

α -Tocopherol과 Cysteamine 첨가가 돼지 미성숙난포란의 체외성숙, 체외수정 및 배발달에 미치는 영향

이경호 · 문승주 · 김재홍
전남대학교 농과대학 동물자원학부

Effect of α -Tocopherol and Cysteamine on Maturation Male Pronuclear Formation and Development of Porcine Oocytes *In Vitro*

K. H. Lee, S. J. Moon and J. H. Kim

Department of Animal Science, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of α -tocopherol and cysteamine with Whitten's medium in supporting the development of *in vitro* maturation(IVM), *in vitro* fertilization(IVF) and *in vitro* culture(IVC) on porcine oocytes. When the immature oocytes were cultured of α -tocopherol for 40h, the nuclear maturation rates were 39.4, 65.6, 62.9 and 52.9%, respectively, and cysteamine for maturation rate were 46.6, 71.8, 52.5 and 54.1%, respectively. The nuclear maturation rates of treat groups were significantly ($P < 0.05$) higher than those of non-treat groups. After maturation, the oocytes were inseminated *in vitro* in medium 199 with ejaculated spermatozoa for examination of sperm penetration, polyspermy, male pronuclear(MPN) formation, and cleavage rate. Sperm penetration rates of treat higher than the control groups($P < 0.05$), and MPN formation rates were significantly($P < 0.05$) higher on treated groups(24.3~53.1%) than control groups(14.2~21.4%). After insemination, the cleavage rates at 120hr were groups higher than control groups($P < 0.05$).

(Key Word : α -tocopherol, cysteamine, male pronuclear(MPN) formation, polyspermy, fertilization)

서 론

체외수정기술은 번식효율의 극대화 및 동물의 유전적 능력을 효율적으로 향상시킬 수 있기 때문에 그 이용성이 강조되고 있다. 토끼 난포란의 체외성숙 사실을 확인(Pincus와 Enzman 1935) 이후, 체외수정란 생산 기술이 향상되었지만 (Hunter와 Polge, 1966 ; Crister 등, 1986 ; Eyestone과 Fir-st, 1989 ; Naito 등, 1992 ; Nagai, 1994) 낮은 체외

성숙율, 응성전핵형성을 그리고 체외발달을 등 이의 개선이 시급하다. 난자의 수정능과 수정후 배발달능력은 난포란의 핵성숙과 세포질 성숙에 의존하는데(Fukushima와 Fukui, 1985 ; Crister 등, 1986) 핵성숙은 성숙과정중 일어나는 일련의 염색체 변화에 의하여 판단 가능하지만 세포질 성숙은 수정후의 난할에 의하여 판단하고 있다. 난자의 성숙은 성선 자극호르몬 등의 영향으로 난자내 유전자 발현물질의 변화 난포내 환경적 요인들에 의하여 영향을 받는다. 일반적으로 미성숙난포란의 체

의성숙배양시 체내성숙보다 난포란의 gap junction의 감소가 빨라져 물질이동의 장애 발생, free radical의 대량 생성으로 인한 oxidative stress 유발 등이 난포란의 불완전한 성숙을 야기시킨다(Bize 등, 1971 ; Motlik 등, 1984 ; Miyazaki 등 1992)고 보고하고 있다. 체외발생능 정지현상의 원인은 아직 명확하지 않지만 체외발달 배양액내 glucose, glutamine, pyruvic acid 등의 부족 또는 과잉이 원인으로 알려져 있는데 수정란은 체외발달 배양시 glucose 등의 에너지를 취한 후 산소분자가 증가하며 free radical인 superoxide (O_2^-)가 생성되고, 생성된 super oxide는 지질의 과산화를 일으키고, 단백질 합성장애, 세포막 파괴등 강한 세포장해를 유발(Puglia와 Powell, 1984) 시킴으로써 발생한다고 한다. 체외배양시 형성되는 free radical을 제거하기 위한 방법으로 체외성숙 배양액에 혈청(Fukui 등, 1983 ; Sanbuissho와 Ther fall, 1985), 난포액(Funahashi와 Day, 1993), 난구세포(Hensleigh와 Hunter, 1985)등을 첨가 체외성숙을, 체외수정을 및 응성전핵형성을 등을 높이려는 연구가 있었고, 수정란의 체외발달율을 높이기 위하여 체외발달 배양액의 종류(Patters와 Wells, 1993), 난관상피세포와 공배양(Gandolfi와 Moor, 1987 ; Eyestone과 First, 1989) 등이 보고되고 있으며 최근에는 배양액내 free radical을 제거하기 위한 방법으로 산화·환원 효소인 SOD(superoxide dismutase), catalase 및 taurine 등과 같은 항산화제를 배양액내 첨가 체외발생능 정지현상을 극복하여 체외발달율을 개선시키는 방법 등이 보고되고 있지만 돼지 미성숙난포란의 체외성숙, 수정 및 체외발달에 관한 연구 결과가 만족할 수준에 이르지 못하고 있다.

