

β -Mercaptoethanol 및 Cysteamine이 돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향

한만희 · 박병권* · 박창식 · 서길웅 · 이규승
충남대학교 농과대학 동물자원학부

Effect of β -Mercaptoethanol and Cysteamine on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

Han, M. H., B. K. Park*, C. S. Park, K. W. Seo and K. S. Lee

Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture,
Chungnam National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of β -mercaptoethanol (β -ME) and cysteamine on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. The results obtained were summarized as follows :

1. When the immature oocytes were cultured at 0, 10, 50, 100 and 200 μ M of β -ME for 36h, the GVBD rates were 91.6, 92.5, 91.8, 91.9 and 92.7%, respectively, and the maturation rates of the oocytes with metaphase-II were 49.6, 41.7, 32.5, 34.1 and 35.4%, respectively. Thus, lower maturation rate was shown in β -ME treated groups of 50, 100 and 200 μ M as compared to control (non-treated) group ($P < 0.05$). After 44h of culture in the same treatments of β -ME, the GVBD rates of porcine oocytes were 91.8, 90.4, 92.5, 91.2 and 93.9%, respectively, and the maturation rates were 71.9, 58.8, 56.7, 62.2 and 56.5% respectively. All treated groups of β -ME showed lower maturation rates than the control group ($P < 0.05$).
2. When the immature oocytes were cultured at 0, 10, 50, 100 and 200 μ M of cysteamine for 36h, the GVBD rates were 90.6, 86.3, 88.2, 87.2 and 90.0%, respectively, and the maturation rates were 53.8, 45.1, 54.4, 57.5 and 63.3% respectively. Especially, the maturation rate of 200 μ M treated group was significantly higher than those of control group ($P < 0.05$). After 44h of culture in the same treatments of cysteamine, the GVBD rates of porcine immature oocytes were 89.5, 93.1, 85.1, 89.8 and 91.3%, respectively, and the maturation rates of the oocytes with metaphase-II were 84.2, 77.6, 66.0, 67.8 and 78.3%, respectively. Especially, the maturation rates of 50 and 100 μ M treated groups were significantly lower than those of control group ($P < 0.05$).

(Key words : Porcine oocytes, IVM, β -Mercaptoethanol (β -ME), Cysteamine)

* 공주문화대학 애완동물과(Department of Companion Animal, Kongju National Culture College)

I. 서론

돼지 난포란의 체외성숙에 관한 연구는 다른 동물에 비하여 늦게 성공되어서 1989년에 이르러서야 비로소 미성숙난포란을 이용한 체외성숙, 체외수정 및 수정란 이식에 의한 산자가 보고(Mattioli 등, 1989)되었다. 이와 같은 원인으로서는 타 동물에 비하여 성숙과정이 상이한 점이 많고, 성숙시간이 길며 이로 인하여 불안정한 성숙이 유기된 체외성숙 난자로 수정을 하였을 경우 다정자 침입율이 높으며 응성전핵형성율이 낮고, 4세포기에 발달이 정지되는 체외발육능정지현상(*in vitro cell block*) 등이 초래되는 등 체외수정란의 이용성을 감소시키고 있다.

Nasr-Esfahani 등(1992)은 체외수정란의 이용성을 증대시키고자 기존의 체외배양체계에 추가하여, 배양액 중에 함유되어 세포대사를 저해하는 금속이온을 제거하기 위하여 chelating 물질인 EDTA, transferrin 및 glutamine 등을 첨가배양하는 방법과 세포대사 과정에서 발생하여 'oxidative stress'를 초래하여 발달을 저해하는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 제거하기 위하여 항산화제(antioxidants)를 첨가배양하면 체외배양시 야기되는 부적절한 조건을 극복할 수 있다고 보고하였다.

