

**Thiol 화합물과 항산화제 첨가배양이 소 체외수정란의  
체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 효과**  
**II. 항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의  
체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향**

양부근 · 박동현 · 우문수 · 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  
II. Effect of Antioxidants with Somatic Cells on Development  
and Intracellular Glutathione Concentrations of Bovine  
IVM/IVF Embryos**

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

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

**SUMMARY**

Antioxidants and antioxidants with somatic cell co-culture, bovine oviduct epithelial cells (BOEC) and buffalo rat liver cells(BRLC), were studied as a mean of increasing the development and intracellular glutathione(GSH) concentrations of bovine embryos derived from *in vitro* matured(IVM) and *in vitro* fertilized(IVF) oocytes. Cell numbers and intracellular GSH concentrations of blastocysts were also counted. The developmental rate beyond morula stages in CR<sub>1aa</sub> containing taurine(2.5mM), superoxide dismutase(SOD, 600U) and catalase(250U) were 1%, 75.0%, 64.8% and 62.3%, respectively. The developmental rate in antioxidant groups was significantly higher than in control( $P<0.05$ ). The intracellular GSH concentrations of blastocysts cultured in 0, 2.5mM taurine, 600U SOD and 250U catalase were 33.8pM, 39.3pM, 42.3pM and 54.8pM, respectively. This result indicated that the developmental rates and intracellular GSH concentrations of catalase group was significantly higher than any other groups( $P<0.05$ ). The developmental capacity in CR<sub>1aa</sub> plus various antioxidants co-cultured with BOEC were 55.3%(control), 74.1%(2.5mM taurine), 66.7%(600U SOD) and 70.7%(250U catalase) and in CR<sub>1aa</sub> plus various antioxidants co-cultured with BRLC in control, 2.5mM taurine, 600U SOD and 250U catalase were 63.8%, 75.5%, 71.0% and 73.5%, respectively, the intracellular GSH concentrations of blastocyst embryos co-cultured with BOEC and BRLC in CR<sub>1aa</sub> with 0, 2.5mM

taurine, 600U SOD and 250U catalase were 73.4pM and 64.4pM, 79.9pM and 67.5pM, 82.3pM and 71.7pM, and 83.0pM and 80.0pM, respectively. Cell numbers of blastocysts were not difference in all experimental groups. These studies indicate that antioxidants and antioxidant with somatic cell co-culture can increase the proportion of embryo that developed into morula and blastocysts, and the intracellular GSH concentrations of blastocyst embryos.

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

## I. 서론

수정란의 체외배양시 발생하는 체외발육억제현상의 한 원인으로 제시되고 있는 free radical은 배란과 정자의 수정능획득 등 정상적인 생리적 작용에도 관여하지만, 포유동물의 모든 세포에서 효소의 불활성화, 세포막 지질의 과산화 등으로 세포기능을 손상시키는 것으로 보고되고 있다(Bize 등, 1991 ; Miyazaki 등, 1991).

이러한 free radical의 형성원인은 체외배양액내의 높은 산소농도로써 대기의 산소와 평형된 배양액내의 산소압은 37℃에서 224 $\mu$ M로 알려져 있으며, 이것은 세포내에서 생리적인 산소압인 28~42 $\mu$ M보다 매우 높은 것이다(Jones, 1985).

체외배양액내에서 형성되는 free radical의 제거하기 위한 방법으로서 난구세포(Berg와 Brem, 1990), 소 난관상피세포(Eyestone과 First, 1989 ; 양 등, 1990), buffalo 간세포(Yang 등, 1993) 및 STO(양 등, 1996)와 같은 체세포와의 공동배양체계를 이용하여 높은 체외발육율을 얻고 있으며, Thompson 등(1990)은 체세포와의 공동배양이 배양액내의 산소농도를 줄여주며 항산화물질을 생산한다고 보고했으며, 최근에는 산화 환원 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 taurine 등과 같은 항산화물질을 체외배양액내에 첨가하여 수정란의 발육억제현상의 극복하고 체외수정란의 체외발육율을 증진시킨다고 보고하고 있다(Li 등, 1993 ; Umoako 등, 1992).

