돼지 체외수정란의 체외발육에 있어 Melatonin과 Sodium Nitroprusside(SNP) 첨가 효과

장현용 · 오진영 · 김종택 · 박춘근 · 정희태 · 김정익 · 이학교[1] · 최강덕[2] · 양부근[†]
강원대학교 동물자원과학대학

초 록

본 연구는 돼지의 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 체외수정란의 체외배양 체계를 확립하고 그 기작을 규명하기 위하여 체외배양액에 항산화제인 melatonin의 첨가 및 melatonin과 sodium nitroprusside(SNP)의 첨가배양이 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다. NCSU 23 배양액에 melatonin을 0, 1, 5 및 10 nM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 배반포기까지 발육율은 17.8%, 26.1%, 20.0% 및 16.3%로서 melatonin 1 nM 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며($P<0.05$), 상실배기 이상 발육 성적에서도 melatonin 1 nM 첨가구가 39.1%로서 대조구 33.3%, 5 nM 첨가구의 33.3% 및 10 nM 첨가구의 27.9%보다 높은 발육율을 나타냈다($P<0.05$). NCSU 23 배양액에 SNP를 0, 50 및 100 μM을 첨가하여 체외 배양한 결과, 상실배 이상 발육성적은 각각 41.9%, 25.6% 및 28.4%로서 SNP 첨가구가 대조구보다 유의적으로 낮은 성적을 나타내었다($P<0.05$).

NCSU 23 배양액에 대조구, SNP 50 μM, SNP 50 μM에 melatonin 1, 5 및 10nM을 혼합첨가하여 체외발육율을 조사한 결과, 배반포기 발육율은 각각 2.5%, 1.2%, 9.9%, 5.1% 및 3.7%로서 SNP 50μM + Mel. 1nM 첨가구가 여타구 보다 높은 성적을 나타냈으며, 상실배기 이상 체외 발육율은 31.3%, 34.1%, 39.5%, 29.4% 및 39.5%로서 SNP 50 μM + Mel. 1 nM 첨가구와 SNP 50 μM + Mel. 10 nM 첨가구가 여타구보다 높은 발육율을 나타냈다. 모든 처리구에서 배반포까지 발육된 체외수정란의 세포수는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

(주제어 : Porcine embryo, Melatonin, Sodium nitroprusside(SNP), NCSU 23 medium)

서 론

초기배 수정란의 발육억제 현상은 genome 활성화와 체외배양 동안 유해한 산소를 함유한 free radical과 nitric oxide(NO)와 같은 수정란의 발육에 독성을 제공하는 인자 등에 의하여 일어난다는 연구결과가 보고되고 있으나 (Corsby 등, 1988 ; Joenje, 1989), 초기배 수정란의 체외 발육 억제 현상의 원인은 명확하게 규명되어 있지는 않은 실정이다.

최근에 NO는 생식기관의 여러 종류의 세포들, 즉 mononucleate phagocytes, endothelial cell, smooth muscle cells, firbroblsat 등에서 생성되어, 다양하고도 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 체외에서 세포 배양시 NO를 유발하는 물질로는 L-arginine, S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), sodium nitroprusside (SNP), streptozotocin 및 Tetrahydrobiopterin (THB) 등이 있고, 유발된 NO의 scavenger로는 ebselen과 hemoglobin 등이 있으며 NO inhibitor로는 L^G-nitro-L-arginine (L-NA)과 L-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)등과 여러 항산화제로서 aescultin, β-mercaptoehanol 등이 있다.

세포 내에서 NO의 생성을 유도하는 물질인 sodium nitroprusside(SNP)을 이용하여 인간의 정액을 체외에서 처리하였을 때, 고농도(0.3~1 mM)에서는 정자의 운동성이 감소되었고, 생식기 염증 또는 손상되었을 때 백혈구와 대식세포의 수가 증가하여 NO가 다량 생성되며, 증가된 NO가 생식기능에 악영향을 준다는 연구 결과도 보고되었다 (Baratt 등, 1990 ; Marinella 등, 1995 ; Nussler와 Biliar, 1993). 또한 NO는 세포독성물질인 peroxynitrite로 대사되어 난소에서 세포와 세포 사이의 상호작용에 의한 세포독성의 매개체 역할을 하는 것에 대한 연구가 진행된 (Ellmam 등, 1993) 이후, 퇴화 난포의 세포 내에는 DNA 분절이 나타나는데 이런 현상은 NO가 세포의 핵에서 DNA 분절을 일으켜 apoptosis를 유도하기 때문이다(Bonello 등, 1996 ; Hsueh 등, 1994).

