

**Thiol 화합물과 항산화제 첨가배양이 소 체외수정란의
체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 효과**
**I. β -Mercaptoethanol과 Cysteamine 첨가가 소 체외수정란의
체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향**

양부근 · 박동현 · 정희태 · 박춘근 · 김종복 · 김정익

강원대학교 축산대학

**Effect of Thiol Compounds and Antioxidants on *In Vitro*
Development and Intracellular Glutathione Concentrations of Bovine
Embryos Derived from *In Vitro* Matured and *In Vitro* Fertilized**
**I. Effect of β -Mercaptoethanol and Cysteamine on
Development and Intracellular Glutathione
Concentrations of Bovine IVM/IVF Embryos**

Yang, B. K., D. H. Park, H. T. Choung, C. K. Park, J. B. Kim and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

The effect of thiol compounds on development and intracellular glutathione(GSH) concentrations of bovine embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization(IVM /IVF) was examined in CR_{1aa} medium with or without β -mercaptoethanol(0, 10, 25 and 50 μ M ME) and cysteamine(0, 25, 50 and 75 μ M). Numbers of cells comprising blastocysts were also counted using double fluorescence stain and the total glutathione levels(oxidized and reduced form) of morula and blastocyst embryos were then measured by an enzymatic method. Following routine IVM /IVF procedures oocytes and zygotes were cultured for 40 to 44h in CR_{1aa} medium. Then 2 to 8-cell embryos had cumulus cell removed and were allotted randomly to the experimental medium.

In Experiment 1, the proportion of embryos developing to and beyond morulae stages in 0, 10, 25 and 50 μ M β -ME was 42.9%, 50.0%, 53.7% and 65.6%, respectively. Fifty μ M β -ME group was significantly higher than those of any other groups ($P < 0.05$).

In Experiment 2, the percentages of embryos developed beyond morulae stages in 0, 25, 50 and 75 μ M cysteamine was 42.9%, 40.4%, 60.0% and 59.2%, respectively. Fifty and 75 μ M cysteamine groups were significantly higher than in 0 and 25 μ M cysteamine groups, but all of culture medium containing cysteamine(52.6%) was not significantly difference in control group(42.9%).

In Experiment 3, the intracellular GSH concentrations of morulae and blastocyst embryos in 0 and 50 μM β -ME was 42.4 pM and 44.9 pM, 49.5 pM and 67.8 pM, respectively. Morulae embryos were not difference, but blastocyst embryos were significantly difference between treatments ($P < 0.05$).

In Experiment 4, the intracellular GSH concentrations of morulae in CR_{1aa} with or without cysteamine were 39.8 pM and 45.6 pM, and blastocysts were 59.3 pM and 66.8 pM, respectively.

Cell numbers of blastocysts were similar to in all experimental groups.

These experiments indicate that thiol compounds can increase the proportion of embryos that developing to and beyond morulae stage and the intracellular GSH concentrations.

(Key words : Bovine embryos, IVF, β -mercaptoethanol, Cysteamine, Glutathione(GSH), Thiol compounds, Antioxidants)

I. 서 론

포유동물 수정란의 체외배양시 일어나는 체외발육억제 현상은 초기배 수정란의 genome활성화와 체외배양 동안 산소를 함유한 free radical이 다량 생성되어 oxidative stress에 의해 일어난다고 보고되고 있다(Corsby 등, 1988 ; Joenje, 1989). 이와 같은 발육억제 현상을 극복하기 위한 방법으로서, 최근에는 체외배양액내에 thiol 화합물인 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 첨가하여 체외수정란의 발육억제현상을 극복하고 체외발육율을 향상시키고 있다(Caamano 등, 1996 ; Takahashi 등, 1993).

Thiol 화합물인 β -mercaptoethanol과 cysteamine은 glutathione(GSH)합성의 기질로서 작용하는 cysteine의 이용성을 높임으로서 세포내 GSH 수준을 증가시켜 주며, 세포가 증식되는 동안 GSH 감소를 막아주어 free radical로부터 수정란을 보호하는 항산화제 작용을 한다(Sagara 등, 1993 ; Tetsuro 등, 1981).