활성산소(reactive oxygen species, ROS)란 산소라디칼(oxygen free radical) 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물을 통칭하는 것으로, 이들은 모두 반응성이 높은 특징을 갖고 있다. Free radical이란 화학적으로 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 지닌 원자나 분자를 의미한다. 이들은 이 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자 하나를 더 얻어 보다 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 있기 때문에 불안정하다. 따라서, 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 전자를 잃거나 얻으려 하기 때문에 높은 반응성을 갖는다(Halliwell과 Gutteridge, 1992). 따라서, 활성산소는 정자에 있어서 원형질막의 지방과산화(lipid peroxidation)를 초래하여 정자의 운동성, 수정능획득 및 침체반응을 억제시키며, 수정시 원형질막의 결합에 관여하는 SH기를 갖는 단백질을 감소시킴으로써 해서 결합자체를 방해하게 된다고 보고(Mammoto 등, 1996)되었고, 미성숙난

자 및 수정란의 체외배양시에는 미토콘드리아의 호흡작용억제, 세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA상의 손상을 초래하여 그 이용성을 감소시킨다고 Corsby 등(1988)은 보고하였다. 이러한 활성산소를 제거할 목적으로 기존의 배양체계에 황화합물(thiol compounds)의 일종인 β -mercaptoethanol(β -ME) 및 cysteamine의 첨가 배양하는 연구가 많은 연구자에 의하여 수행되어 왔다. 소 수정란의 체외배양시 Takahashi 등(1996), Lim 등(1996), Caamano 등(1996), 이 등(1997), 양 등(1997)은 β -ME를 첨가 배양함으로써 높은 응성전핵형성을 및 배반포도달율을 보고하였고, Grupen 등(1995)은 돼지에서, Matos 등(1995) 및 양 등(1997)은 소에서, Kito와 Bavister(1997) 등은 햄스터에서 각각 cysteamine의 첨가배양이 수정을 및 배발달에 영향을 미친다고 보고하였다. 그러나 돼지난포란(*immature oocyte*)의 체외성숙(*in vitro maturation, IVM*)에 관한 연구는 체외수정 및 배발달에 비하여 연구가 미진한 것이 현실이다.

이에 본 연구는 복합배양액인 TCM-199에 황 화합물(thiol compounds)인 β -mercaptoethanol(β -ME) 및 cysteamine을 첨가하여 난포란의 체외성숙을 유기시킴으로써 이들 황 화합물이 돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 구명하고자 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 미성숙난포란의 회수

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경산돈(체중 120 kg내외)으로부터 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가한 38°C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 후 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고 채자 신선 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 100 ml 비이커에 넣어 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10 ml 주사기로 직경이 2~5 mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15 ml 원심분리관에 옮겨 38°C로 조정된 정온대(multi-block, USA)에

10분간 정지, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5 cm간격으로 방판을 표시한 87×15 mm 페트리접시(petri dish, Korea)에 넣고 1 mg/ml BSA(Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 TL-HEPES와 희석하여 실제현미경(Nikon SMZ-2T, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질의 균일한 난포란만을 선별하여 난포란 흡입에 적당한 직경이 되도록 제작한 9" pasteur pipet(corning, USA)을 이용하여 난포란을 회수한 후 체외성숙 실험에 공시하였다.

2. 체외성숙 배양액

본 실험에서 사용된 체외성숙 배양액은 TCM-199(Gibco, USA)에 10% FCS(Gibco, USA), 0.2 mM Na-pyruvate(Sigma, USA)와 10 µg/ml FSH-p 및 1 µg/ml estradiol-17β의 호르몬, 25 µg/ml의 gentamycin(Sigma, USA)을 첨가하여 기본 배양액으로 작성하였고, 각각의 황 화합물(thiol compounds)을 실험 목적에 적합하도록 첨가한 후, 0.22 µm millipore filter(MFS, USA)로 여과·멸균하여 39°C, 5% CO₂ 및 고습도의 조건의 CO₂ 배양기(Forma, USA)에서 3시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

