

산소농도 및 Superoxide Dismutase가 돼지 난포란의
체외성숙과 배발달에 미치는 영향

한 만 회 · 이 규 승
충남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

**Effect of Oxygen Concentrations with Superoxide Dismutase
on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes and
In Vitro Development of Porcine IVM/IVF Embryos**

M. H. Han and K. S. Lee

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

SUMMARY

The present study was carried out to examine the effect of superoxide dismutase (SOD) on *in vitro* maturation (IVM) of porcine follicular oocytes and oxygen concentration with SOD on *in vitro* development (IVD) of porcine IVM/IVF embryos.

The results were summarized as follows :

1. The rates of nuclear maturation, penetrated oocytes, polyspermic oocytes and mean numbers of the penetrated sperm were not different in the NCSU-23 maturation media with 0, 100, 500 and 1,000 units/ml SOD. However, the pronucleus formation rates were significantly lower in oocytes matured with addition groups than those of no addition groups of SOD ($P>0.05$).
2. The rates of blastocyst formation and total cell numbers of blastocyst at day 7 after *in vitro* fertilization were significantly lower in addition groups than those of the no addition groups of SOD ($P>0.05$).
3. The rates of blastocyst formation at day 7 after *in vitro* fertilization were higher in the NCSU-23 culture medium with 100 units/ml SOD than in those cultured with 0, 500 and 1,000 units/ml SOD under the 5% and 20% O_2 concentrations. However, no differences was found in the total cell numbers of blastocyst among the treatments.

In conclusion, these results suggested that the addition of SOD was not adequate for porcine oocyte maturation and further development, also the rates of blastocyst formation and total cell numbers of blastocyst at day 7 of porcine IVM/IVF embryos were not different in the NCSU-23 culture medium under the 5% and 20% O_2 concentrations.

(Key words: porcine embryos, IVM, IVF, SOD, O_2 concentration)

서 론

그동안 체외에서 각종 포유동물의 수정란을 배양하고자 하는 연구는 많은 발달을 가져 왔으나,

†Correspondence : Tel : 042) 821-7026, Fax : 042) 823-9754, E-mail : hanmh99@hanmail. net

아직도 체내조건에 비하면 열등한 수준에 있다 (Winston 등, 1991; Carney 와 Foote, 1990). 체외 배양시스템을 여러 가지 측면에서 체내조건과 비교하여 보면 대단히 많이 차이가 나는 것 중의 한 부분이 산소농도이다. 일반적인 체외배양조건하의 산소농도는 대기중의 산소농도와 같은 150mmHg (20%)이며, 이것은 난관내의 생리적인 산소농도인 40~60mmHg(1~10%)보다 매우 높은 것(Johson 과 Nasr-Esfahani, 1993; Maas 등, 1976; Mastroianni와 Jones, 1965; Bishop, 1956)으로, 이렇게 높은 산소분압은 단순화산 형식으로 세포막을 통과하여, 세포질내의 농도가 점차 증가하고, 결과적으로 수정란은 비생리학적으로 높은 산소농도를 갖게 된다. 따라서, 체외배양시 높은 산소농도는 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROSs)를 생산함으로써 난포란의 성숙 및 체외발달시에 중요한 저해요인으로 작용하며, 특히 수정란을 체외 배양할 경우 나타나는 체외발육능 정지현상(*in vitro cell block*)을 유발시키는 주요한 요인이 된다고 보고하였다(Johson과 Nasr-Esfahani, 1993).

일반적으로 산소에 대한 독성은 미토콘드리아의 호흡과정이나 소포체의 cytochrome p450 oxidases로부터 산소(O₂) 전자의 분해로서 발생 (electron transfer reaction)하거나, aldehyde oxidase (AO), monoamine oxidase(MO), NADPH oxidase (NO), sulfite oxidase(SO) 및 xanthine oxidase(XO) 등과 같은 oxidase에 의한 산화시스템에 의하여 유발된 초산화음이온(O₂·⁻)에 의하여 이루어진다 (Johson과 Nasr-Esfahani, 1993; Fradovich, 1972). 세포안에서 발생되어진 O₂·⁻는 자발적 또는 효소적(SOD)인 부동변화(dismutation)에 의하여 다음 반응과 같이 H₂O₂와 O₂로 변환된다: 2O₂·⁻ + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂(Halliwell, 1975; Haber와 Weiss, 1932). Haber-Weiss 반응에 의하여 O₂·⁻와 H₂O₂는 활성이 가장 강한 OH·를 생산한다(O₂·⁻ + H₂O₂ → HO· + OH· + O₂). 초산화음이온(O₂·⁻)과 OH·는 지질과산화물 가속화시키고 각종 효소의 활성을 저해하며, 결과적으로 세포의 손상을 입히는 것으로 알려져 있다(Ding과 Chan, 1984; Ribarov와 Benov, 1981).