Melatonin은 항산화제로서 강력한 free radical의 분해원

* This research was supported by grant (code M102KL01001-03K1201-02720) from Stem Cell Research Center of the 21st Century Frontier Program funded by the Ministry of Science and Technology, Republic of Korea.

[1] 한경대학교 생명공학과(Department of Genomic Engineering, Genomic Informatics Center, Hankyong National University)

[2] 한경대학교 생물정보통신전문대학원(The Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University)

[†] Corresponding author : College of Animal Resources Science, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon-Do, 200-701, Korea, TEL: 033-250-8623, E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

으로 역할이 큰 것으로 보고되고 있고(Okatani 등, 1997 ; Poeggeler 등, 1993a, b), reactive oxygne species(ROS) scavenger의 역할을 통해 초기 수정란의 발달과 수정에 영향을 주는 것으로 보고되었다 (Reiter, 1998 ; Reiter 등, 1993, 1995). 또한 체내나 체외의 다양한 세포배양 실험에서 melatonin의 첨가는 독성이 존재하지 않거나, 낮은 독성을 가지고 있으며(Reiter, 1998), melatonin은 mouse의 수정란 체외발육을 증진시키는 것으로 나타났으나(Ishizuka 등, 2000), 체외수정란에 있어 melatonin의 항산화제로서의 작용이 명확히 규명되어 있지 않은 실정이다.

본 연구는 돼지 체외수정란의 체외배양 체계에 있어 melatonin의 항산화 효과를 규명하기 위하여 체외배양액에 melatonin의 효과와 sodium nitroprusside(SNP)의 첨가 및 melatonin과 SNP의 혼합첨가가 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

난포란의 채취, 체외성숙, 체외수정 및 배반포 수정란의 세포수 조사

난포란의 체외성숙배양, 체외수정, 배반포 수정란의 세포수 조사는 "돼지 체외수정란의 체외발육에 있어 항산화제의 효과"의 실험방법에 준하여 실시하였다.

체외수정란의 체외배양

체외수정 후 40~44시간에 생산된 정상적으로 분할된 2~8세포기 체외수정란 만을 선별하여 돼지 난포액과 L-cysteine이 함유되지 않고 BSA가 첨가된 체외배양액인 NCSU 23 배양액에 적정농도의 항산화제인 melatonin 및 nitric oxide donor인 SNP를 첨가하여 6~8일 동안 배양하여 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 조사하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS@8.1 package/PC를 이용하여 분석하였고, Duncan의 다중법위 검정방법을 실시하여 처리간 유의성을 검토하였다.

결 과

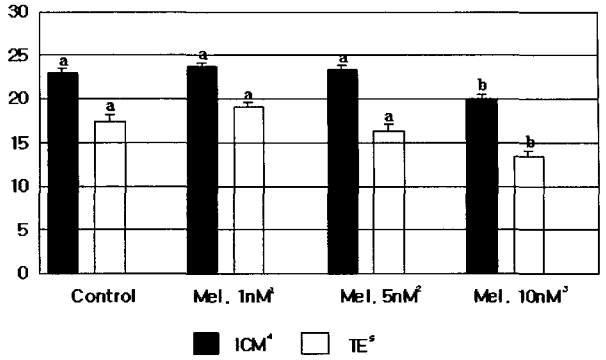

Fig. 1. Number of inner cell mass and trophectoderm cell of porcine *IVM/IVF* embryos cultured in NCSU 23 containing different concentration of melatonin. [a,b] Values with different superscripts are significantly differ, $P<0.05$. [1] Mel. 1nM : melatonin 1nM, [2] Mel. 1nM : melatonin 5 nM, [3] Mel. 1nM : melatonin 10 nM, [4] ICM : inner cell mass, [5] TE : trophectoderm cell.

체외배양액인 NCSU 23에 각각 다른 농도의 melatonin을 첨가하여 체외수정란을 5~6일간 체외 배양하여 얻은 체외발육성적과 배반포 수정란의 세포수를 Table 1 및 Fig. 1에 요약하였다.

Table 1의 결과에서 나타난 바와 같이 NCSU 23 배양액에 melatonin을 0, 1, 5 및 10 nM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 배반포기 까지 발육된 체외 발육성적은 17.8 %, 26.1%, 20.0% 및 16.3%로서 melatonin 1 nM 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며($P<0.05$), 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적에서는 melatonin 1 nM 첨가구가 39.1%로서 대조구 33.3%, 5 nM 첨가구의 33.3% 및 10nM 첨가구의 27.9%보다 높은 발육율을 나타냈다($P<0.05$).

