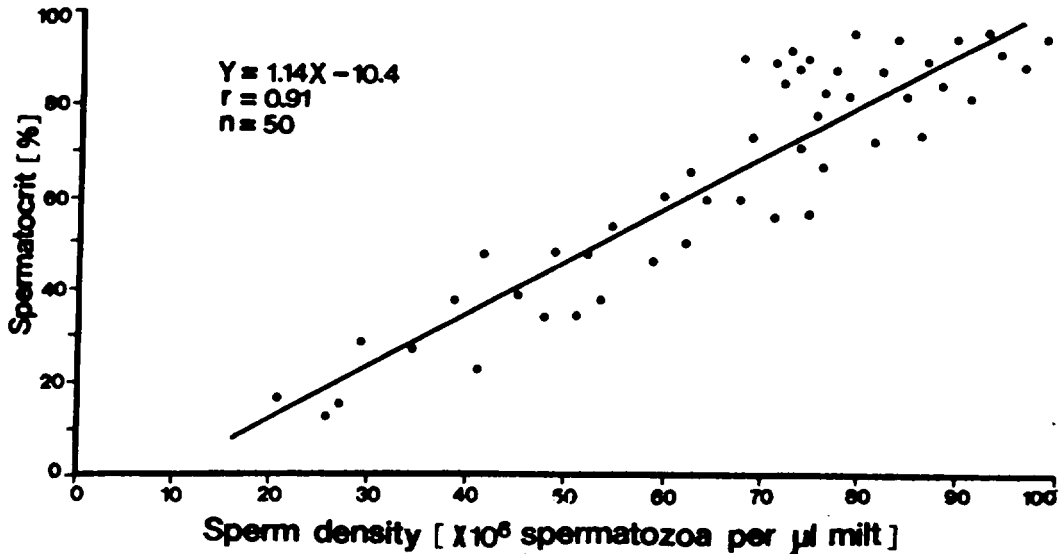


Fig. 4. The relationship between sperm density and spermatocrit of flatfish (*Paralichthys olivaceus*).

Table. 1 Change in spermatocrit (a), sperm density (b) and milt production (c) levels of mature flatfish (*Paralichthys olivaceus*) after an injection of 1,000IU HCG per kg body weight. (N)=number of fish. Means±s.d. are given.

	Hours after HCG injection (10)					
	0		24		48	
	control	HCG	control	HCG	control	HCG
spermatocrit (%)	90.4±2.4	95.5±1.2	82.3±2.3	63.0±5.4	69.7±2.2	78.6±2.4
Sperm density (x 10 <sup>6</sup> spermatozoa per μl milt)	90.2±1.4	94.1±3.4	84.5±3.8	67.4±4.2	70.6±1.2	79.7±2.5
Milt production (ml per kg body weight)	2.0±1.5	1.6±0.6	1.1±0.2	7.5±2.4	1.7±0.2	1.2±0.2

\*P<0.05 ; \*\*P<0.01

정액생산은 HCG주사전의 수준과 유사하였다. 정자농도와 정액생산을 동시에 고려시, 어체중을 기준한 정자생산은 넙치에서 HCG주사후 24시간에 증가하였다.

## 고찰

연어과 어류에서 배정확인을 위해 spermatocrit기법이 사용된바 있으나, 정자밀도와 spermatocrit는 매우 밀접하게 연관되므로 본 연구에서 넙치에 사용된 방법은 배정확인을 위해 더욱 정확한 방법이다(Munkittrick and Moccia, 1987; Garcia, 1991). 본 연구결과 해산어인 넙치에서 spermatocrit측정시 12,000rpm으로 30분간 원심분리시 안정된 spermatocrit를 구할 수 있었으며 이러한 원심분리 조건은 여타 해산어의 spermatocrit측정시 적용 가능하리라 사료된다. 성숙넙치 수컷의 방정기에서의 정자밀도는 연어과 및 rabbitfish의 정자밀도에 비교시 다소 높게 나타났으며 spermatocrit는 rabbitfish와 비교시 유사하였다

(Scott and Bayness, 1980; Garcia, 1991). Goldfish, 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), seabream(*Sparus aurata*), milkfish(*Chanos chanos*), European eel(*Anguilla anguilla*) 및 Japanese eel(*Anguilla japonica*)에서 HCG의 효과와 마찬가지로 HCG는 성숙넙치 수컷에서 정자방출의 상승효과를 나타내었다(Donaldson and Hunter, 1983). 호르몬주사에 의한 정액농도 감소의 결과와 마찬가지로(Clemens and Grant, 1965; Avila, 1984) 넙치에서 HCG주사후 24시간에 HCG처리군은 대조군에 비해 spermatocrit와 정자밀도는 감소되는 반면 정액생산의 증가현상은 lobular형의 정소를 가지는 어류의 성숙호르몬에 의한 정소상의 수화로 기인된 것이다 (Billard et al., 1982; Garcia, 1991). 고농도의 정액은 해수에서 희박하게 되기 어려우므로 HCG등의 방정촉진 호르몬이 사용되는 바, 본 연구결과 HCG에 의한 성숙넙치 수컷에서 정액의 희박 및 정자생산을 촉진시킨 방법은 차후 넙치의 종묘생산시 수정율의 증가라는 차원에서 유용하게 사용되리라 사료된다 (She-

Human Chorionic Gonadotropin (HCG)에 의한 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 배정효과

hadeh et al., 1973; Juario et al., 1980).