한편, superoxide dismutase(SOD)는 진핵세포에

서는 활성중심에 어떠한 이온이 존재하는가에 따라 CuZn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD 및 EC-SOD (extracellular-SOD)의 4종이 발견되었고 이 모든 SOD 효소들은 dismutation반응을 촉매한다(Fradovich, 1972). SOD의 특이한 점은 산소에 대하여 저활성이며, 반면에 구리화합물의 대부분은 산소에 대하여 높은 활성을 가진다. 그러므로, SOD는 생체의 O₂·⁻ 독성에 대하여 세포를 보호하며, 적어도 이 같은 과정은 O₂·⁻ 농도가 낮을 때 일어난다고 하였다(Czapski와 Goldstein, 1988).

포유동물의 체외배양체계에 있어서 산소농도를 20%에서 5%로 낮추어서 수정란을 배양하였을 때, 마우스(Payne 등, 1992; Umaoka 등, 1992; Quinn 과 Harlow, 1978), 토끼(Li와 Foote, 1993), 양(Thompson 등, 1990; Tervit 등, 1972), 소(Yang 등, 1994; Thompson 등, 1990; Tervit 등, 1972) 및 돼지(Wright, 1977) 등에서 배발달률을 증가시킨다고 보고하였고, 이와는 반대로 마우스(Leege와 Sellens, 1991)와 토끼(Lindenau와 Fischer, 1994; Li 등, 1993) 등에서 효과가 없다고 보고하였다. 또한, SOD는 배양액내에서 활성산소 등을 제거하는 'radical scavenger'로서 마우스(Dumoulin 등, 1992; Noda 등, 1989), 토끼(Li 등, 1993) 및 소(양 등, 1997b) 등에서 초기배발달에 좋은 영향을 미친다고 보고하였으나, 마우스(Leege와 Sellens, 1991), 양(Walker 등, 1992), 소(Liu와 Foote, 1995) 및 돼지(Park 등, 1996) 등에서는 효과가 없다고 보고하는 등 저분압산소조건과 SOD의 첨가비양에 따른 효과는 동물종, 배양액, 첨가농도, 체세포와의 공동배양 및 저분압 산소조건 등에 따른 연구자들의 연구 보고가 상이하고, 특히 돼지에서는 많은 연구가 수행되지 않아서 이에 대한 종합적인 연구가 절실히 필요한 실정이다.

이에 본 연구는 NCSU-23배양액을 기본배양액으로 SOD가 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하고, 아울러 저분압 산소조건(5% O₂)과 SOD가 돼지초기수정란의 배발달에 미치는 영향을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 비경산돈(체중 120kg 내외)으로부터 적출하여 75 µg/ml penicillin G와 50 µg/ml 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 재차 신선 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10ml 주사기로 직경이 2~5mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15ml 원심분리관에 옮겨 38°C로 조정된 정온대에 10분간 정지, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 87×15mm 패트리접시에 넣고 1mg/ml PVA (Sigma, USA)가 첨가된 TL-Hepes와 희석하여 실제현미경(Nikon, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질의 균일한 난포란만을 선별하여 난포란을 회수한 후 체외성숙 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙배양

본 연구에 이용되는 시약은 대부분 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 North Carolina State University(NCSU)-23(Petters와 Wells, 1993)을 기본배양액으로 하여 10% 돼지난포액(porcine follicular fluid, PFF), 0.9mM cysteine, 10IU/ml Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG), 10IU/ml human Chorionic Gonadotropin(hCG)와 10ng/ml의 EGF를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6mm 이상 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 3,000rpm, -4°C의 저온하에서 30분간 원심분리하고, 0.8 µm 필터로 여과·멸균한 후, -20°C 냉동고에 냉동보관하며 사용전 용해하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well당 500 µl의 난자 성숙용 NCSU-23 배양액을 넣어 전배양을 실시하였다. 회수한 양질의 미성숙난자는 TL-Hepes 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양