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR<sub>1aa</sub>에 적정량의 taurine, superoxide dismutase(SOD) 및 catalase 등의 항산화제 첨가 및 BOEC와 BRL 세포 공동배양액에 이들 황산화제 첨가 배양이 체외수정란의 체

외발육율과 세포내 glutathione농도변화에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 체외성숙배양, 체외수정, 체외수정란의 세포내 glutathione농도의 조사 및 배반포 수정란의 세포수 조사

난포란의 체외성숙배양, 체외수정, 체외수정란의 세포내 glutathione농도의 조사 및 배반포 수정란의 세포수 조사는 " $\beta$ -mercaptoethanol과 cysteamine 첨가 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 glutathione 농도 변화에 미치는 영향"의 방법에 준하여 실시하였다.

### 2. 난관 상피세포의 준비

난관 상피세포의 monolayer준비는 Yang 등(1993)의 방법을 수정 보완하여 실시하였다. 도살 직후 적출된 소의 난관은 4℃의 보온병에 넣어 실험실로 운반하여 난관 표면의 혈액과 결체조직을 제거한 후, PBS 용액으로 2~3회 세척후 난관을 Ham's F-10 배양액으로 관류하여 난관 상피세포를 15ml 원심분리관에 회수하였다. PBS용액과 Ham's F-10용액으로 각각 1회씩 원심분리(1,000 rpm, 5분)하여 세척한 후, 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하고 4~5일 동안 배양(37℃, 5% CO<sub>2</sub> in air)하여 난관상피세포 monolayer를 준비하여 체외배양 실험에 사용하였다.

### 3. Buffalo rat 간세포의 준비

냉동보존한 BRLC(America Type Culture Collection, CRL 1442)를 37℃의 항온수조에서 1~2분간 용해하여 15ml의 원심분리관으로 옮긴 후, 5ml의

Defined Modified Eagles Media(DMEM-low glucose, Gibco)에 10% 자우혈청(Fetal bovine serum, Gibco)이 함유된 배양액과 혼합시킨 후 원심분리(1,000rpm, 5분)를 2회 실시하여 세포부유액을 준비하였고, 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하여 4~5일 동안 배양(37℃, 5% CO<sub>2</sub> in air)하여 BRL세포 monolayer를 준비하여 체외배양 실험에 사용하였다.

#### 4. 체외수정란의 체외배양

##### 1) 체외배양액에 항산화제 첨가배양과 BOEC와 BRL 세포의 monolayer에 항산화제 첨가배양

체외배양액인 CR<sub>1aa</sub> 배양액 2.5mM taurine, 600 U SOD 및 250U catalase를 첨가한 후 체외수정란의 체외배양 또는 BOEC와 BRL세포의 공동배양액에 2.5mM taurine, 600U SOD 및 250U catalase를 첨가한 후 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 및 고습도의 조건에서 체외 수정란을 5~6일간 배양하여 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육 성적을 조사하였고, 일부의 배반포기 수정란은 이중형광염색법에 의하여 세포수를 조사하였

고, 나머지 수정란은 세포내 glutathione 농도를 조사하였다.

#### 5. 통계처리

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

### III. 결 과

소 난포란을 회수하여 체외에서 성숙, 수정시킨 후 40~44시간에 회수한 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR<sub>1aa</sub>에 taurine, SOD 및 catalase를 첨가하여 5~6일간 체외배양한 후 얻은 체외발육성적과 배반포기 세포수를 Table 1과 Table 2에 요약하였다.

CR<sub>1aa</sub> 배양액에 taurine(2.5mM), SOD(600U), 및 catalase(250U)을 첨가한 구에서 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 45.1%, 75.0%, 64.8% 및 62.3%로서 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며(P<0.05), 2~8세포기 수정란의 배반포이상까지 발육된 체외발

**Table 1. Effect of antioxidants on development of bovine IVM/IVF embryos in CR<sub>1aa</sub> with BSA**

Antioxidants	Dosage	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to:			Morulae plus blastocysts (% , M±S.E)
			Premorulae	Morulae	Blastocysts	
-	-	71	39	16	16	45.1 <sup>a</sup> ±5.8
Taurine	2.5mM	68	17	25	26	75.0 <sup>b</sup> ±4.5
SOD	600U	71	25	28	18	64.8 <sup>b</sup> ±5.5
Catalase	250U	69	26	25	18	62.3 <sup>b</sup> ±2.7

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are significantly differ (P<0.05).