따라서 본 연구는 체외성숙 배양액에 항산화제인 α -tocopherol과 cysteamine을 첨가 돼지 미성숙난포란의 체외성숙을, 체외수정을 그리고 체외배발달율에 미치는 효과를 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난포란의 준비

실험에 공시한 난포란은 도살 직후 적출한 난소를 채취 75 μ g/ml penicillin G와 50 μ g/ml strepto-

mycin sulfate가 첨가된 30~36 $^{\circ}$ C의 생리 식염수에 보존 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소의 표면을 생리 식염수로 2~3회 세척한 다음, 10ml 주사기로, 난포의 직경 3~6mm인 포상 난포에서 찢려 난포액과 함께 난포란을 채취하였다. 채취한 난포란은 실제현미경(20~40 \times)하에서 난구세포의 부착상태가 양호하고 난세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

2. 체외성숙, 수정 및 체외배양 배양액

본 실험에 사용된 체외성숙 배양액인 Whitten's 배양액에 100IU/ml HCG와 PMSG를 첨가후 황화합물인 α -tocopherol과 cysteamine을 실험목적에 적합하게 첨가 후, 0.22 μ mol syring filter로 여과, CO₂배양기(39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 10~12시간 동안 평형시킨 후 사용하였다. 체외수정 배양액(*in vitro* fertilization medium)은 수정능 획득 배양액과 체외배양액으로 나누어서 사용하였다. 수정능획득 배양액은 TCM-199(Sigma, USA)에 3.05mM D-glucose, 2.92mM Ca lactate, 0.91mM sodium pyruvate, 75 μ g potassium penicillin G와 50 μ g Streptomycin sulfate를 첨가한 기초 배양액에 0.4% BSA(Sigma, USA)를 첨가, pH 7.8로 조정 사용했다. 체외배양액은 TCM-199에 caffeine sodium benzonate (Sigma)를 첨가, pH 7.4로 조정 사용하였다. 체외발달배양액(*in vitro* culture medium)은 Whitten's 배양액을 사용하였다. Whitten's 배양액에 BSA 0.4%를 첨가 사용하였으며, 사용 전에 0.22 μ mol millipore filter로 여과, 멸균하여 CO₂ 배양기에서 10~12시간 동안 평형시킨 후 사용하였다.

3. α -Tocopherol 과 cysteamine 첨가배양

체외성숙 배양액인 Whitten's배양액에 α -tocopherol은 0, 5.0, 10.0 및 15.0 μ mol 농도로 첨가하고, cysteamine은 0, 50, 100 및 500 μ mol 농도로 첨가하여 40~44시간동안 체외성숙을 유도하였다.

4. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 10%의 난포액, 100IU/ml의 PMSG와 100IU/ml의 HCG를 첨가한 체외 성숙

배양액에 500 μ l씩 4-well dish(Nunc, USA)에 분주하고 mineral oil로 피복한 후 CO₂ 배양기에서 well 당 50개 정도의 미성숙 난포란을 적하하여 20~22시간 배양한 후 호르몬이 첨가되지 않은 체외 성숙 배양액에 옮겨 다시 20~22시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