액으로 3회 세정하였다. 세정된 미성숙 난자는 각 well당 40~50개씩 넣어 38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도로 조정된 탄산가스배양기 내에서 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고, 이후에는 호르몬이 첨가되지 않은 체외성숙용 배양액에서 22시간 배양하여 총 44시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

1) 난포란의 준비

체외수정용 배양액은 modified Tris-buffered medium(mTBM, Abeydeera와 Day, 1997)을 기본 배양액으로 2.5mM caffeine(Sigma, USA)과 0.1% BSA(A7888, Sigma, USA)가 함유된 mTBM용액을 사용하였고(Abeydeera 등, 1997), 정액의 세정액으로는 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS; Gibco, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU-23 용액에 넣어 연속적인 피펫팅으로 난구세포를 제거하고, 2.5mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 용액으로 3회 세정하였다. 세정 후 미리 48시간 전배양을 실시한 90 µl 수정용 배양액 소적에 30~40개의 성숙난자를 넣고 매정시까지 배양기 내에서 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 수정능획득

정액은 인공수정용 액상정액으로 사용 직전까지 17°C 항온고에서 최대 4일간 보존하여 사용하였다. 보존된 정액은 사용직전에 정액세정액(DPBS)과 함께 1:1 비율로 15ml falcon tube에 넣고 450g에서 3분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하는 세정과정을 3회 실시하였다. 마지막으로 하단에 남은 정자 침전물에 정자 세정용배양액을 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기 내에서 10분간 정치하였다. 운동성을 가진 부유된 정자들을 회수하여 450g에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 체외수정용 배양액으로 재차 희석하였다. 희석된 정자는 성숙난자가 들

어 있는 소적에 최종농도가 1.2×10^5 sperm/ml이 되도록 각각 $10 \mu\text{l}$ 씩 주입한 후 39°C , 5% CO_2 및 포화습도의 탄산가스배양기 내에서 5~6시간 동안 체외 수정을 실시하였다.

3) 체외수정의 판정

각각의 처리구별 5~6시간 동안 체외수정용 배양액에서 정자와 수정을 유기한 후, pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거하였다. 그리고 배발달 배양액에 옮겨 추가로 배양한 다음, 수정후 10~12시간에 1-세포기의 수정란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하여 핵성숙, 정자의 침입, 자·용전핵형성 등의 수정 여부를 확인하였다.

4. 체외수정된 난포란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양에는 0.4% BSA(A0281, Sigma, USA)가 함유된 NCSU-23을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거한 다음 0.4% BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 각각의 처리구별로 작성된 배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)에 각 well당 $500 \mu\text{l}$ 의 배발달 배양액을 넣고 well당 40~50개씩 넣어 20% 산소조건(38.8°C , 5% CO_2 및 포화습도) 및 5% 산소조건(38.8°C , 5% O_2 , 5% CO_2 90% N_2 및 포화습도)의 배양기 내에서 각각 배양하여 체외배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할률을 조사하였고, 6일 및 7일째 배반포 발달률을 조사하였다. 이상과 같은 모든 실험은 37°C 로 조정된 현미경가온판에서 실시하였다.

5. 배반포의 이중형광염색

체외수정을 실시하여 생산한 돼지 수정란은 내부세포괴(inner cell mass, ICM)세포와 영양배엽(trophectoderm, TE)세포를 구별하기 위해서는 Machaty 등(1998)의 이중형광염색방법을 사용하였다. 간단히 요약하면, 수정란의 투명대를 0.5% pronase에 처리하여 용해시킨 후, TL-Hepes-PVA 배양액에서 3회 세척하였다. 이들 수정란은 rabbit