**Table 2. Number of inner cell mass and trophoblast cell of bovine embryos obtained from IVM/IVF in CR<sub>1aa</sub> with or without antioxidants**

Antioxidants	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M±S.E)	No. of TE cell (M±S.E)	Total cell no. of blastocysts (M±S.E)
-	5	23±0.9	63±4.4	86±5.2
Taurine	5	20±0.9	64±5.1	84±4.9
SOD	5	19±1.2	68±3.3	87±2.9
Catalase	5	20±0.8	65±2.3	85±2.2

육 성적은 각각 22.5%, 38.2%, 25.3% 및 26.1%로서 2.5mM taurine 첨가구가 여타구에 비해 높은 성적을 나타냈다.

한편, 2~8세포기 체외수정란을 6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수는 대조구,  $86 \pm 5.2$  ; taurine 첨가구,  $84 \pm 4.9$  ; SOD,  $87 \pm 2.9$  및 catalase,  $85 \pm 2.2$ 로서 커다란 차이는 인정되지 않았다 (Table 2).

CR<sub>1aa</sub>배양액에 적정량의 항산화제를 첨가한 후, 5~6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 glut-

athione농도를 Table 3에 요약하였다.

CR<sub>1aa</sub>배양액에 taurine(2.5mM), SOD(600U) 및 catalase(250U)을 첨가하여 5일동안 배양한 후 얻은 배반포기 수정란의 glutathione농도는 catalase첨가구가 54.8pM로서 여타구(O ; 33.8pM, taurine ; 39.3pM, SOD ; 42.3pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

CR<sub>1aa</sub> 배양액과 BOEC 공동배양에 일정량의 황산화제를 첨가한 후, 체외수정란을 체외배양하여 얻은 체외발육성적과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 4

**Table 3. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/IVF embryos in CR<sub>1aa</sub> with or without antioxidants**

Antioxidants	Dosage	No. of replicates	No. of blastocysts	Intracellular glutathione con., pM (Mean $\pm$ S.E)
—	—	3	29	33.8 <sup>a</sup> $\pm$ 10.9
Taurine	2.5mM	3	28	39.3 <sup>a</sup> $\pm$ 8.7
SOD	600U	3	28	42.3 <sup>a</sup> $\pm$ 7.0
Catalase	250U	3	27	54.8 <sup>b</sup> $\pm$ 8.4

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 4. Effect of antioxidants on development of bovine IVM/IVF embryos in CR<sub>1aa</sub> with BOEC**

Antioxidants	Dosage	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to;			Morulae plus blastocysts (% , M $\pm$ S.E)
			Premorulae	Morulae	Blastocysts	
—	—	94	42	20	32	55.3 <sup>a</sup> $\pm$ 4.0
Taurine	2.5mM	81	21	24	36	74.1 <sup>b</sup> $\pm$ 5.0
SOD	600U	93	31	35	27	66.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8
Catalase	250U	82	24	26	32	70.7 <sup>b</sup> $\pm$ 2.8

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 5. Number of inner cell mass and trophoblast cell of bovine embryos obtained from IVM/IVF in CR<sub>1aa</sub> with or without antioxidants co-culture with BOEC**

Antioxidants	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)
—	5	19 $\pm$ 1.0	60 $\pm$ 3.1	79 $\pm$ 3.4
Taurine	5	20 $\pm$ 1.2	61 $\pm$ 2.4	81 $\pm$ 1.8
SOD	5	20 $\pm$ 1.4	61 $\pm$ 2.2	81 $\pm$ 2.5
Catalase	5	20 $\pm$ 0.5	58 $\pm$ 3.0	78 $\pm$ 2.9

와 Table 5에 요약하였다.

Table 4은 CR<sub>1aa</sub> 배양액과 BOEC 공동배양에 taurine(2.5mM), SOD(600U) 및 catalase(250U)을 첨가하여 체외발육율을 조사한 결과로서, 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 55.3%, 74.1%, 66.7% 및 70.7%로서 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났으며 (P<0.05), 항산화제 첨가구간에는 2.5mM taurine 첨가구의 체외발육율이 다소 높았으나 통계적 유의차는 없었다. 배반포기 수정란의 세포수는 각각 79±3.4, 81±1.8, 81±2.5 및 78±2.9로서 처리구간에 차이는 인정되지 않았다 (Table 5).

CR<sub>1aa</sub> 배양액과 BOEC 공동배양에 적정량의 항산화제를 첨가한 구에서 5~6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 glutathione농도를 Table 6에 요약하였다.

CR<sub>1aa</sub> 배양액과 BOEC 공동배양에 적정량의 항산화제를 첨가한 구에서 5~6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 glutathione농도를 Table 6에 요약하였다.