5. 정자의 준비 및 체외수정

맨손채취법으로 채취한 정액은 75 μ g/ml potassium penicillin G와 50 μ g/ml streptomycin sulfate를 첨가, 16 $^{\circ}$ C에 보관 사용하였다. 정액 5ml와 동량의 BSA-saline(0.9% NaCl에 10 μ g/ml BSA 첨가)과 혼합한 후 200g에서 3분간 원심분리한 후 상층액 5ml와 BSA-Saline 5ml 혼합, 1,200g에서 3분간 2~3회 원심 분리하여 세정하였다. 세정 후 미리 준비한 수정능 배양액과 혼합, 정자수가 2 \times 10⁸/ml가 되도록 조절 CO₂배양기(39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 90분 동안 수정능 획득을 유도하였다(Nagai 등, 1984). 체외수정은 체외수정 배양액을 50 μ l의 미소적을 적하 mineral oil로 피복한 후 CO₂ 배양기 내에서 10~12시간동안 평형시켰다. 40시간 체외수정된 난자 10~15개씩을 준비한 미소적내로 옮기고, 수정능 획득 배양액으로 정자의 최종농도가 1 \times 10⁶/ml가 되도록 조절 정자를 주입한 후 CO₂ 배양기 내에서 6시간 동안 배양하여 체외수정을 유도하였다.

6. 난자의 체외 성숙 판정

체외 배양 40시간 후에 0.1%의 hyaluronidase로 성숙된 난자의 난구세포를 완전히 제거한 후 25% acetic ethyl alcohol 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1% orcein과 45% acetic acid로 염색하여 위상차 현미경(Nicon, Japan)하에서 검경 판정하였고(Okuta와 Nium, 1994), 핵성숙율은 핵포 붕괴율(GVBD)에서 감수분열 중기(M II)까지로 조사하였다.

7. 정자의 침입 및 응성 전핵 형성을 조사

체외수정 6시간 후에 체외배양액(*in vitro culture*)에 옮긴 후 다시 6시간동안 체외 배양시킨 수정란을 acetic acid와 ethyl alcohol을 3:1로 혼합한

용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1% orcein과 45% acetic acid로 염색하여 위상차 현미경하에서 정자의 난자내 침입 및 응성 전핵 형성을 등을 조사하였다. 난자내 정자 또는 응성전핵이 관찰되면 정자의 침입이 이루어졌다고 판단하고 한개 이상의 응성전핵이 하나의 난자에서 관찰되면 다정자 침입으로 간주하였다.(Nagai 등, 1984 ; Kato 등, 1994)

8 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과는 ANOVA(Analysis of Variance)검정에 의하여 통계 처리를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. α -Tocopherol과 cysteamine의 첨가배양이 체외성숙에 미치는 영향

돼지의 미성숙난포란을 체외성숙배양액인 Whitten's에 α -tocopherol과 cysteamine을 첨가하여 40시간동안 성숙 배양시킨 결과는 Table 1과 같다. 성숙배양액에 α -tocopherol을 0, 5.0, 10.0 및 15.0 μ mol을 첨가시 GV에서 AI까지는 GVBD에서 통계적인 차이를 약간 보였을 뿐 유의차는 나타내지 않았다. 그러나 T I 2.6, 15.6, 7.4 및 8.0%로 처리간의 유의성을 보였고(P<0.05), M II에서도 각각 5.2, 18.7, 18.5 및 16.0%의 처리구간의 유의성을 나타내었다(P<0.05). 핵성숙율에서는 각각 39.4, 65.6, 62.9 및 52.9%로 낮은 성숙율을 보인 반면 대조구보다 첨가구에서 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 또한 cysteamine을 첨가 배양시킨 후 핵성숙을 조사에서는 M I에서 13.3, 25.0, 6.7 및 8.3%로 유의차를 나타내었고 T I과 M II에서 3.3, 18.7, 11.8 및 10.4%와 13.3, 18.7, 22.0 및 20.8로 대조구인 무첨가구에 비하여 유의적인 차이를 나타냈다. 전체적인 핵성숙율 역시 46.6, 71.8, 52.5 및 54.1%로 cysteamine을 50 μ mol 첨가한 처리구에서 유의차를 나타내었다(P<0.05). 이상의 결과는 돼지난자의 체외성숙시 성숙배양액에 10% FCS를 첨가 배양했을 때 제2성숙 분열 중기 도달율(M II) 도달율이 56.1~65.8% 정도라고 보고한 결과(Nagai 등, 1988; Mattioli, 1988)보다 낮은 결과를 보였다. 또

Table 1. Effect of α -tocopherol and cysteamine addition to maturation medium on nuclear maturation of porcine oocytes