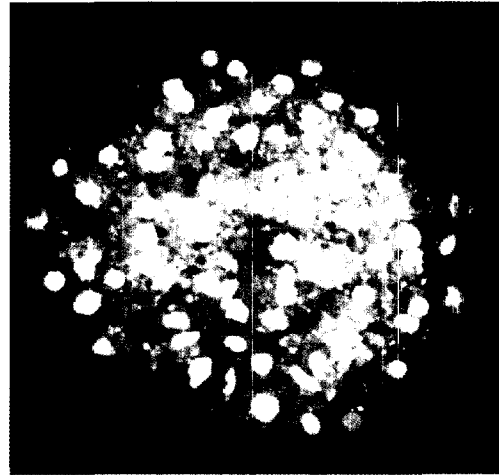


Fig. 1. A differentially stained IVM/IVF-derived porcine blastocyst. The blue objects are the nuclei of the inner cell mass cells and the pink objects are the nuclei of the trophectoderm (200x).

anti-pig whole serum이 1:5로 희석된 TL-Hepes 용액에서 1시간 처리한 후, TL-Hepes-PVA 용액으로 5분간 3회 세척하였으며, $10 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342와 $10 \mu\text{g/ml}$ propidium iodide(1:1)이 함유된 Guinea pig complement 가 함유된 TL-Hepes(1:10)-PVA에서 1시간 처리하였다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란은 slide glass위에 $3 \mu\text{l}$ mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 수정란을 투여한 후, cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경하(200x)에서 세포수를 조사하였다(Fig. 1).

6. 실험 구성

SOD가 체외성숙 및 배발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 SOD를 각각 0, 100, 500 및 1,000 Unit/ml을 첨가하여 체외성숙, 수정후 배발달에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, SOD 및 산소조건이 초기배발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 NCSU-23 배양액으로 성숙을 유도한 후, 정해진 방법으로 체외수정을 실시하였다. 그리고 생산된 수정란을 SOD가 각각 0, 100, 500 및 1,000Unit/ml이 첨가된 배발달배양액에 넣어 각각의 배양기에 배양하면서 배양 2일후에 난할률, 6일 및 7일에 배

Table 1. Effects of SOD concentrations during IVM on *in vitro* fertilization of porcine oocytes in mTBM

Concentration of SOD (U)	No. of examined oocytes	% (mean±SE) of oocytes			Percentage of polyspermic oocytes (Mean±SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean±SE)
		Matured	Penetrated	with male and female pronuclei		
0	78	84.4± 5.5	69.9± 3.3	95.0± 5.0 ^a	30.2±2.2	1.8±0.1
100	78	84.6± 0.4	60.2±10.5	90.9± 9.0 ^a	31.3±7.1	1.4±0.2
500	82	78.3±11.6	60.2±17.4	85.7±11.9 ^b	38.0±4.7	1.4±0.08
1,000	78	73.9±16.0	58.5±14.1	81.2± 6.2 ^b	37.5±2.5	2.0±0.5

^{ab} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

발달률, 이중형광염색을 통한 ICM세포 및 TE세포 수를 조사하였다.

7. 통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 4회 이상 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과와 통계처리는 SAS/STAT 6.03 package를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, Duncan's 다중검정(DMRT)에 의하여 처리구간 유의성을 검정하였으며, P<0.05 이하의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

돼지 난포란을 체외성숙배양액인 0.9mM cysteine가 함유된 NCSU-23 배양액에 SOD를 각각 0, 100, 500 및 1,000units/ml 첨가하여 성숙을 유도한 후, 체외수정용 배양액인 mTBM 배양액에 6시간 동안 체외수정을 실시한 결과는 Table 1과 같다.

즉, 핵성숙률(73.9~84.6%)과 정자침입률(58.5~69.9%), 다정자침입률(30.2~37.5%) 및 평균침입정자수(1.4~2.0개)는 처리구와 대조구간 유의적(P<0.05)인 차이가 인정되지 않았고, 응성전핵형성률은 처리구(90.9~81.2%)보다 오히려 대조구(95.0%)가 유의적으로 높은 결과를 나타냈다(P<0.05). 또한, SOD를 첨가하여 성숙을 유도한 후, 체외수정을 실시하여, NCSU-23 배양액으로 7일 동안 배발달을 유기한 결과는 Table 2와 3과 같다. 체외 배발달 48시간 후의 난할률은 처리구(50.2~66.8%)와 대조구(65.5%)간 유의성이 없었으며, 배반포 발달률과 총세포수는 처리구(각각 6.8~14.1%, 27.4~45.4개)가 대조구(18.2%, 59.1개)보다 유의적(P<0.05)으로 낮은 것으로 조사되어 효과가 없는 것으로 조사되었다. 따라서, 돼지난자의 체외성숙시 SOD의 첨가는 좋지 않은 것으로 사료된다.