3. β-mercaptoethanol(β-ME) 및 cysteamine의 첨가 배양

체외성숙배양액인 TCM-199에 β-mercaptoethanol(β-ME) 및 cysteamine을 각각 첨가하여 4-well plastic dish(Nunc, Denmark)에 500 µl의 well을 제작한 후 well당 30~40개의 미성숙난포란을 적하하여 36시간 및 44시간 동안 39°C, 5% CO₂ 및 고습도 조건의 CO₂ 배양기에서 배양한 후, 염색을 통하여 난핵포붕괴율(germinal vesicle breakdown, GVBD) 및 핵성숙율(second meiotic division Metaphase-II, M-II)을 조사하였다. 구체적인 실험설계는 다음과 같다. 실험 1. β-mercaptoethanol(β-ME)을 0(control), 10, 50, 100 및 200 µM을 각각 첨가하여 36 및 44시간 동안 배양했을 때 난핵포붕괴율과 핵성숙율에 미치는 영향, 실험 2. cysteamine을 0(control), 10, 50, 100 및 200 µM농도로 첨가하여 36 및 44시간 동안 배양했을 때 난핵포 붕괴율과 핵성숙에

미치는 영향에 대하여 조사하였고, 이상과 같은 모든 실험은 37.5°C로 조정된 현미경가온판(microscopic stage warmer, Japan) 위에서 실시하였다.

4. 체외성숙 난포란의 염색 및 성숙판정

각각의 처리구별 36시간 및 44시간 동안 성숙배양시킨 난포란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속 염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하여 핵성숙단계를 비교 판정하였다. 염색방법을 요약하면 0.3% hyaluronidase (Sigma, USA)용액에 성숙이 유기된 난자난구세포복합체(oocyte-cumulus complexes)를 옮겨 1분간 vortexing을 통하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 1% BSA가 함유된 TL-HEPES로 3회 세척하였다. 100% 에탄올에 침지하여 세척한 slide glass위에 난포란을 30~40개를 적하한 다음, cover slip으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover slip과 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol = 1 : 3)을 흘리는 방법으로 5분간 고정하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol = 1 : 3 : 1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거시킨 다음, 위상차현미경(400~1,000×)으로 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다. 핵성숙단계의 판정은 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 실시하였다.

5. 통계분석

본 연구에서 얻어진 실험자료의 통계처리는 Chi-square test(P<0.05)을 하여 처리구간의 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. β-Mercaptoethanol(β-ME)의 첨가배양이 체외성숙에 미치는 영향

돼지 미성숙난포란을 체외성숙 기본배양인 TCM-199에 β-ME를 첨가하여 36시간 및 44시간 동안 성숙을 유기하였을 때의 결과는 Table 1 및 Fig. 1과 같다. 즉, 성숙배양액에 β-ME를 0, 10, 50, 100 및 200 µM을 첨가하여 36시간 동안 체외성숙을 유기시킬 때 난

Table 1. Effect of the addition β -mercaptoethanol(β -ME) to TCM-199 on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes

Culture periods (h)	Addition of β -ME (μ M)	Total no. of oocytes examined ⁴	No. of oocytes at the stages of ¹						Percentage of GVBD	Maturation rate(%) ²
			GV ³	Pro- I	Met- I	Ana- I	Tel- I	Met- II		
36	0	95	8	—	14	6	8	59	91.6	49.6
	10	106	8	—	16	20	12	50	92.5	41.7
	50	98	8	2	18	16	12	42	91.8	32.5*
	100	124	10	4	28	24	14	44	91.9	34.1*
	200	110	8	2	24	26	6	44	92.7	35.4*
44	0	98	8	1	6	—	2	81	91.8	71.9
	10	114	11	—	23	10	2	68	90.4	58.8*
	50	106	8	—	20	4	4	70	92.5	56.7*
	100	114	10	—	12	8	6	78	91.2	62.2*
	200	82	5	2	14	3	4	54	93.9	56.5*

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

² percentage of oocytes reached Met- II.

³ the data included degeneration oocytes.

⁴ Data from 3 replicates.

* Significantly different from the control value ($P < 0.05$).