Supplement of antioxidant	Concentration of antioxidant (μ mol)	No. of oocytes examined	Maturation rate (%)	No. of (%) of nuclear stage						
				GV	GVBD	M I	A I	T I	M II	
α -Tocopherol	0	76	30(39.4) ^a	4(5.2)	10(13.1) ^a	10(13.1)	4(5.2)	2(2.6) ^b	4(5.2) ^b	
	5.0	64	42(65.6) ^b	6(9.3)	6(9.3) ^b	8(12.5)	6(9.3)	10(15.6) ^a	12(18.7) ^a	
	10.0	54	34(62.9) ^b	2(3.7)	8(14.8) ^a	10(18.3)	2(3.7)	4(7.4) ^{ab}	10(18.5) ^a	
	15.0	100	52(52.0) ^b	6(6.0)	8(8.0) ^b	8(8.0)	12(12.0)	8(8.0) ^{ab}	16(16.0) ^a	
Cysteamine	0	60	28(46.6) ^b	8(13.3)	4(6.6)	8(13.3) ^b	6(10.0)	2(3.3) ^b	8(13.3) ^b	
	50	64	46(71.8) ^a	8(12.5)	2(3.1)	16(25.0) ^a	4(6.2)	12(18.7) ^a	12(18.7) ^a	
	100	118	62(52.5) ^b	18(15.2)	4(3.3)	8(6.7) ^b	10(8.4)	14(11.8) ^{ab}	26(22.0) ^a	
	500	96	52(54.1) ^b	16(16.6)	6(6.2)	8(8.3) ^b	8(8.3)	10(10.4) ^{ab}	20(20.8) ^a	

* Stage of meiosis ; GVBD(Germinal Vesicle Breakdown), M I (Metaphase I), T I (Telophase I), M II (Metaphase II).

** a,b ; Different superscripts within column denote significant differences ($P < 0.05$).

한 Yoshida 등(1993)이 0.57mM의 cysteine이 첨가된 성숙배양액에 합성된 glutathione에 각 수준별로 첨가 실험한 결과 비슷한 결과를 나타내었고, 반면 대조구보다는 낮은 결과를 보인 것에 반해 본 실험에서는 첨가구에서 높은 수준 차이를 나타내었다. 이는 Yoshida 등(1993)은 성숙배양액에 12%의 FCS를 첨가한 반면 본 실험에서는 FCS첨가를 하지 않아 이러한 결과가 나타났다고 사료된다.

2. 체외성숙배양액내 α -tocopherol과 cysteamine 첨가가 체외수정, 다정자 침입 및 응성전핵 형성에 미치는 영향

항산화물질의 첨가 배양된 난포란의 난구세포를 일부 제거한 다음 체외수정시키고, 12시간 경과후에 수정란을 고정액에서 48시간 이상 고정한 다음 염색하여 체외수정율, 다정자침입율, 응성전핵형성율을 조사한 결과는 Table 2에 제시하였다. 체외수정배양액내 α -tocopherol을 농도별로 첨가 체외수정율 유기한 결과 정자의 침투율이 각각 33.3, 59.5, 59.6 및 45.9%로 유의차를 나타내었다 ($P < 0.05$). 또한 응성전핵형성율 역시 21.4, 46.8, 40.3 및 24.3%로 대조구보다 첨가구에서 유의적인 차이를 나타내었다. Cysteamine을 각 수준별로 첨가시 정자의 침투율은 26.1, 68.9, 78.1 및 61.2%로 유의차를 나타내었고 ($P < 0.05$), 응성전핵 형성율에서도 14.2, 48.2, 53.1 및 35.4%로 대조구와 높은 유의차를 보였다 ($P < 0.05$). 특히 100 μ mol 첨가시 침투율 응성전핵형성율 및 다정자 침입율에도 높은 유의차를 나타내었다 ($P < 0.05$). 이와 같이 체외수정시 체외수정율과 응성전핵형성율을 높인다. 이러한 결과는 Kito와 Bavister(1997)가 체외성숙배양액내 cysteamine을 첨가 hamster 난포란을 성숙시킨 후 체외수정 결과 cysteamine을 100 μ mol 첨가시 체외수정율이 각각 80%와 85%를 보였고 응성전핵 형성율이 60%와 80%로 대조구보다 유의적으로 높았다는 보고와 본 연구결과가 일치하는 경향이었으며 배양액내 cysteamine첨가는 소와 돼지 체외수정시의 체외수정율을 개선할 수 있을 것이다(Isselemd, 1988; Master, 1991)라는 보고와 일치하였다.