포유동물 세포에 존재하는 황화합물인 GSH은 아미노산의 수송, 단백질의 합성과 DNA의 deoxyribonucleotid 전구물질 합성 및 free radical과 reactive oxygen compounds에 대한 세포의 보호 등 많은 생물학적 기작에 있어 중요한 역할을 수행하고 있으며, 체외배양액에 GSH의 첨가는 oxidative stress에 의해 일어나는 발육억제 현상으로부터 수정란을 보호한다(Meister와 Anderson, 1983 ; Lafleur 등, 1994).

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR_{1aa}에 일정량의 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 첨가 배양하여 체외발육에 미치는 영향과 상실배와 배반포기 체외수정란의 세포내 GSH 농도 변화에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙 배양

도살장에서 회수한 소의 난소는 2시간 이내에 멸균 생리식염수(25~28 $^{\circ}\text{C}$)에 침척하여 실험실로 운반한 후, 직경이 2~7mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입채취하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난포란은 실험현미경하에서 난자주위의 난구세포가 균일하게 둘러싸여 있는 것만을 선별하여 난소운반액(PBS-PVA)과 난자 성숙용 배양액(TC-199)으로 각각 2회 세척후 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양을 위하여 TC-199배양액에 10% 자우혈청(fetal bovine serum)과 호르몬(FSH 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LH 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 Estradiol 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유된 성숙배양액을 만든 후, 100 μl 의 소직을 만들어 멸균된 mineral oil로 피복하여 배양 2~3시간 전에 5% CO₂와 고습도의 가스조건 및 39 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도조건에서 평형시키고, 각 소직 배양액에 15개의 난포란을 넣어 20~22시간 배양하여 성숙된 난포란을 선별한 후 각 실험에 공용하였다.

2. 난포란의 체외수정

동결정액(0.5ml)을 37℃의 항온수조에서 30초~1분간 용해한 후 Brackett와 Oliphant배양액(BO 배양액, 1975)에 10mM caffeine이 함유된 배양액과 혼합, 원심분리(1,500 rpm, 10분)로 2회 세척후 정자의 농도가 2.5×10^6 정자/ml가 되도록 정자 부유액을 준비하였다.

체외수정액은 BO배양액에 20 μ g/ml heparin과 20mg/ml bovine serum albumin(BSA)을 첨가해 배양접시내에 50 μ l의 소적을 만든 후 mineral oil로 피복하여 난포란의 성숙배양과 동일한 방법으로 2~3시간 평형시켰다. 체외에서 성숙배양한 난포란을 선별하여 난포란의 성숙배양액과 체외수정 배양액으로 각각 1회 세척후 10개씩을 소적의 체외배양액에 옮긴 후 상기 방법으로 준비한 정액 50 μ l를 수정배양액내에 첨가해 체외수정을 실시하였다. 체외 수정 배양액내의 caffeine, heparin, BSA 및 정자의 최종농도는 5mM caffeine, 10 μ g/ml heparin, 10mg/ml BSA와 1.25×10^6 정자/ml였으며, 수정 후 6~8시간에 CR_{1aa}(Rosenkrans와 First, 1991) 배양액으로 2~3회 세척한 후 40~44시간동안 체외배양을 실시하여 생산된 2~8세포기 체외수정란을 난구세포를 제거한 후 체외 발육 실험에 공용하였다.

3. 체외수정란에 Thiol 화합물의 첨가 배양

체외배양액인 CR_{1aa} 배양액에 β -mercaptoethanol(β -ME, Sigma) 0 μ M, 10 μ M, 25 μ M 및 50 μ M과 cysteamine(Sigma) 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M 및 75 μ M을 첨가하여 39℃, 5% CO₂ 및 고습도의 조건에서 체외 수정란을 5~6일간 배양하여 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외발육 성적을 조사하였고, 일부의 배반포기 수정란은 이중형광염색법에 의하여 세포수를 조사하고 나머지 수정란은 세포내 glutathione 농도 검사에 이용하였다.

4. 체외수정란의 세포내 glutathione 농도의 조사

체외수정후 40~44시간에 얻은 2~8세포기 수정란을 각각 96시간과 120시간 배양하여 얻은 상실배기와 배반포기 수정란내의 총 glutathione(oxidized와 reduced form)의 농도를 효소 측정 방법으로 측정하였다(Tietze, 1969).