이와 같은 결과는 돼지난자의 체외성숙시 Waymouth 배양액에 SOD를 각각 0, 10, 100units/ml

Table 2. Effects of SOD concentrations during IVM on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Concentration of SOD (U)	Total no. of putative embryos	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	83	65.5±11.6	14.3±1.5 ^a	18.2±2.2 ^a
100	91	66.8± 3.3	13.0±4.0 ^a	14.1±2.8 ^{ab}
500	88	57.9± 1.0	4.5±2.3 ^b	6.8±0.0 ^b
1,000	93	50.2± 2.6	5.0±2.7 ^b	7.2±2.5 ^b

^{ab} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

Table 3. Effects of SOD concentrations during IVM on mean cell number of porcine blastocysts

Concentration of SOD (U)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (Mean±SE)	No. of TE cells (Mean±SE)	Total cell no. of blastocysts(Mean±SE)
0	13	6.4±2.2	52.7±5.6 ^a	59.1±5.8 ^a
100	12	5.3±1.9	40.1±6.1 ^a	45.4±5.3 ^b
500	5	5.8±2.0	32.4±4.5 ^b	38.2±4.7 ^b
1,000	7	8.2±3.1	19.1±3.3 ^c	27.4±2.9 ^c

^{a,b,c} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

Table 4. Effects of O₂ with SOD concentrations on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Culture conditions		Total no. of putative embryos	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
O ₂ (%)	SOD (U)			Day 6	Day 7
5	0	108	85.1±1.5	20.3±0.3 ^c	22.2±0.3 ^c
	100	100	84.0±1.6	33.9±0.6 ^a	33.9±0.6 ^a
	500	108	88.8±1.6	25.9±0.5 ^{bc}	25.9±0.5 ^{bc}
	1,000	128	80.4±0.4	19.5±0.5 ^c	21.0±0.4 ^c
20	0	101	77.2±2.2	27.7±0.7 ^b	27.7±0.7 ^b
	100	103	81.6±2.4	25.2±0.7 ^{bc}	25.2±0.7 ^{bc}
	500	91	79.1±2.6	24.2±0.7 ^{bc}	24.2±0.7 ^{bc}
	1,000	114	74.5±0.4	23.7±0.3 ^{bc}	25.4±0.3 ^{bc}
Overall total or means					
5		444	84.6±1.2	24.9±2.1 ^A	25.7±1.9 ^A
20		409	78.1±1.2	25.2±0.6 ^A	25.6±0.5 ^A
	0	209	81.2±2.5	24.0±2.1 ^B	24.9±1.6 ^B
	100	203	82.8±1.3	29.6±2.5 ^A	29.6±2.5 ^A
	500	199	84.0±3.0	25.0±0.6 ^B	25.0±0.6 ^B
	1,000	242	77.5±1.7	21.5±1.2 ^C	23.2±1.2 ^C

^{a,b,c} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ (P<0.05).

^{A,B,C} Main effect means within columns with different superscripts differ (P<0.05).

을 첨가하여 성숙을 유도하였을 때, 핵성숙률에는 차이가 없었으며, 정자침투율은 각각 67, 55 및 50%로서 무첨가한 대조구 보다 첨가구가 좋지 않다는 Park 등(1996)의 보고와는 비교적 일치하는 결과였다. 그러나 SOD를 각각 0, 1, 10, 100 및 1,000units/ml을 첨가하여 성숙을 유기하고 체외수정을 시켰을 때, 10 및 100units/ml의 SOD 첨가구에서 유의적으로 높은 응성전핵형성률을 나타냈다

고 한 보고(Park 등, 1997)와는 상반되는 결과였다.