Table 2. Effect of α -tocopherol and cysteamine on the penetrated, polyspermy, number of spermatozoa and male pronuclear formation rate of porcine oocytes

Supplement of antioxidant	Concentration of antioxidant (μ mol)	No. of oocytes examined	No. (%) of penetrated	No. (%) of polyspermy	Mean number of spermatozoa in penetrated oocytes		Male pronuclear formation
α -Tocopherol	0	84	28(33.3) ^c	10(11.9)	1.01	18(21.4) ^b	
	5.0	94	56(59.5) ^a	14(14.8)	0.91	44(46.8) ^a	
	10.0	104	62(59.6) ^a	18(17.3)	1.53	42(40.3) ^a	
	15.0	74	34(45.9) ^b	16(21.6)	1.05	18(24.3) ^b	
Cysteamine	0	84	22(26.1) ^b	10(11.9) ^{ab}	1.01	12(14.2) ^b	
	50	58	40(68.9) ^{ab}	6(10.3) ^b	1.31	28(48.2) ^a	
	100	64	50(78.1) ^a	26(40.6) ^a	2.00	34(53.1) ^a	
	500	62	38(61.2) ^{ab}	16(25.8) ^{ab}	1.67	22(35.4) ^{ab}	

* a,b,c; Different superscripts within column denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of α -tocopherol and cysteamine on *in vitro* development of porcine oocytes

Supplement of antioxidant	Concentration of antioxidant (μ mol)	No. of oocytes examined	Cleavage rate	No. (%) of embryos that development to			
				48h		120h	
				2cell	4 to 8cell	Morular	Blastocyst
α -tocopherol	0	201	72(35.8) ^a	32(15.9) ^a	40(19.9) ^a	16(22.2)	6(8.3) ^a
	5.0	192	95(49.4) ^b	43(22.3) ^b	52(27.0) ^b	20(21.0)	9(9.4) ^a
	10.0	231	106(45.8) ^b	60(25.9) ^b	46(19.9) ^a	31(29.2)	17(16.0) ^b
	15.0	201	101(50.2) ^b	58(28.8) ^b	43(21.3) ^a	26(25.7)	12(11.8) ^a
Cysteamine	0	104	34(32.6) ^a	18(17.3) ^a	16(15.3)	5(14.7) ^a	2(5.8)
	50	157	69(43.9) ^b	41(26.1) ^b	28(17.8)	13(18.8) ^a	5(7.2)
	100	158	86(54.4) ^b	50(31.6) ^b	36(22.7)	20(23.2) ^b	8(9.3)
	500	157	78(49.6) ^b	51(32.4) ^b	27(17.1)	19(24.3) ^b	8(10.2)

* a,b; Different superscripts within column denote significant differences ($P < 0.05$).

3. α -tocopherol 과 cysteamine 첨가 배양이 체외 수정후 체외배발달에 미치는 효과

체외수정후 수정란을 120시간까지 체외배양기에 서 배양했을 때의 결과는 Table 3과 같다. 체외수정 후 48시간째 난할율은 체외성숙 배양액에 α -tocopherol을 첨가했던 처리구에서의 난할율은 각각 35.8, 49.4, 45.8 및 50.2%로 유의적인 수준을 나타내었다($P < 0.05$). 또한 초기배 발달율에 있어서도 α -tocopherol 5.0 μ mol 첨가했던 처리구에서 대조구에 비해 유의적인 수준차($P < 0.05$)를 나타내었다. 또한 대조구에 비해 첨가구에서 상실배는 유의차를 보이지 않은 반면, 배반포배에서 8.3, 9.4, 16.0 및

11.8%로 α -tocopherol을 10.0 μ mol 첨가했던 구에서 유의차를 나타내었다($P < 0.05$).