Table 6에 나타난 바와 같이, CR<sub>1aa</sub> 배양액에 taurine(2.5mM), SOD(600U) 및 catalase(250U)을 첨가한 구에서 5일 동안 배양한 후 얻은 배반포기 수정란의 glutathione농도는 각각 73.4pM, 79.9pM, 82.3pM 및 83.0pM으로서 250U catalase 첨가구가 다소 높은 농도를 나타냈지만 처리구간 차이는 인정되지 않았다.

CR<sub>1aa</sub> 체외배양액과 BRLC 공동배양에 적정량의 항산화제를 첨가한 후, 5~6일간 체외배양하여 얻은 체외발육성과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 7과 8에 요약하였다.

CR<sub>1aa</sub> 배양액과 BRL세포 공동배양에 적정량의 항산화제를 첨가하여 체외발육율을 조사한 결과, 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 63.8%, 75.5%, 71.0% 및 73.5%로서 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며 (P<0.05), 항산화제 첨가구간에 통계적 유의차는 인정되지 않았다 (P>0.05). 배반포기 수정란의 세포수는 250U catalase 첨가구가 90±1.2로서 여타구(0 : 83±1.7, taurine, 87±8.9 ; SOD, 86±4.0)보다 다소 높은 세

**Table 6. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/IVF embryos in CR<sub>1aa</sub> with or without antioxidants co-culture with BOEC**

Antioxidants	Dosage	No. of replicates	No. of blastocysts	Intracellular glutathione con., pM (Mean±S.E)
—	—	3	24	73.4±4.6
Taurine	2.5mM	3	30	79.9±5.9
SOD	600U	3	22	82.3±8.8
Catalase	250U	3	27	83.0±3.1

**Table 7. Effect of antioxidants on development of bovine IVM/IVF embryos in CR<sub>1aa</sub> with BRL cells**

Antioxidants	Dosage	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to;			Morulae plus blastocysts (% , M±S.E)
			Premorulae	Morulae	Blastocysts	
—	—	94	34	36	24	63.8 <sup>a</sup> ±7.9
Taurine	2.5mM	94	23	44	27	75.5 <sup>b</sup> ±6.9
SOD	600U	93	27	39	27	71.0 <sup>b</sup> ±6.7
Catalase	250U	98	26	41	31	73.5 <sup>b</sup> ±4.1

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

**Table 8. Number of inner cell mass and trophoblast cell of bovine embryos obtained from IVM/IVF in CR<sub>1aa</sub> with or without antioxidants co-culture with BRL cells**

Antioxidants	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M±S.E)	No. of TE cell (M±S.E)	Total cell no. of blastocysts (M±S.E)
—	5	18±0.7	65±2.0	83±1.7
Taurine	5	19±0.8	68±8.0	87±8.9
SOD	5	19±0.6	67±4.1	86±4.0
Catalase	5	22±1.9	68±2.2	90±1.2

**Table 9. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/IVF embryos in CR<sub>1aa</sub> with or without antioxidants co-culture with BRL cells**

Antioxidants	Dosage	No. of replicates	No. of blastocysts	Intracellular glutathione con., pM (Mean±S.E)
—	—	3	25	64.4 <sup>a</sup> ± 4.4
Taurine	2.5mM	3	29	67.5 <sup>a</sup> ± 8.8
SOD	600U	3	34	71.7 <sup>ab</sup> ± 7.8
Catalase	250U	3	30	80.0 <sup>b</sup> ± 6.7

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

포수를 나타냈지만, 처리구간 차이는 인정되지 않았다.

체외배양액과 BRL세포 공동배양에 일정량의 항산화제 첨가, 배양하여 생산된 배반포기 수정란의 세포내 glutathione 농도를 Table 9에 요약하였다.

Table 9는 CR<sub>1aa</sub> 배양액과 BRL세포 공동배양에 taurine(2.5mM), SOD(600U) 및 catalase(250U)을 첨가한 구에서 5~6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기내의 glutathione 농도를 조사한 결과로서, catalase(80.0pM) 첨가구가 여타구(0 ; 64.4pM, taurine ; 67.5pM 및 SOD ; 71.7pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

#### IV. 고 찰

본 연구는 소의 난포란을 체외에서 성숙, 수정하여 생산된 체외수정란의 체외배양에 있어 적정량의 항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 체외수정란의 체외발육율과 배반포기 수정란의 세포내 glutathione(GS-H) 농도 변화에 미치는 영향을 검토하였다.