돼지 난포란을 체외성숙배양액인 0.9mM cysteine가 함유된 NCSU-23 배양액에 성숙을 유기한 후, 체외수정을 실시하고 NCSU-23 배양액에 각각 0, 100, 500 및 1,000units/ml의 SOD를 첨가하여 7일 동안 배발달을 유기한 결과는 Table 4 및 5와 같다. 배양 7일째 5% 및 20% 산소농도에 따른 처리구간 배반포발달률(25.7±1.6 vs 25.6±0.5%) 및

Table 5. Effects of O₂ with SOD concentrations on mean cell number of porcine blastocysts

Culture conditions		No. of blastocysts	No. of ICM cells (Mean±SE)	No. of TE cells (Mean±SE)	Total cell no. of blastocysts(Mean±SE)
O ₂ (%)	SOD (U)				
5	0	15	9.7±3.4 ^{ab}	35.6±4.8 ^{ab}	45.4±4.7 ^a
	100	16	10.5±0.9 ^a	34.1±7.5 ^{ab}	41.8±9.5 ^{ab}
	500	15	6.0±2.0 ^{bc}	27.7±3.3 ^{bc}	33.7±4.7 ^{bc}
	1,000	14	4.0±1.2 ^c	21.3±4.2 ^c	24.8±4.7 ^c
20	0	18	4.0±0.8 ^c	41.8±5.3 ^a	45.8±5.0 ^a
	100	20	4.8±1.2 ^c	28.2±5.7 ^{bc}	33.0±5.5 ^{bc}
	500	15	3.5±1.0 ^c	35.1±5.0 ^{ab}	38.6±5.0 ^{ab}
	1,000	14	3.5±0.9 ^c	25.8±4.8 ^{bc}	29.3±4.9 ^{bc}
Overall total or means					
5		60	7.4±1.2 ^A	29.6±2.5 ^A	36.9±3.0 ^A
20		67	3.9±0.5 ^B	31.8±2.7 ^A	35.8±2.6 ^A
	0	33	7.0±1.9 ^A	38.5±3.5 ^A	45.6±3.3 ^A
	100	36	6.9±1.0 ^A	30.4±4.4 ^B	37.3±4.7 ^B
	500	30	4.7±1.1 ^{BC}	31.6±3.1 ^B	36.3±3.4 ^B
	1,000	28	3.7±0.7 ^C	24.0±3.3 ^B	27.6±3.4 ^C

^{a,b,c} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ (P<0.05).

^{A,B,C} Main effect means within columns with different superscripts differ (P<0.05).

총세포수(36.9±3.0 vs 35.8±2.6개)는 유의차가 없었으며, SOD 농도별 배반포발달률은 각각 24.9, 29.6, 25.0 및 23.2%로서 100units/ml 처리구에서 유의적으로 높은 배반포 발달률을 나타냈으나, 총세포수에서는 처리구(27.6~37.3개)가 대조구(45.6개)보다 유의적(P<0.05)으로 낮은 결과를 나타내어 체외배발달에 SOD의 첨가는 효과가 없는 것으로 판단된다.

이와 같은 결과는 마우스에서 0 및 500units/ml의 SOD를 첨가하여 5% 및 20% 산소조건에서 배발달을 유도했을 경우에 오직 5% O₂의 500units/ml SOD 첨가군만이 2-cell block을 극복하고 배반포기로 발달하였다는 보고(Umaoka 등, 1992)와 1-세포기의 수정란을 mHTF 배양액에 5% 산소조건하에서 SOD를 각각 0, 10, 100 및 1,000units/ml, 20% 산소조건하에서는 각각 0, 10, 100units/ml를 첨가배양하였을 때 5% 산소조건의 처리구에서 100units/ml의 SOD 첨가군만이 배발달률에 효과

적이었으며, 총세포수의 증가는 없었고, 1,000 units/ml의 SOD는 오히려 해로운 영향을 미쳤다고 한 보고(Payne 등, 1992)와는 대체로 일치하는 결과였다. 또한, 마우스의 초기수정란을 HTF 배양액에 5000units/ml의 SOD를 첨가하여 배양하였을 때 5% 및 20% O₂ 조건은 모두 2-cell block 현상을 극복하지 못했다고 한 보고(Leege와 Sellens, 1991), 100units/ml의 SOD를 난세포질에 직접 microinjection 했을 때도 효과가 없다고 한 보고(Payne 등, 1992) 및 토끼 초기수정란에서 BSM II-PVP 배양액에 SOD 5,000units/ml의 첨가배양은 20% 산소조건하에서 해로운 역할을 수행한다고 한 보고(Lindenau와 Fischer, 1994) 등과도 일치하는 결과였다.