Fig. 1은 2~8세포기 체외수정란을 6~8일 동안 체외 배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수를 요약한 결과로서, NCSU 23 체외배양에 melatonin을 0, 1, 5 및 10 nM을 첨가하였을 때 내세포괴의 세포수(ICM)는 각각 23.0±0.5, 23.6±0.6, 23.3±1.1 및 20.0±0.5였으며, 영양배엽 세포수(TE)는 각각 17.3±0.8, 19.0±0.5, 16.3±0.8 및 13.3±0.8로서 대조구, melatonin 1nM과 5nM 처리구가 melatonin 10 nM 처리구보다 통계적으로 유의적하게 높은 성적을 얻었다($P<0.05$).

돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 NCSU 23 배양액에 Nitric oxide donor인 sodium nitro-

Table 1. Effects of melatonin on the development of porcine *IVM/IVF* embryos

Melatonin (nM)	No. of *IVM/IVF* embryos	No. of embryos developed to(%);			Morulae plus blastocysts (%)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	45	30(66.7)	7(15.6)[a]	8(17.8)[b]	15(33.3)[b]
1	46	28(60.9)	6(13.0)[a]	12(26.1)[a]	18(39.1)[a]
5	45	30(66.7)	6(13.3)[a]	9(20.0)[b]	15(33.3)[b]
10	43	31(72.1)	5(11.6)[a]	7(16.3)[b]	12(27.9)[bc]

[a,b,c] Values with different superscripts within columns are significantly differ, $P<0.05$.

Table 2. Effects of SNP on *in vitro* development of porcine *IVM/IVF* embryos

SNP (μM)	No. of *IVM/IVF* embryos	No. of embryos developed to(%);				Morulae plus blastocysts (%)
		≤ 4 cell	≤ 16 cell	Morulae	Blastocysts	
0	124	20(16.1)[b]	52(41.9)	30(24.2)	22(17.7)[a]	52(41.9)[a]
50	117	28(23.9)[ab]	59(50.4)	28(23.9)	2(1.7)[b]	30(25.6)[b]
100	127	35(27.5)[a]	56(44.1)	35(27.5)	1(0.8)[b]	36(28.4)[b]

[a,b] Values with different superscripts within columns are significantly differ, $P<0.05$.

Table 3. The combine effects of SNP plus Melatonin on *in vitro* development of porcine *IVM/IVF* embryos

Treatments	No. of *IVM/IVF* embryos	No. of embryos developed to(%);				Morulae plus blastocysts (%)
		≤4 cell	≤16 cell	Morulae	Blastocysts	
0	80	14(17.5)	41(51.2)	23(28.8)[ab]	2(2.5)[c]	25(31.3)[bc]
SNP50 μM	82	18(21.9)	36(43.9)	27(32.9)[ab]	1(1.2)[ab]	28(34.1)[abc]
SNP50μM + Mel. 1nM	81	13(16.4)	36(44.4)	24(29.6)[ab]	8(9.9)[a]	32(39.5)[a]
SNP50μM + Mel5. nM	78	14(17.9)	41(52.5)	19(24.3)[b]	4(5.1)[abc]	23(29.4)[c]
SNP50μM + Mel. 10nM	81	15(18.5)	34(41.9)	29(35.8)[a]	3(3.7)[bc]	32(39.5)[a]

[a,b,c] Values with different superscripts within columns are significantly differ, $P<0.05$.

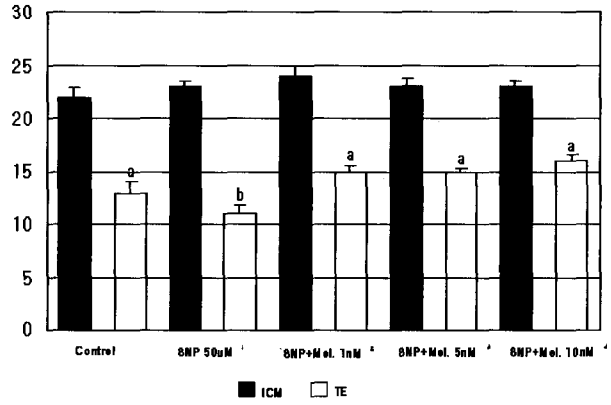

Fig. 2. Number of inner cell mass and trophectoderm cell of porcine IVM/IVF embryos. [a,b] Values with different superscripts within columns are significantly differ, $P<0.05$. [1] SNP 50 nM : sodium nitroprusside 50 uM, [2] SNP + Mel. 1 nM : sodium nitroprusside 50 uM + melatonin 1 nM, [3] SNP + Mel. 5 nM : sodium nitroprusside 50 uM + melatonin 5 nM, [4] SNP + Mel. 10 nM : sodium nitroprusside 50 uM + melatonin 10 nM.