체외수정란의 체외배양시 일어나는 발육억제현상은

초기배 수정란의 genome 활성화 유무와 free radical에 의해 일어난다고 알려져 있으며, free radical은 체외배양액내의 높은 산소 농도에 의해 형성된다고 보고되고 있다(Joenie, 1989).

이러한 Free radical을 제거하고, 체외수정란의 체외발육율을 향상하기 위하여 최근에는 배양액내에 여러 가지 성장인자의 첨가, thiol 화합물의 첨가, 항산화제의 첨가 및 체세포와의 공동배양이 폭 넓게 이용되어 좋은 체외발육성적을 얻고 있다.

체외배양액내에서 SOD는 thiol 화합물이 disulfide bonds를 산화시키므로서 발생하는 free radical을 제거하는 항산화제로 초산화음이온(superoxide anion)을 제거함으로써 과산화수소의 세포내 축적을 막아주어 수정란의 발육억제현상을 극복하게 해주며(Rong 등, 1994), Noda등(1991)은 생쥐 수정란을 체외배양시 SOD의 첨가는 2-세포기때 일어나는 발육억제현상으로부터 초기배 수정란을 보호한다고 보고하였다. Catalase는 체외수정란에서 생성되는 과산화수소를 물과 분자상태의 산소로 분해시키므로서 세포를 보호한다. 체외수정란과 자성생식기액에 높은 농도로 존재하며 황을 함유하고 있는  $\beta$ -amino acids인 taurine은

정자의 활력과 생존성을 향상시키며, 포유동물의 세포에서는 삼투압 조절자로서 높은 삼투압으로부터 세포를 보호하고, insulin 수용체와 결합하여 insulin의 생리적인 작용에도 관여하는 등 여러 가지 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(Maturo와 Kulakowski, 1988). 또한 체외배양액내 taurine은 free radical을 제거하는 항산화제 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(Leifried와 Bavister, 1981 ; Miller와 Schultz, 1987). 본 실험의 결과도, 소 체외수정란의 체외배양시 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 높은 체외발육율을 나타내어 이들의 결과와 일치하는 경향을 보였으며, 항산화제 첨가구간에는 2.5mM taurine 첨가구가 75.0%로서 600U SOD 첨가구(64.8%)와 250U catalase 첨가구(62.3%)보다 좋은 체외발육성적을 얻었으나 통계적 유의차는 없었다.

한편, 체외수정란의 체외발육율을 향상시키기 위하여 이용되고 있는 체세포와의 공동배양에서 체세포의 효과는 세포를 자극하여 유사분열을 하도록 촉진하는 물질인 성장인자들과 거대분자와 같은 여러가지 유사분열물질을 분비하여 체외발육율을 향상시키며, 배양액에 존재하는 유해물질을 제거하는 것으로 보고되고 있다(Bavister 등, 1992). 그중 난관 상피세포(BOEC)는 체외수정란의 성장을 자극하는 난관의 배태영양인자들인 화합물들을 분비하여 체외발육율을 향상시키며, 배양액에 존재하는 수정란 독소 기질을 제거시키는 것으로 보고되고 있으며(Katska 등, 1992), 난관에서 분비되는 특수한 당 단백질이 수정과 분할하는 동안 중요한 역할을 한다고 추론하였다(Brown 등, 1986).

또한, 백혈병 억제인자, IGF-I 및 TGF- $\beta$  등과 같은 성장인자를 분비하는 것으로 알려진 BRL세포의 역할은 명확하게 규명되지는 않았지만 free radical를 제거하는 항산화제를 분비하는 것으로 보고되고 있으며(Hernandez-Ledezma 등, 1993), BRL세포는 체외배양액내에 존재하는 수정란 독성물질을 중화시켜 주며, 수정란의 성장촉진 성분을 분비하여 수정란의 체외발육율을 향상시킨다고 보고했다(Thibodeaux 등, 1993).

본 실험의 결과는 BOEC, BRLC와의 공동배양이 항산화제 단독처리구보다 다소 높은 체외발육성적을 나타내어 큰 차이는 없었지만, BOEC와의 공동배양에

있어 상실배이상 발육된 체외발육율은 2.5mM taurine, 600U SOD 및 250U catalase 첨가구에서 각각 74.1%, 66.7% 및 70.7%로서 무첨가구의 55.3%보다 높은 체외발육율을 나타냈으며, BRLC와의 공동배양에서도 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 높은 체외발육율을 나타내어 항산화제의 첨가와 체세포 공동배양이 체외수정란의 발육억제현상을 극복하고 체외발육율을 향상시키는 것으로 생각된다.