그러나, 토끼수정란을 배양시 0, 600, 1,200 및 2,400units/ml의 SOD첨가는 20% 산소조건하에서 600units/ml의 SOD첨가 군에서 유의적(P<0.05)으로 높은 배발달률 및 총세포수가 증가하는 결과를

나타냈다고 한 보고(Li 등, 1993) 및 소에서 양 등 (1997)이 초기 체외수정란을 CR1aa 배양액에 500 units/ml의 SOD 첨가배양은 대조구(45.1%)에 비하여 64.8%로서 유의적($P < 0.05$)으로 배반포기 발달률을 증가시켰다는 보고와는 상반되는 결과였다.

본 실험에서 기본배양액으로 사용한 NCSU-23 배양액에는 7mM의 taurine과 5mM의 hypotaurine이 함유되어 있는데, SOD는 수정란의 세포질내로 들어가지 못하기 때문에 체외배양시 항산화제로서의 그 효과가 한정되어 있지만, taurine과 hypotaurine은 난세포질내로 들어가서 직접 H_2O_2 등의 독성이 있는 분자와 반응함으로써 수정란을 보호하고, 20%의 산소조건하에서도 활성산소의 제거 역할을 하므로써 배발달을 증가시키며, 배양액중에서 세포독성을 갖는 금속이온들을 킬레이션하는 역할(chelating agent) 및 osmolyte로서 체외배양중 발생하는 여러 가지 부적절한 환경에 대응하여 배발달을 증가시킨다(Liu와 Foote, 1995; Li 등, 1993; Zgliczynski 등, 1977). 따라서, NCSU-23 배양액 자체에 이미 일정한 활성산소에 대한 방어능력이 갖추어져 있기 때문에, 본 실험에서는 돼지난포란의 체외성숙과 초기배발달에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타난 것으로 사료되는 바, 앞으로 위와 같은 물질이 배제된 배양액으로 다시 검토해볼 필요가 있는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 돼지 난포란의 체외성숙배양액에 superoxide dismutase(SOD)를 첨가배양하여 체외성숙과 수정이후 배발달에 미치는 영향과 산소농도 및 SOD가 체외생산된 돼지초기수정란의 배발달에 미치는 영향을 규명하고자 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 돼지 난포란을 체외성숙배양액인 NCSU-23에 SOD를 각각 0, 100, 500 및 1,000units/ml 첨가하여 성숙시킨 다음, 체외수정을 실시한 결과, 핵성숙률, 정자침입률, 다정자침입률 및 평균침입정자수는 처리구와 대조구간 유의적($P < 0.05$)인 차이가 인정되지 않았고, 응성전핵형성률은 처리구(90.9~81.2%)보다 오

히려 대조구(95.0%)가 유의적으로 높은 결과를 나타냈다($P < 0.05$).

2. 체외수정 후, 배발달배양액인 NCSU-23에 7일 동안 배양한 결과, 배반포형성률과 총세포수는 처리구가 대조구보다 유의적($P > 0.05$)으로 낮은 결과를 나타냈다.
3. 배발달배양액인 NCSU-23에 SOD를 각각 0, 100, 500 및 1,000units/ml을 첨가하고 5% 및 20% 산소조건하에서 7일동안 배발달을 유지한 결과, 배양 7일째 산소조건에 따른 처리구간 배반포형성률 및 총세포수는 유의차가 없었으며, SOD농도별 배반포형성률은 100 units/ml 처리구에서 0, 500 및 1,000units/ml 처리구 보다 유의적으로 높은 배반포형성률을 나타냈으나, 총세포수에서는 처리구(27.6~37.3개)가 대조구(45.6개)보다 유의적($P < 0.05$)으로 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 NCSU-23배양액에 SOD의 첨가는 돼지난포란의 체외성숙과 초기배발달에 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었으며, 5% 및 20% 산소농도에 따른 영향도 없는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
- Bishop DW. 1956. Oxygen concentrations in the rabbit genital tract. In *Proceeding of the 3rd International Congress of Animal reprod.* Cambridge, pp53-58.
- Carney EW and Foote RH. 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 89:543-551.
- Czapski G and Goldstein S. 1988. The uniqueness of superoxide dismutase(SOD)-why cannot must copper compounds substitute SOD *in*