96시간과 120시간 배양후 얻은 수정란을 1mg/ml

polyvinylpyrrolidone(PVP)가 첨가된 PBS(Ca과 Mg free)에서 각각 3번 씻어낸 후 microtube에 수정란을 보관하여 -20℃의 냉동고에서 동결, 용해 과정을 2~3회 반복한 후 미세 유리 pipet을 이용하여 완전히 깨뜨렸다. 그 다음 수정란이 들어 있는 microtube에 10mM EDTA가 포함된 0.2M phosphate buffer 1.2ml와 증류수 1.2ml 혼합한 후 10mM DTNB(5,5'-dithiobis 2-mitrobenzonic acid) 100 μ l, glutathione reductase 50 μ l 및 4.3mM NADPH 50 μ l를 빠르게 혼합한 후, U.V. Spectrophotometer(Hitachi, Japan)를 이용하여 412nm에서 반응 30초부터 5분간 측정하여 세포내 glutathione농도를 조사하였다.

5. 체외수정란의 세포수 조사

체외수정란의 세포수 검사는 Papaioannou와 Ebert(1988)의 이중형광염색방법을 수정 보완하여 조사하였다. 간단하게 요약하면, 체외수정란의 투명대를 0.5% pronase에 처리하여 용해시킨 후, TNBS acid-PBS(1:9)와 3mg/ml PVP액에 넣어 4℃에서 10분간 처리하며, Anti-DNP-BSA(1:10)액내에서 20분간 배양한 후, Guinea pig complement-PBS(1:3)에서 30분간 처리한다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란을 2.3% citrate용액과 ethanol을 3:1의 비율로 만든 용액으로 세척한 다음, 10 μ g/ml Hoechst 33342와 10 μ g/ml propidium iodide(1:1)에서 4~5분간 염색을 실시하였다. mounting용액은 PBS와 glycerol을 1:1로 혼합하여 사용하였으며, slide glass위에 3 μ l mounting용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 염색된 수정란을 혼합한 후 cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경하($\times 200$)에서 세포수를 조사하였다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 최소 유의차 검정(Least Significant Difference test; LSD test)을 실시하여 통계처리를 하였다.

III. 결 과

소 난포란을 회수하여 체외수정시킨 후 40~44시간

에 생산된 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR_{1aa}에 각각 다른 농도의 β -mercaptoethanol(β -ME)을 첨가하여 5~6일간 체외배양한 후 얻은 체외발육성과 배반포 수정란의 세포수를 Table 1과 Table 2에 요약하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이 CR_{1aa}배양액에 β -ME을 0, 10 μ M, 25 μ M 및 50 μ M을 첨가한 구에서 상실배 이상 발육된 체외발육성적은 각각 42.9%, 50.0%, 7% 및 65.6%로써 50 μ M 첨가구가 여타구보다 통계적 유의차는 인정되지 않았다($P > 0.05$). 한편 2~8세포기 체외수정란을 6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수는 각각 64 \pm 3.5, 67 \pm 4.4, 70 \pm 2.7 및 66 \pm 2.7로서 25 μ M β -ME 첨가구가 다소 많은 세포수를 나타냈지만 처리구간에 통계적 유의차는 인정되지 않았다(Table 2).

체외배양액인 CR_{1aa}에 각각 다른 농도의 cysteamine을 첨가하여 체외수정란을 5~6일간 체외배양한 후 얻은 체외발육성과 배반포 수정란의 세포수를

Table 3과 4에 요약하였다.

CR_{1aa} 배양액에 cysteamine을 0, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M을 첨가한 구에서 상실배이상 발육율은 각각 42.9%, 40.4%, 60.0%, 59.2%로써 50 μ M과 75 μ M cysteamine 첨가구가 여타구보다 높은 성적을 얻었으며($P < 0.05$), cysteamine 첨가구(25 μ M, 50 μ M, 75 μ M)의 효과는 52.6%로써 무 첨가구(42.9%)보다 높게 나타났으나 통계적 유의차는 없었다($P > 0.05$). 배반포기 수정란의 세포수는 각각 78 \pm 3.0, 69 \pm 0.9, 75 \pm 2.0 및 69 \pm 0.7로서 처리간에 커다란 차이는 인정되지 않았으며, β -ME 첨가구와도 비슷한 경향을 나타냈다.