HCG주사 및 HCG주사농도에 의한 넙치 정자의 생존성 판별로 넙치에서의 HCG에 의한 효과적인 방정을 위한 최소농도 결정에 관한 연구가 필요시 되며, 아울러 호르몬에 의해 정액수화를 일으켜 98~100%의 높은 수정율을 보이더라도 낮은 부화율이 나타나는 결과를 고려시 차후 HCG에 의해 수화된 정액의 수정율, 부화율, 초기생존율 및 기형율에 관한 조사가 필요하리라 사료된다(Garcia, 1991).

## 요 약

넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 호르몬 처리에 의한 효과적인 인공산란 연구의 일환으로 human chorionic gonadotropin(HCG)에 의한 성숙 넙치에서의 spermatocrit법에 의한 배정(spermiation)효과를 연구하였다.

안정된 spermatocrit치를 위한 정액의 분획조건은 12,000rpm, 30분간의 원심분리가 적절하였으며 spermatocrit(Y)는 정자밀도(X)와는  $Y = 1.14X - 10.04$  ( $r = 0.91$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 50$ )의 관계식을 나타내었다. 정자밀도는  $21.5 \sim 98.4 \times 10^6$  정자/ $\mu l$  정액으로 12~95%의 spermatocrit치에 해당하였다. 성숙넙치의 정액생산은 1,000IU HCG/kgBW의 주사시 24시간후에 가장 높았고 (7.46ml/kgBW), 낮은spermatocrit치(63%)와 낮은 정자밀도( $67.4 \times 10^6$ 정자/ $\mu l$ 정액)수준과 일치하여 정액점도는 매우 낮게 나타났다. 이와같은 낮은 정액점도는 HCG처리에 의한 정소의 수화(hydration)에 기인된 것으로 여타 lobular형 정소에서의 호르몬 처리시 결과와 일치하였다. 48시간후의 HCG처리군과 대조군간의 정액생산, spermatocrit치 및 정자밀도에서는 유의한 차이를

보이지 않았다.

본 연구결과 성숙넙치의 배정은 spermatocrit법에 의해 명확히 판별될 수 있으며 HCG는 본 종에서 배정을 효과적으로 촉진시킬 수 있음이 나타났다.

## 사 사

본 연구 수행시 표본분석에 도움을 주신 제주 도 서귀포의료원 양재식 내과 과장님과 병리실 여러분께 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

- Avila, E. M., 1984. Hormone-induced spawning and embryonic development of the rabbitfish, *Siganus vermiculatus* (Pisces : Siganidae). Philipp. Sci., 21, 75-108.
- Billard, R., A. Fostier, C. Weil, and B. Breton, 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39, 65-79.
- Clemens, H. P. and F. B. Grant, 1965. The seminal thinning response of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) after injections of pituitary extracts. Copeia, 2, 174-177.
- Donaldson, E. M. and G. A. Hunter, 1983. Induced final maturation, ovation, and spermiation in cultured fish. In : W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (Editors), Fish Physiology,



- Volume IXB. Academic Press, New York, PP., 351-403.
- Garcia, L. Ma. B., 1991. Spermiation response of mature rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, to luteinizing hormone-releasing hormone analogue (CHRHa) injection. *Aquaculture*, 97, 291-299.
- Garcia, L. Ma. B. and Gapasin, R. S.J., 1988. An inexpensive tag for short-term studies in milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) and in seabass (*Lateolabrax japonicus* Bloch). *J. Appl. Ichthyol.*, 4, 101-104.
- Juario, J. V., G. F. Qunitio, J. E. Banno, and M. Natividad, 1980. Effects of exogenous hormone injection on milt consistency in newly-caught, wild milkfish. *kalikasan, Philipp. J. Biol.*, 9, 321-326.
- Min, B. S., 1988. Maturation and spawning of flounder (*Paralichthys olivaceus*) under captive conditions. *J. Aquaculture.*, 1, 25-39.
- Munkittrick, K. R. and R. D. Moccia, 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture*, 64, 147-156.
- Park, I. S., J. M. Kim, Y. H. Kim, and D. S. Kim, 1988. Influence of lidocaine as an anaesthetic for marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 1, 123-130.
- Scott, A. P. and S. M. Baynes, 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 17, 707-739.
- Shehadeh, Z. H., W. D. Madden and T. P. Dohl, 1973. The effect of exogenous hormone treatment on spermiation and vitellogenesis in the grey mullet, *Mugil cephalus* L. *J. Fish Biol.*, 5, 479-487.