- vivo*? Free Rad. Res. Commun., 4:225.
- Ding A and Chan PC. 1984. Singlet oxygen in copper-catalyzed lipid peroxidation in erythrocyte membranes. Lipids, 19:278-284.
- Dumoulin JCM, Evers JLH, Bras M, Pieters MHEC and Geraedts JPM. 1992. Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 94:373-380.
- Fradovich I. 1972. Superoxide radical and superoxide dismutase. Acct. Chem. Res., 5:321-326.
- Habor F and Weiss J. 1932. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. R. Soc. Lond. A., 147:332-351.
- Halliwell B. 1975. The superoxide dismutase activity of iron complexes. FEBS. Lett., 56:34-38.
- Johnson MH and Nasr-Esfahani MH. 1993. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? BioEssays, 16(1):31-38.
- Legge M and Sellens MH. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. Human Reprod., 6(6):867-871.
- Li J and Foote RH. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. J. Reprod. Fert., 98:163-167.
- Li J, Foote RH and Simkin M. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. Biol. Reprod., 48:33-37.
- Lindenau A and Fischer B. 1994. Effect of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured preimplantation rabbit embryos. Theriogenology, 41:889-898.
- Liu Z and Foote RH. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. Biol. Reprod., 53:786-790.
- Maas DHA, Storey BT and Mastroianni L. 1976. Oxygen tension in the oviduct of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Fertil. Steril., 27:1312-1317.
- Machaty Z, Day BN and Prather RS. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. Biol. Reprod., 59:451-455.
- Mastroianni L and Jones R. 1965. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. J. Reprod. Fert., 9:99-102.
- Noda Y, Matsumoto H and Mori T. 1989. Superoxide dismutase overcomes 2-cell block in mouse embryos. Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., 41:751-752.
- Park CK, Lee JH, Cheong HT, Yang BK and Kim CI. 1997. Effect of superoxide dismutase (SOD) on pronuclear formation of porcine oocytes fertilized *in vitro*. Theriogenology, 48:1137-1146.
- Park CK, Roy F and Sirard MA. 1996. The effect of free radicals and anti-oxidant during *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology, 45:275(abstr.).
- Payne SR, Munday R and Thompson JG. 1992. Addition of superoxide dismutase and catalase does not necessarily overcome Developmental Retardation of one-cell mouse embryos during *in vitro* culture. Reprod. Fertil. Dev., 4:167-174.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. J. Reprod. Fert., (suppl.) 48:61-73.
- Quinn P and Harlow GM. 1978. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. J. Exp. Zool., 206:73-80.
- Ribarov SR and Benov KC. 1981. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. Biochem. Biophys. Acta., 640:721-726.
- SAS Institute. 1996. SAS/STAT[®] user's guide,

- release 6.12 edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497.
- Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE and Tervit HR. 1990. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.*, 89:573-578.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K and Mori T. 1991. Developmental Potentiality of embryos cultured under low oxygen tension with superoxide dismutase. *J. in vitro Fert. Emb. Trans.*, 8:245-249.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K and Mori T. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:28-33.
- Walker SK, Heard TM and Seamark RF. 1992. *In vitro* culture of embryos without co-culture: Successes and perspectives. *Theriogenology*, 37:111-126.
- Winston NJ, Braude PR, Pickering SJ, George MA, Cant A, Currie J and Johnson MH. 1991. The incidence of abnormal morphology and nucleocytoplasmic ratios in 2-, 3- and 5-day human pre-embryos. *Human Reprod.*, 6:17-24.
- Wright RW jr. 1997. Successful culture *in vitro* of swine embryos to the blasto stage. *J. Anim. Sci.*, 44:854-858.
- Yang BK, Yang X and Foote RH. 1994. Early development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO₂ and O₂. *J. Reprod. Dev.*, 40:1-9.
- Zgliczynski JM, Selvaraj RJ, Paul BB, Stelmazynska T, Posiott PKF and Sbarrod AT. 1977. Chlorination by the myeloperoxidase- H₂O₂-Cl antimicrobial system at acid and neutral pH. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, 154:418-422.
- 양부근, 박동현, 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.

(접수일: 2001. 8. 27/ 채택일: 2001. 11. 15)