핵포붕괴율은 각각 91.6, 92.5, 91.8, 91.9, 및 92.7%로서 처리기간 유의성이 없는 높은 결과를 보였고, 핵성숙율은 각각 49.6, 41.7, 32.5, 34.1 및 35.4%로서 대조구에 비하여 비교적 낮은 성숙율을 보였으며, 특히 50, 100 및 200 μ M 첨가시 유의적으로 낮은 핵성

숙율을 나타냈다($P < 0.05$). 또한, 44시간 동안 체외 성숙을 유지시켰을 때 난핵포붕괴율은 각각 91.8, 90.4, 92.5, 91.2 및 93.9%로서 처리기간 유의성 없이 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 71.9, 58.8, 56.7, 62.2 및 56.5%로서 대조구에 비하여 전 처리구에서

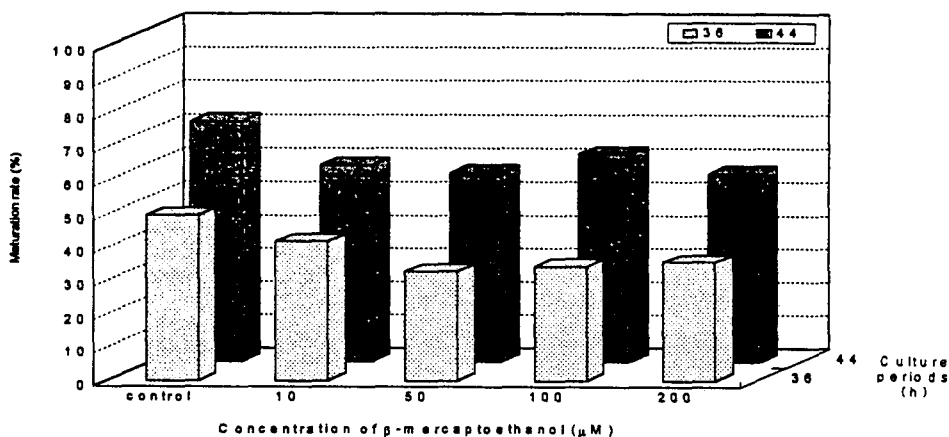


Fig. 1. Comparison of β -mercaptoethanol(β -ME) effect of the maturation rate of porcine follicular oocytes for 36h or 44h *in vitro*

유의적으로 낮은 성숙율을 나타냈다($P < 0.05$).

돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 β -ME의 첨가배양하여 핵성숙만을 연구한 보고는 없지만, Caamano 등(1996)이 소 체외수정란을 TCM-199에 100 μ M β -ME와 10% FBS를 병행처리하여 배양하였을 때, 배 발달을 촉진시켰다는 보고와 양 등(1997)이 CR1aa에 50 μ M의 β -ME를 첨가한 처리구에서 유의적으로 높은 상실배 및 배반포 발달의 결과를 보고한 실험결과 등을 통하여 볼 때, β -ME는 배양액중에 GSH의 합성 전구물질인 cysteine의 양을 증가시켜서 증가된 GSH가 난세포질내에 축적되어 있다가 수정시 응성전 핵형성을 증가시키고 'oxidative stress'로부터 수정란을 보호하여 초기배 발달을 촉진하는 역할을 수행한다고 사료된다.

2. Cysteamine의 첨가배양이 체외성숙에 미치는 영향

돼지 미성숙난포란을 기본 배양액인 TCM-199에 cysteamine을 첨가하여 36시간 및 44시간 동안 성숙을 유기하였을 때의 결과는 Table 2 및 Fig. 2와 같다.

즉, 성숙배양액에 cysteamine을 0, 10, 50, 100 및 200 μ M을 첨가하여 36시간 동안 체외성숙을 유기시켰을 때 난핵포분괴율은 각각 90.6, 86.3, 88.2, 87.2 및 90.0%로서 각 처리구간 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 53.8, 45.1, 54.4, 57.5 및 63.3%로서 대조구와 비슷한 결과를 나타냈고, 특히 200 μ M의 첨가군에서 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈다($P < 0.05$). 또한, 44시간 동안 체외성숙을 유기시켰을 때 난핵포분괴율은 각각 89.5, 93.1, 85.1, 89.8 및 91.3%로서 모든 처리구에서 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 각각 84.2, 77.6, 66.0, 67.8 및 78.3%로서 대조구에 비하여 전 처리구에서 다소 낮은 결과를 보였으며, 특히 50 및 100 μ M 처리구에서 유의적으로 낮은 핵성숙율을 나타냈다($P < 0.05$).