prusside(SNP)를 첨가 및 NCSU 23에 SNP와 melatonin을 혼합처리하여 체외발육시킨 후 생산된 체외수정란의 체외발육 성적과 배반포 수정란의 세포수를 Table 2와 3 및 Fig. 2에 요약하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이 NCSU 23 배양액에 SNP를 0, 50 및 100 μM을 첨가하여 체외 배양한 결과, 상실배 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 41.9%, 25.6% 및 28.4%로서 SNP 첨가구가 대조구보다 유의적으로 낮은 성적을 나타내었다($P<0.05$).

Table 3은 NCSU 23 배양액에 대조구, SNP 50 μM, SNP 50 μM에 melatonin 1, 5 및 10 nM을 혼합 첨가하여 체외발육육을 조사한 결과, 배반포기 발육율은 대조구, SNP 50 μM첨가구, SNP 50 μM + Mel. 1 nM, SNP 50 μM + Mel. 5nM 및 SNP 50 μM + Mel. 10 nM 첨가구에서 각각 2.5%, 1.2%, 9.9%, 5.1% 및 3.7%로서 SNP 50 μM + Mel. 1 nM 첨가구가 여타구보다 높은 성적을 나타냈으며, 상실배기 이상 체외 발육율은 31.3%, 34.1%, 39.5%, 29.4% 및 39.5%로서 SNP 50 μM + Mel. 1 nM 첨가구와 SNP 50 μM + Mel. 10 nM 첨가구가 여타구보다 높은 발육율을 나타내었다.

Fig. 2는 2~8세포기 체외 수정란을 6~8일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 내세포괴 세포수는 각각 22.6±0.8, 23.0±0.5, 24.0±1.1, 23.6±0.8 및 23.0±0.5로 나타났으며, 영양배엽 세포수는 13.6±1.2, 11.6±0.8, 15.0±0.5, 15.3±0.3 및 16.0±0.5로 나타나, 영양배엽 세포수에서는 SNP 50 μM 첨가구가 다른 처리구에 비해 낮은 세포수를 나타냈고($P<0.05$), 배반포기 수정란의 총 세포수는 각각 36.3±2.0, 34.6±1.4, 39.0±1.0, 39.0±0.5 및 39.0±0.5로서 처리구간의 유의성은 나타나지 않았지만($P>0.05$), SNP 50 μM

첨가구가 여타구보다 낮은 세포수를 나타냈다.

고 찰

본 연구는 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 체외배양액에 항산화제인 melatonin을 첨가하여 항산화 효과를 검토하였고, melatonin과 nitric oxide donor인 SNP를 혼합 첨가하여 상호 공동 효과를 검사하였다.

Melatonin은 포유동물 수정란의 체외발달에서 세포의 분열과 세포주기에 영향을 주는 것으로 보고되었으며, 또한 포유동물 수정란의 체외 배양시 melatonin 첨가는 수정란의 체외 발육율을 증진시켜 ROS scavenger로서의 역할이 간접적으로 입증되었다(Okatani 등, 1997 ; Poeggeler 등, 1993 a,b ; Reiter 등, 1993, 1995). Melatonin의 낮은 농도는 mouse 수정란의 체외배양에서 독성이 없으며(Ishizuka 등, 2000), 생쥐 수정란에 melatonin(10^{-8} M)의 첨가배양은 4 세포기에서 배반포 발달율을 증가시켰지만, 2 세포기 단계의 수정란에서는 영향을 주지 않는다고 보고하였고, melatonin의 10^{-6}M의 첨가에서는 모든 발육단계의 체외 발육율을 증가시켰다(Ishizuka 등, 2000). 또한 연구에 의하면 lipopolysaccharide(LPS)를 통한 동물 패혈증 모델에서 melatonin의 투여가 TNF-α, IL-1β, INF-γ와 같은 혈중 사이토카인 변화에는 영향이 없으며, 패혈증에서 중요한 역할을 하는 유리 산소기의 하나인 nitric oxide의 생산을 억제한다고 한다(Maestroni, 1996).