2~8세포기 체외수정란을 적정량의 항산화제가 첨가된 배양액에서 5~6일 동안 배양하여 얻은 배반포 수정란의 GSH 농도는 250U catalase 첨가구가 54.8pM로서 가장 높은 농도를 나타냈으며, 대조구, 2.5mM taurine 및 600U SOD 첨가구는 각각 33.8pM, 39.3pM 및 42.3pM로서 항산화제 첨가구가 무처리구보다 높은 농도를 나타냈다. 한편 BOEC, BRLC와의 공동배양에서도 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 GSH의 농도가 높게 나타나 세포내 GSH의 농도는 체외발육율과 밀접한 관계가 있으며, 항산화제의 첨가도 세포내 GSH 합성을 증진시키는 것으로 생각된다.

GSH은 포유동물의 세포에서 주된 nonprotein sulphhydryl 화합물로서 세포가 증식되는 동안 아미노산의 수송, protein합성 및 효소활성과 같은 생물학적 기작에 있어 중요한 역할을 수행하는 아미노산 유도체이다(Lafleur 등 ; 1994). Arechiga 등(1995)은 GSH의 농도는 포유동물의 세포에서 0.5~10mM로서 매우 폭 넓은 범위를 가지고 있으며, 수정란의 체외배양시 생존율과 발육율을 감소시키는 heat shock로부터 체외수정란을 보호하며, oxidative stress에 의해 일어나는 발육억제현상을 극복하고 체외수정란의 체외발육율을 향상시킨다고 보고했는데 본 실험의 결과도 일치하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 소 체외수정란의 체외배양에 있어 항산화제의 첨가는 이식 가능한 상실배이상의 체외발육율을 향상시키며, 단독배양체계보다는 BOEC와 BRL세포 등과 같은 체세포와의 공동배양체계가 소 체외수정란의 발육억제현상을 극복하고 체외발육율을 향상시키는데 효과적인 것으로 생각된다.

## V. 적 요

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후

2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR<sub>1aa</sub>에 적정량의 taurine, superoxide dismutase(SOD) 및 catalase의 항산화제 첨가가 체외수정란의 체외발육율과 세포내 glutathione농도변화에 미치는 영향을 검토하였고, CR<sub>1aa</sub> 배양액에 BOEC와 BRL세포와의 공동배양에 taurine, superoxide dismutase(SOD) 및 catalase등 항산화제의 첨가배양이 체외수정란의 체외발육율과 세포내 glutathione농도 변화에 미치는 영향을 검토하였다.

1. CR<sub>1aa</sub> 배양액에 taurine(2.5mM), SOD(600U) 및 catalase(250U)을 첨가한 구에서 상실배이상 발육된 체외배양성적은 각각 45.1%, 75.0%, 64.8% 및 62.3%로서 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다(P<0.05).
2. CR<sub>1aa</sub> 배양액에 적정량의 항산화제를 첨가한 구에서 5~6일 동안 배양한 후 얻은 배반포기 수정란의 세포내 glutathione농도는 250U catalase가 54.8pM로서 여타구(0 : 33.8pM, 2.5mM taurine : 39.3pM, 600U SOD : 42.3pM) 보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다(P<0.05).
3. CR<sub>1aa</sub> 배양액과 소 난관상피세포(BOEC)와의 공동배양에 taurine(2.5mM), SOD(600U) 및 catalase(250U)을 첨가한 구에서 상실배이상 발육된 체외배양성적은 각각 55.3%, 74.1%, 66.7% 및 70.7%로서 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다(P<0.05).
4. CR<sub>1aa</sub> 배양액과 소 난관상피세포(BOEC)와의 공동배양에 적정량의 항산화제를 첨가한 구에서 5일 동안 배양한 후 얻은 배반포기 수정란의 세포내 glutathione농도는 각각 73.4pM, 79.9pM, 82.3pM 및 83.0pM로서 처리구간에 차이는 인정되지 않았다.
5. CR<sub>1aa</sub> 배양액과 buffalo rat의 간세포(BRL)와의 공동배양에 taurine(2.5mM), SOD(600U) 및 catalase(250U)을 첨가하여 체외발육율을 조사한 결과, 상실배이상 발육된 체외배양성적은 각각 63.8%, 75.5%, 71.0% 및 73.5%로서 항산화제 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하

게 높게 나타났다(P<0.05).