Cysteamine을 첨가후 수정시킨 수정란의 48시간 동안 배발달을 조사시 32.6, 43.9, 54.4 및 49.6%로 대조구에 비해 처리구에서 높은 유의차를 보였고($P < 0.05$), 48시간 후의 초기배 발달율에 있어서 2세포기의 배발달율이 대조구에 비해서 유의차를 나타내었고($P < 0.05$), 120시간동안 체외배발달을 조사에서 상실배에서는 대조구 14.7%보다 처리구 24.3%가 유의적인 수준 차이를 보였고($P < 0.05$), 배반포배에서 유의차는 나타내지 않지만 비교적 높은 경향을 나타내었다. 이는 Pabon등(1989) free oxygen radical이 수정란 발육억제현상의 한 원인이라

고 제시하였고, 체외배양액내에서 생성되는 free radical을 제거하기 위한 수단으로 Li(1993a)등은 항산화제를 첨가함으로써 발육억제 현상을 극복할 수 있다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내어 free radical로부터 세포기능의 손상을 방지(Bize 등, 1991 ; Miyazaki 등, 1991)할 수 있으며 이는 수정란의 특정 배발달 단계에서 체외 발생능정지(*in vitro* cell block)현상을 극복할 수있으리라 사료된다.

적 요

본 연구는 Whitten's 배양액에 α -tocopherol과 cysteamine과 같은 두 종류의 항산화물질에 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정 배발달시켜 미성숙난포란의 체외성숙율, 수정율, 응성전핵형성을 및 체외발달율에 미치는 효과를 조사하였다. 핵성숙을 정도에 미치는 영향에 있어서 α -tolcopherol과 cysteamine첨가 배양후 조사한 결과를 요약해보면 α -tolcopherol을 Whitten's 배양액에 넣고 40 시간동안 체외성숙시킨 후 핵성숙율은 39.4, 65.6, 62.9 및 52.9%이었고 cysteamine에서는 46.6, 71.8, 52.5 및 54.1%로 유의차를 보였다($P < 0.05$). 또한 체외수정후 정자의 침투율에서도 대조구보다 첨가구에서 높은 유의차를 보였고, 응성전핵형성을 (MPN formation)에서 대조구는 14.2~21.4%인 반면 처리구는 24.3~53.1%로 높은 유의차를 나타내었다($P < 0.05$). 체외수정후 120시간까지 수정란의 난할을 조사에서도 α -tocopherol과 cysteamine을 첨가한 처리구에서 대조구보다 높은 유의차를 나타내었다($P < 0.05$). 후기배 발달을 역시 α -tocopherol에서 8.3, 9.4, 16.0 및 11.8%로 배반포배기배의 난할율에서 유의차를 보였으며($P < 0.05$), cysteamine첨가에서 배반포배는 통계적인 유의차를 나타내지 않았지만 높은 경향을 보였다.

참고문헌

- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll, D and Sharpec C. 1991. Hyderogen peroxide is involved in hambester sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 44:398-403.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1986. Influence of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryonic development. *Bio. Reprod.*, 34:(suppl. 1):192.
- Eyestone WH and First NL 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastcyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium *Journal of Reproduction and Fertility*, 85:715-720.
- Eyestone WH and First NL 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastcyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium *Journal of Reproduction and Fertility*, 85:715-720.
- Fukui Y, Terawaki Y and Ono H. 1982. Effect of gonadotrpín, steroids and culture on bovine oocytes maturation. *Theriogenology*, 18: 161-175.
- Fukushima M and Fukui Y. 1985. Effects of gonadotropins and steriods on the subsequent fertilizativity of extra-follicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 9:323-332.
- Funahashi H and Day BN. 1993b. Effects of duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro* *Journal of Reproduction and Fertility*, 98:179-185.
- Gandolfi F and Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 81:23-28.
- Hensleigh MA and Hunter AG. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J. Dairy. Sci.*, 68: 1456-1462.
- Hunter RH and Polge C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadrophin. *J. Reprod.*

- Fert., 12:525-531.
- Kano K, Miyano T and Kato S. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. Theriogenology, 42: 1061-1068.
- Motlik J, Grozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicle. J. Reprod. Fert., 72:323-328.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes J. Reprod. Fert., 70: 271-275.
- Naito K, Dean FP and Toyoda Y. 1992. Comparison of hidtone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. Biol. Reprod., 47:43-47.
- Patters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. J. Reprod. Fert. Suppl., 48:61-73.
- Puglia CD and Powell SR. 1984. Inhibition of cellular antioxidants : A possible mechanism of toxic cell injury. Environ Health Perspect., 57:307-311.
-
- (접수일 : 1999. 2. 23 / 채택일자 : 1999. 4. 4)