2~8세포기 체외수정란을 CR_{1aa} 배양액에 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 첨가한 후 각각 4일과 5일 동안 체외배양하여 생산된 상실배와 배반포 수정란의 세포내 glutathione농도의 측정 결과를 Table 5와 6에 요약하였다.

CR_{1aa} 배양액에 β -ME을 0, 50 μ M을 첨가한 구에

Table 1. Effect of β -mercaptoethanol(β -ME) on development of bovine IVM/IVF embryos in CR_{1aa}

β -ME (μ M)	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to;			Morulae plus blastocysts (%, M \pm S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	56	32	8	16	42.9 ^a \pm 4.2
10	54	27	15	12	50.0 ^a \pm 4.3
25	54	25	15	14	53.7 ^a \pm 3.8
50	61	21	18	22	65.6 ^b \pm 1.4
Overall means					
CR _{1aa}	56	32	8	16	42.9 \pm 4.2
β -ME	169	73	48	48	56.8 \pm 4.7

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2. Number of inner cell mass and trophoblast cell of bovine embryos obtained from IVM/IVF in CR_{1aa} with or without β -mercaptoethanol

β -ME (μ M)	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M \pm S.E)	No. of TE cell (M \pm S.E)	Total cell no. of blastocysts (M \pm S.E)
0	5	21 \pm 2.1	43 \pm 4.8	64 \pm 3.5
10	5	22 \pm 2.1	45 \pm 4.8	67 \pm 4.4
25	5	25 \pm 1.8	45 \pm 2.3	70 \pm 2.7
50	5	25 \pm 5.5	41 \pm 2.1	66 \pm 2.7

Table 3. Effect of cysteamine on development of bovine IVM/IVF embryos in CR_{1aa}

Cysteamine (μ M)	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to;			Morulae plus blastocysts (%, M \pm S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	56	32	10	14	42.9 ^a \pm 1.8
25	57	34	14	9	40.4 ^a \pm 0.8
50	50	20	17	13	60.0 ^b \pm 2.3
75	49	20	16	13	59.2 ^b \pm 2.2
Overall means					
CR _{1aa}	56	32	10	14	42.9 \pm 1.8
Cysteamine	156	74	47	35	52.6 \pm 6.4

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 4. Number of inner cell mass and trophoblast cell of bovine embryos obtained from IVM/IVF in CR_{1aa} with or without cysteamine

Cysteamine (μ M)	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M \pm S.E)	No. of TE cell (M \pm S.E)	Total cell no. of blastocysts (M \pm S.E)
0	5	26 \pm 1.8	52 \pm 1.7	78 \pm 3.0
25	6	22 \pm 1.1	47 \pm 1.4	69 \pm 0.9
50	5	29 \pm 2.8	46 \pm 2.0	75 \pm 2.0
75	5	25 \pm 1.5	45 \pm 1.2	69 \pm 0.7

Table 5. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/IVF embryos in CR_{1aa} with or without β -mercaptoethanol

β -ME (μ M)	No. of replicates	Developmental stage		Intracellular glutathione con., pM (Mean \pm S.E)
		Morulae	Blastocysts	
0	3	24		42.4 \pm 4.9
50	3	29		44.9 \pm 3.1
<hr/>				
0	3		22	49.5 ^a \pm 6.4
50	3		23	67.8 ^b \pm 0.6
<hr/>				
Overall means				
0	6	24	22	46.0 \pm 3.9
50	6	29	23	56.4 \pm 5.3
<hr/>				
	6	53		43.7 ^A \pm 2.6
	6		45	58.7 ^B \pm 5.0

^{a,b}: A,B Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 6. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/IVF embryos in CR_{1aa} with or without cysteamine

Cysteamine (μ M)	No. of replicates	Developmental stage		Intracellular glutathione con., pM (Mean \pm S.E)
		% Morulae	Blastocysts	
0	3	33		39.8 \pm 2.0
50	3	29		45.6 \pm 0.7
0	3		23	59.3 \pm 7.5
50	3		26	66.8 \pm 6.8
Overall means				
0	6	33	23	49.5 \pm 5.5
50	6	29	26	56.2 \pm 5.6
	6	62		42.7 ^a \pm 1.5
	6		49	63.1 ^b \pm 4.8