Gruppen 등(1995)이 돼지 난포란을 TCM-199에 50 μ M 및 500 μ M의 cysteamine을 첨가하여 체외성숙을 유도하였을 경우 대조구에 비하여 유의적으로 높은 전핵형성율의 보였다는 결과($P < 0.001$)와 양 등(1997)이 CR1aa에 소 체외수정란을 체외배양시 50 및 75 μ M cysteamine을 첨가한 처리구가 대조구에

Table 2. Effect of the addition cysteamine to TCM-199 on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes

Culture periods (h)	Addition of cysteamine (μ M)	Total no. of oocytes examined ⁴	No. of oocytes at the stages of ¹					Percentage of GVBD	Maturation rate(%) ²	
			GV ³	Pro -I	Met -I	Ana -I	Tel -I			Met -II
36	0	106	10	1	18	7	13	57	90.6	53.8
	10	102	14	—	8	12	22	46	86.3	45.1
	50	136	16	—	8	22	16	74	88.2	54.4
	100	94	12	—	—	4	24	54	87.2	57.5
	200	120	12	2	12	10	8	76	90.0	63.3*
44	0	95	10	—	4	—	1	80	89.5	84.2
	10	116	8	—	6	4	8	90	93.1	77.6
	50	94	14	1	12	4	1	62	85.1	66.0*
	100	118	12	—	18	4	4	80	89.8	67.8*
	200	92	8	—	6	—	6	72	91.3	78.3

¹ GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

² percentage of oocytes reached Met-II.

³ the data included degeneration oocytes.

⁴ Data from 3 replicates.

*Significantly different from the control value($P < 0.05$).

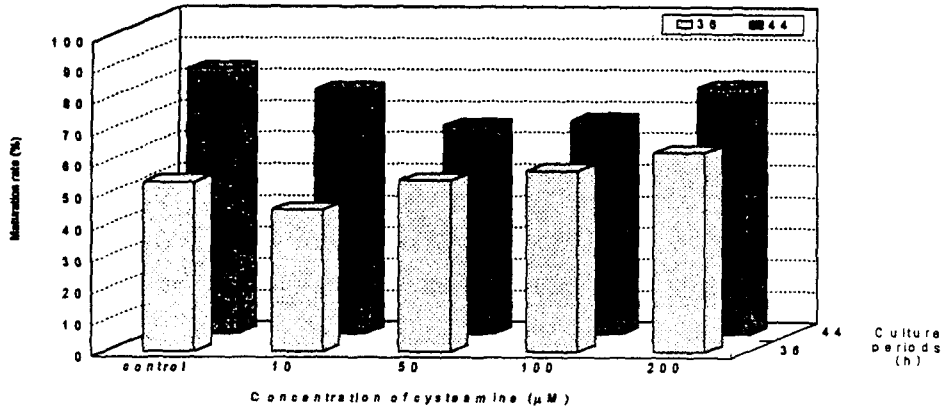


Fig. 2. Comparison of cysteamine effect on the maturation rate of porcine follicular oocytes of 36h or 44h *in vitro*