6. CR<sub>1aa</sub> 배양액과 buffalo rat의 간세포(BRL)와의 공동배양에 적정량의 항산화제를 첨가하여 5일 동안 배양한 후 얻은 배반포기 수정란의 세포내 glutathione농도는 250U catalase가 80.0pM로서 여타구(0 , 64.4pM; 2.5mM taurine , 67.5pM; 600U SOD , 71.7pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다(P<0.05).
7. 모든 처리구에서 배반포까지 발육된 체외수정란의 세포수는 처리간 커다란 차이가 없었다.

## 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. Bavister, B. D., T. A. Rose-Hellekant and T. Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured/ *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146.
3. Berg, U. and G. Brem. 1990. Development rates of *in vitro* produced IVM-IVF bovine oocytes in different cell co-culture systems. *Theriogenology*, 33:195 Abstr.
4. Bize, I., G. Santander, P. Cabello, D. Driscoll and C. Sharpec. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 44:398-403.
5. Brown, C. R and W. K. T. Cheng. 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2~4 cell embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 77:411-417.
6. Eyestone, W. H., and N. L. First, 1989. Co-cultured of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 85: 715-720.



7. Hernandez-Ledezma, J. J., C. Villanueva, J. D. Sikes and R. M. Roberts. 1993. Effect of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with ether bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation / *in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology*, 39:1267-1277.
8. Joenje, H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. *Mut. Res.* 1219:193-208.
9. Jones, D. P. 1985. Oxygen supply. In H. Sies(ed) : "oxidative stress" London : Academic Press Inc. Ltd., pp. 167-170.
10. Katska, L., B. Rynska and Z. Smorag. 1992. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM /IVF oocytes. *Theriogenology*, 42:859-870.
11. Laflour, 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.
12. Leifried, M. L. and B. D. Bavister. 1981. Effect of epinephrine and hypotaurine on *in vitro* fertilization in the golden hamster. *J. Reprod. Fert.* 4:57-63.
13. Li, J., R. H. Foote and M. Simkin. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 48:33-39.
14. Maturo, J. and E. C. Kulakowski. 1988. Taurine binding to the purified insulin receptor. *Biochem. Pharmacol.* 37:3755-3760.
15. Miller, J. G. O. and G. A. Schultz. 1987. Amino acid content of preimplantation embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol. Reprod.* 36:125-129.
16. Miyazaki, T. S., K. Dharmarajan, S. J. Atlas, G. B. Bulkley and E. E. Wallach. 1991. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the *in vitro* perfused rabbit ovary. *J. Reprod. Fert.* 91:207-212.
17. Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi and T. Mori. 1991. Involvement of superoxide radical in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Develop.* 28:356-360.
18. Rong, Z. L. U., A. Ikeda and M. Takashashi. 1994. Activin A and superoxide dismutase synergistically enhance development of 1-cell mouse embryos to the blastocyst stage *in vitro*. *J. Reprod. Develop.* 40:279-284.
19. Thibodeaux, J. K., R. P. Del Vecchio and W. Hansel. 1993. The role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 98:61-66.
20. Thompson, J. G. E., A. C. Simpson, P. A. Pugh, P. E. Donnelly and H. R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 89:573-578.
21. Umoako, Y., Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mor. Reprod. Dev.* 31:28-33.
22. Yang, B. K., C. K. Park, J. B. Kim, H. T. Cheong and C. I. Kim. 1993. Development of bovine IVM /IVF embryos cultured in TCM-199 and synthetic oviduct fluid medium with, without co-culture system. *Korean. J. Animal Reprod.* 17(3):243-248.
23. 양부근, 고광두, 김정익, 1990. 체외성숙, 체외수정 후 수정란의 co-culture. *한국가축번식학회지.* 14:50~56.
24. 양부근, 황환섭, 박동현, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1996. 항산화제 첨가와 체세포 공동배양 이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향. II. 체세포 공동배양과 항산화제 첨가가 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과. *한국가축 번식학회지.* 29(2):171-177.

(접수일자 : 1997. 10. 29. /채택일자 : 1997. 11. 26.)