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

서 4일 동안 배양한 후 얻은 상실배의 세포내 glutathione의 농도는 50 μ M β -ME첨가구가 44.9pM로서 무첨가구(42.4pM)보다 다소 높은 농도로 나타났으며, 5일 동안 배양한 후 얻은 배반포 수정란의 glutathione농도는 50 μ M β -ME 첨가구가 67.8pM로서 무첨가구(49.5pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$). 상실배와 배반포기내의 glutathione 농도에 있어 50 μ M β -ME의 효과는 평균 56.4pM으로써 무첨가구(46.0pM)보다 높게 나타났으나 통계적 유의차는 없었으며($P > 0.05$), 배반포기 수정란의 glutathione농도는 58.7pM으로써 상실배기(43.7pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$).

한편, CR_{1aa} 배양액에 cysteamine을 0, 50 μ M을 첨가한 구에서 4일 동안 배양한 후 얻은 상실배에서의 glutathione의 농도는 50 μ M cysteamine첨가구가 45.6pM으로써 무첨가구(39.8pM)보다 다소 높은 농도로 나타났으나 통계적 유의차는 없었으며($P > 0.05$), 배반포 수정란의 glutathione농도는 50 μ M cysteamine 첨가구가 66.8pM으로써 무첨가구(53.0pM)보다 다소 높게 나타났지만 통계적 유의차는 없었다($P > 0.05$). 상실배와 배반포기내의 glutathione 농도에 있어 50 μ M cysteamine의 효과는 평균 56.2pM으로써 무첨가구(49.5pM)보다 높게 나타났으나 통계적 유의차는 없었으며($P > 0.05$), 배반포 수정란

의 glutathione농도는 63.1pM으로써 상실배기(42.7pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$).

IV. 고찰

본 연구는 소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 체외배양액에 thiol 화합물인 β -mercaptoethanol(β -ME)와 cysteamine을 첨가하여 체외 수정란의 체외발육성적과 세포내 glutathione(GSH)의 농도 변화에 미치는 영향을 검토하였다.

체외에서 성숙, 수정시킨 포유동물 체외수정란의 체외배양에 있어 β -ME의 첨가 효과는 세포의 성장을 자극하며, 배양액내에 존재하는 cystine의 GSH 합성의 기질로서 작용하는 cysteine으로 환원시켜 세포내 GSH농도를 증가시키므로써 free radical로부터 수정란을 보호하는 항산화적 작용을 한다(Tetsuro 등, 1981). 또한 혈청이 첨가되지 않은 배양액에서 성숙시킨 포유동물의 난포란에 있어 β -ME의 첨가는 zona hardening을 막아주며, 체외수정율을 향상시킨다(Zhang 등, 1991).

Caamano 등(1996)은 소 체외수정란의 체외배양에 있어 β -ME의 첨가효과는 체세포와의 공동배양이 없어도 배반포까지 체외발육율을 향상시킨다고 보고하

였는데, 본 실험의 결과도 소 체외수정란을 β -ME가 첨가된 체외배양액에서 배양했을 때 상실배이상 발육된 체외발육율이 56.8%로서 무첨가구(42.9%)보다 높게 나타나 일치하는 경향을 보였다. β -ME 첨가구 간에는 50 μ M β -ME를 첨가했을 때 가장 좋은 체외발육율을 나타내어, 소 체외수정란을 체외배양시 10 μ M β -ME보다는 50 μ M β -ME일때 높은 체외발육율을 얻었다고 보고한 Takahashi 등(1993)과 같은 결과를 얻었다.

한편, Lim 등(1996)은 소 체외수정란은 16-세포기부터 수정란의 유전자 활성을 시작하여 적당한 GSH의 양을 합성하기 때문에, 체외배양시 16-세포기 이전까지는 β -ME의 첨가가 수정란을 발육시키지만 16-세포기 이후에는 발육에 영향을 미치지 못한다고 보고하였는데, 본 실험의 결과도 16-세포기 이후의 수정란에서의 발육율에는 첨가구간 차이가 없어 일치하는 결과를 보였으나, 높은 농도의 20~100 μ M β -ME는 2~8 세포기의 발육율에는 효과가 없었으며 16-세포기에서만 효과가 있었다고 보고한 Seizo 등(1994)과는 상반된 결과를 보였다.