비하여 유의적으로 높은 상실배 및 배반포발달의 결과 및 배반포를 50 μM cysteamine 첨가하여 배양하였을 때, GSH 합성율이 67.8±0.6으로써 유의적으로 높은 결과를 보였다는 결과를 종합하여볼 때, 미성숙 난포란 및 수정란의 배양시 첨가한 cysteamine은 hypotaurine과 taurine의 전구체로서 작용하여 난세포질내의 GSH의 합성을 촉진함으로써 체외수정시 정상수정율을 높여주며 배발달 과정에서도 효과적으로 관여하는 것으로 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙시킬 때, β-mercaptoethanol(β-ME) 및 Cysteamine의 첨가 배양이 난핵포붕괴 및 핵성숙율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 체외성숙 배양액인 TCM-199에 β-ME를 0, 10, 50, 100 및 200 μM을 첨가하여 36시간 동안 성숙을 유기시킬 때 난핵포붕괴율은 각각 91.6, 92.5, 91.8, 91.9 및 92.7%로서 처리구간 유의성이 없는 높은 결과를 보였고, 핵성숙율은 각각 49.6, 41.7, 32.5, 34.1 및 35.4%로서 대조구에 비하여 비교적 낮은 성숙율을 보였으며, 특히 50, 100 및 200 μM 첨가시 유의적으로 낮은 핵

성숙율을 나타냈다($P < 0.05$). 또한, 44시간 동안 체외성숙을 유기시켰을 때 난핵포 붕괴율은 각각 91.8, 90.4, 92.5, 91.2 및 93.9%로서 처리구간 유의성 없이 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 71.9, 58.8, 56.7, 62.2 및 56.5%로서 대조구에 비하여 모든 처리구에서 유의적으로 낮은 성숙율을 나타냈다($P < 0.05$).

2. 체외성숙 배양액인 TCM-199에 cysteamine을 0, 10, 50, 100 및 200 μM을 첨가하여 36시간 동안 성숙을 유기시켰을 때 난핵포붕괴율은 각각 90.6, 86.3, 88.2, 87.2 및 90.0%로서 각 처리구간 높은 결과를 나타냈고, 핵성숙율은 53.8, 45.1, 54.4, 57.5 및 63.3%로서 대조구와 비슷한 결과를 나타냈으며, 특히, 200 μM의 첨가구에서 유의적으로 높은 성숙율을 나타냈다($P < 0.05$). 또한, 44시간 동안 체외성숙을 유기시켰을 때 난핵포붕괴율은 각각 89.5, 93.1, 85.1, 89.8 및 3%로서 모든 처리구에서 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 각각 84.2, 77.6, 66.0, 67.8 및 78.3%로서 대조구에 비하여 전 처리구에서 다소 낮은 결과를 보였으며, 특히 50 및 100 μM 처리구에서 유의적으로 낮은 핵성숙율을 나타냈다($P < 0.05$).

V. 인용문헌

1. Byun, T. H. and S. H. Lee. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. Kor. J. Emb. Trans., 7:97-110.
2. Byun, T. H., S. H. Lee and H. B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for of the oocytes from domestic animals. Kor. J. Anim. Sci., 33:25-31.
3. Caamano, J. N., Z. Y. Ryoo, J. A. Thomas, and C. R. Youngs. 1996. β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured /*in vitro*-fertilized embryos. Biol. Reprod., 55:1179-1184.
4. Channing, C. P. and Tsafri. 1978. Regulation of ovulatory processes: Ovum maturation, follicular rupture and luteinization. Plenum Press, New York.
5. Corsby, I. M., F. Gandolfi et al. 1998. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. J. Reprod. Fert., 82:769-775.
6. Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. Mol. Reprod. Dev., 39:30-40.
7. Downs, S. M. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. Biol. Reprod., 41:371-379.
8. Edward, R. G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. Nature, 208:349-352.
9. Eng, L. A., E. T. Konegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. Reprod. Fert., 76:657-662.
10. Eystone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
11. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert., 98:177-185.
12. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. Theriogenology, 39:965-973.
13. Funahashi, H., T. T. Stumpf, T. C. Cantley, N. H. Kim and B. N. Day. 1995. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and/or electrical activation. Zygotes, 3:273-281.
14. Grupen, C. G., H. Nagashima, and M. B. Nottle. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Biol. Reprod., 53:173-178.
15. Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1992. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford.
16. Hunter, R. H. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. J. Reprod. Fert., 12:525-531.
17. Kito, S. and B. D. Bavister. 1997. Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotropin, amino acids and cysteamine. J. Reprod. Fert., 110:35-46.
18. Kosower, N. S. and E. M. Kosower. 1978. The glutathione status of cells. Int. Rev. Cytol., 54:109-160.
19. Lafleur, M. V. M., J. J. Hoorweg, E. J. Westmijze and J. Retel. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. Free. Radic. Res.,