저분자 thiol 화합물인 cysteamine의 첨가는 난포질이 체외에서 성숙되는 동안 세포질내의 thiol 화합물을 높은 농도로 축적시키며, 증가된 세포질내 thiol 화합물은 산화에 의한 손상을 환원된 상태로 변환시켜 체외수정란을 보호하며(Crupen 등, 1995), 체외에서 생산된 2~8세포기 소 체외수정란에 있어서는 cysteine에 의한 GSH 합성을 증가시켜 체외수정란의 발육율을 향상시킨다고 보고하고 있다(Matoss 등, 1996). 본 실험의 결과도, 25 μ M cysteamine 첨가구에서 수정란을 배양시 상실배이상 발육된 체외발육율은 40.4%로서 무첨가구의 42.9%에 비해 다소 낮은 체외발육율을 나타냈지만 50 μ M과 75 μ M cysteamine 첨가구에서는 각각 60.0%, 59.2%로서 무첨가구보다 높은 체외발육성적을 얻어 일치하는 경향을 보였으며, β -ME 첨가구와도 비슷하게 체외발육율이 향상되는 결과를 얻었다.

체외수정란의 GSH 수준은 체내에서 보다 낮은 농도로 존재하기 때문에 hydrogen peroxide와 같은 reactive oxygen species에 의해 체외수정란에 유해한 영향을 받게 되는데(Catherine 등, 1994), thiol 화합물인 β -ME와 cysteamine의 체외배양액내 첨가는

배양액에 존재하는 cystine의 이용성을 향상시켜 GSH의 농도를 증가시키므로서, 수정란의 생존율과 발육율을 감소시키는 heat shock로부터 체외수정란을 보호하며 oxidative stress에 의해 일어나는 발육억제현상을 극복하고 체외발육율을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Arechiga 등, 1995 ; Ealy 등, 1992).

본 실험의 경우, 체외수정란내의 GSH 농도는 상실배와 배반포 수정란 모두에서 thiol 화합물 첨가구가 무첨가구보다 높은 농도를 나타냈으며, 상실배보다는 배반포 수정란에서 thiol 화합물 첨가구(67.3pM)와 무첨가구(54.4pM) 간에 큰 농도 차이를 나타냈다. 한편 수정란의 발달단계에 있어서는 상실배(43.2pM)보다 배반포 수정란이(60.9pM) 높은 GSH 농도를 나타내어, 소 체외수정란의 체외배양에 있어 thiol 화합물의 첨가는 체외수정란의 세포내 GSH 농도를 증가시키며 체외발육율을 향상시킨다고 보고한 Takahashi 등(1993)과 일치하는 결과를 얻었다.

체외에서 생산된 배반포의 세포수는 체내에서 회수한 배반포의 세포수보다 적어 이식후 착상에 유해한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 실험의 결과, 무첨가구, β -ME 첨가구, cysteamine 첨가구에서 생산된 배반포의 세포수는 평균 71.0, 67.6 및 71.0으로 처리간에 차이는 인정되지 않아 thiol 화합물의 첨가배양이 배반포의 세포수에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면, 소 체외수정란의 체외배양에 있어 thiol 화합물을 첨가는 세포내의 GSH 합성을 증가시키므로서 8~16세포기 발육억제현상을 극복하고 체외발육율을 향상시키는 효과적인 첨가제로서 이용될 수 있다고 생각된다.

V. 적 요

본 연구는 도축장에서 구입한 난소로부터 회수한 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 2~8세포기 수정란을 CR_{1aa} 체외배양액에 일정량의 thiol 화합물인 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 첨가하여 체외수정란의 체외발육율에 미치는 영향과 상실배기와 배반포기 체외수정란의 세포내 glutathione농도 변화에 미치는 영향을 검토하였다.