- 21:9-17.
20. Legge, M. and M. H. Sellens. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.*, 6: 867-871.
 21. Leibfried, M. L. and N. L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
 22. Li, J. and R. H. Foote. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. *J. Reprod. Fert.*, 98:163-167.
 23. 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.
 24. Linder, G. M. and R. W. Right, Jr. 1978. Morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:711-717.
 25. Luvoni, G. C., L. Keskinetepe, and B. G. Brakett. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:437-443.
 26. Mammoto, A., N. Masumoto, M. Tahara, Y. Ikebuchi, M. Ohmichi, K. Tasaka and A. Miyake. 1996. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol. Reprod.*, 55:1063-1068.
 27. Matos, D. G., C. C. Furnus, D. F. Moses and H. Baldassarre. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Develop.*, 42:432-436.
 28. Mattioli, M., M. L. Galeati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocyte mature and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
 29. Meister, A., and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52:711-760.
 30. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
 31. Nagai, T., J. Ding and R. M. Moor. 1993. Effects of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. *J. Exp. Zool.*, 266:146-151.
 32. Naito, K. and Y. Toyoda. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 47:43-47.
 33. Nasr-Esfahani, M. H., N. J. Winston and M. H. Johnson. 1992. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 96:219-231.
 34. Pabon, W. E., W. E. Findley and W. E. Gibbons. 1989. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fert. Steril.*, 51:896-900.
 35. Pincus, G., and E. V. Enzmann. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62:655-657.
 36. Quinn, P. and G. M. Harlow. 1978. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 206:73-80.
 37. Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J. Reprod. Fert.*, 74: 9-24.

38. Sawai, K., H. Funahashi and K. Niwa. 1997. Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biol. Reprod.*, 57:1-6.
39. Takahashi, H., M. Kuwayama, S. Hammo, M. Takahashi, A. Okano, H. Kadokawa, T. Kariya and T. Nagai. 1996. Effect of β -mercaptoethanol on the viability of IVM /IVF- /IVC bovine embryos long-distance transportation in plastic straws. *Theriogenology*, 46:1009-1015.
40. Ueno S., T. F. Manganaro and P. K. Donahoe. 1988. Human recombinant Mullerian inhibiting substance of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor *in vitro*. *Endocrinology*. 123:1652-1659.
41. Wang, Z. K., P. H. Wei, J. Z. Wang, C. Lei and M. Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 37:733-739.
42. Yoshida, M. and Y. Kojima. 1989. Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hairpin-curved tail in zona-free hamster egg. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51(2):428-430.
43. Yoshida, M., K. Ishigaki, T. Nagai and M. Chikyu. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes:Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.*, 49:89-94.
44. Zmuda, J. and B. Friedenson. 1983. Changes in intracellular glutathione levels in stimulated and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptoethanol or cysteine. *M. Immunol.*, 130:362-364.
45. 이홍준, 서승운, 이광희, 김기동, 이상호, 송해범. 1997. β -mercaptoethanol 첨가배양에 의한 소 초기배의 체외발생 효과. *한국가축번식학회지*. 21(4):389-396.
46. 양부근, 박동헌, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1997. 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. *한국가축번식학회지*, 21(4):335-343.
47. 양부근, 박동헌, 우문수, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1997. 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. *한국가축번식학회지*, 21(4):345-353.
48. 정형민. 1993. 형질전환동물의 생산을 위한 돼지난포란의 체외발생에 관한 연구. *건국대학교 석사학위논문*. pp.13-23.
49. 한만희. 1996. 체세포와의 공동배양이 돼지 체외수정란의 배발달에 미치는 영향. *충남대학교 석사학위논문*.
50. 황환섭. 1997. 항산화제와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향. *강원대학교 석사학위논문*.
(접수일자 : 1998. 12. 13. / 채택일자 : 1998. 12. 22)