1. CR_{1aa} 체외배양액에 β -mercaptoethanol(β -ME)을 0, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M을 첨가한 구에서 상실배이상 발육된 체외배양 성적은 50 μ M을 β -ME(65.6%) 첨가구가 여타구(0, 42.9%; 10 μ M, 50.0%; 25 μ M, 53.7%)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났으며($P < 0.05$), β -ME 첨가구(10 μ M, 25 μ M, 50 μ M)의 효과는 56.8%로써 무첨가구(42.9%)보다 다소 높았으나 통계적으로 유의차는 인정되지 않았다($P > 0.05$).
2. CR_{1aa} 배양액에 cysteamine을 0, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M을 첨가한 구에서 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 42.9%, 40.4%, 60.0%, 59.2%로써 50 μ M과 75 μ M cysteamine 첨가구가 여타구보다 높은 성적을 얻었으며($P < 0.05$), cysteamine 첨가구(25 μ M, 50 μ M, 75 μ M)의 효과는 52.6%로써 무첨가구(42.9%)보다 높게 나타났으나 통계적 유의차는 없었다($P > 0.05$).
3. CR_{1aa} 배양액에 β -ME을 0, 50 μ M을 첨가한 구에서 4일 동안 배양한 후 얻은 상실배의 세포내 glutathione의 농도는 각각 42.4pM과 44.9pM으로써 커다란 차이는 없었으나($P > 0.05$), 5일 동안 배양한 후 얻은 배반포 수정란의 glutathione농도는 50 μ M β -ME 첨가구가 67.8pM으로써 무첨가구(49.5pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$).
4. CR_{1aa} 배양액에 cysteamine을 0, 50 μ M을 첨가한 구에서 4일 동안 배양한 후 얻은 상실배의 glutathione농도는 50 μ M cysteamine 첨가구가 45.6pM으로써 무첨가구(39.8pM)보다 다소 높은 농도로 나타났으나 통계적 유의차는 없었으며($P > 0.05$), 5일 동안 배양한 후 얻은 배반포 수정란의 세포내 glutathione농도는 50 μ M cysteamine 첨가구가 66.8pM으로써 무첨가구(53.0pM)보다 높게 나타났지만 통계적 유의차는 없었다($P > 0.05$).
5. 모든 처리구에서 배반포까지 발육된 체외수정란의 세포수에는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

VI. 인용문헌

1. Arechiga, C. F., A. D. Ealy and P. J. Hansen, 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. Reprod.* 52:1296-1301.
2. Bracket, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
3. Caamano, J. N., Z. Y. Ryoo and C. R. Youngs. 1996. Beneficial effects of cysteine and β -mercaptoethanol on development of bovine IVM/IVF embryos in a cell-free, serum-free culture system. *Theriogenology*, 45 (abstr.):1.
4. Catherine, S. G. and D. J. Reed. 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 51:1307-1314.
5. Corsby, I. M. and F. Gandolfi. 1988. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 82:769-775.
6. Crupen, C. G., H. Nagashima and M. B. Nottle. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 52:1296-1301.
7. Ealy, A. D., M. Drost, C. M. Barros and P. J. Hansen. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell. Biol. Inter. Reports*, 16(2):125-131.
8. Joenje, H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. *Mut. Res.* 1219:193-208.
9. Lafleur, M. V. M., J. J. Hoorweg, H. Joenje, E. J. Westmijze and J. Retel. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad. Res.* 21:9-17.
10. Lim, J. M., S. S. Liou and W. Hansel. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, 46:429-439.

1. Arechiga, C. F., A. D. Ealy and P. J. Han-

11. Matos, D., C. C. Furnus, D. F. Moses, A. G. Martinez and M. Matkovic. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Develop.* 45:451-457.
 12. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760.
 13. Papaioannou, D. E. and K. M. Ebert. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development*, 102:793-803.
 14. Sagara, J., K. Miura and S. Bannai. 1993. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J. Neurochem.* 61:1667-1671.
 15. Seizo, H., M. Kuwayama, M. Takahashi, N. Okamira, A. Okano and T. Nagai. 1994. Effect of β -mercaptoethanol on the preimplantation development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Develop.* 40(4): 355-359.
 16. Takahashi, M., T. Nagai, M. Kuwayama, N. Okamura and A. Okano. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49:228-232.
 17. Tetsuro, I., S. Bannai and Y. Sugita. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by β -mercaptoethanol *in vitro*. *J. Biol. Chemistry*, 256(23):12387-12392.
 18. Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione; applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27:502-522.
 19. Zhang, X., J. Rutledge and D. T. Armstrong. 1991. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. *Mol. Reprod. Develop.* 28: 292-296.
- (접수일자 : 1997. 10. 29. / 채택일자 : 1997. 11. 26.)