본 연구에서는 돼지 체외수정란의 체외 배양에 있어 체외 배양액에 melatonin을 0, 1, 5 및 10 nM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 배반포기 까지 발육된 체외 발육성적은 melatonin 1 nM 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며($P<0.05$), 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적에서는 melatonin 1 nM 첨가구가 대조구, 5 nM 첨가구 및 10 nM 첨가구보다 높은 발육율을 나타냈다. 본 실험의 결과는 Ishizuka 등(2000)의 결과와 일치하는 경향을 보여 melatonin이 돼지 체외 수정란의 체외 배양시 항산화제로서 작용하는 것이 간접적으로 증명되었다.

SNP는 NO을 생성시키며 NO 자체보다 반감기가 긴 안정된 물질이다. 또한 superoxide anion이 NO와 반응하여 peroxy nitrite($ONOO^-$)를 형성하여 NO의 세포독성을 증가시킬 뿐 아니라 hyrogen peroxide 역시 NO와 반응하여 NO의 종양억제 능력을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Ischiropoulos 등, 1992 a,b). 세포 내에서 NO의 생성을 유도하는 물질인 SNP을 이용하여 인간의 정액을 체외에서 처리할 때 고농도(0.3~1 mM)에서는 정자의 운동성이 감소되었으나, 저농도(0.1 mM 이하)에서는 정자의 운동성 및 생존력에 영향을 받지 않는다는 연구결과가 보고되었고(Zini 등, 1995), 반면에 냉동정자를 해동시키는 과정에서 NO를 처리하는 경우 reactive oxygen species라는 독성물질을 중화시켜 lipid peroxidation에 의한 세포막 손상으로부터 보호하는 역할을 하여 정자의 생존력을 연장시킨다고 보고하였다(Helstrom 등, 1994). Lim 등(1998, 1999)은 소 체외수정란의 체외 배양시 SNP의 첨가는 소 체외수정란의 체외 발육율을 저하시키는 결과를 얻었다고 보고하였다.

본 실험의 결과 NCSU 23 배양액에 NO donor인 SNP를 0, 50 및 100 μM을 첨가, 체외 배양한 처리구에서 상실배 이상 발육된 체외발육 성적은 SNP 첨가구가 대조구보다 유의적으로 낮은 성적을 나타내었고($P<0.05$), NCSU 23 배양액에 0, SNP 50 μM, SNP 50 μM에 melatonin 1, 5 및 10 nM을 혼합첨가하여 체외발육육을 조사한 결과, 배반포기 발육율은 SNP 50 μM + Mel. 1 nM 첨가구가 여타구 보다 높은 성적을 나타냈으며($P<0.05$), 상실배기 이상 체외 발육율은 SNP 50 μM + Mel. 1 nM 첨가구와 SNP 50 μM + Mel. 10 nM 첨가구가 여타구보다 높은 발육율을 나타내었다

본 실험의 결과로 볼 때 돼지 체외수정란의 체외 배양시 SNP의 첨가 배양은 체외배양액에 NO를 생성하여 체외 발육율이 저하되는 것으로 나타났고, SNP와 melatonin의 혼합첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육을 향상시키는 것으로서 melatoin이 돼지체외수정란의 체외발육에 있어 항산화제로서의 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Cosby, I.M., Gandolfi, F. and Moor, R.M. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. J. Reprod. Fertil. 82:769-775.
2. Fukuda, A., Hubbard, T.E. and Breuel, L.F. 1996. Production of nitric oxide fro mouse embryo and effect of nitrite on mouse embryonic development *in vitro*. Biol. Reprod. 54: 173(abstr).
3. Helstrom, W.J., Bells., M., Wang, R. and Sikka, S.C. 1994. Effect if sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. Fertil. Steril. 61: 1117-1122.
4. Ischiropolous, H., Zhu, L. and Beckman, J.S. 1992a. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric ocide. Arch. Bichem. Biophy. 298:446-451.
5. Ischiropolous, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D. and Beckman, J.S. 1992b. Peroxynitrite-mediated tyrosin nitration catalyzed by superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophys. 298: 431-437.
6. Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A. and Itoh, M.T. 2000. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. J. Pineal. Res. 28:48-51.
7. Joenje, H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. Mut. Res. 291:193-208.
8. Lim, J.M. and Hansel, W. 1998. Improved development of *in vitro*-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scanvenger in a cumulus-granulosa cell coculture system. Mol. Reprod. Dev. 50:45-53.
9. Lim, J.M., Mei, Y., Chen, B., Gododke, R.A. and Hansel, W. 1999. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-coculture system. Theriogenology 51:941-949.
10. Maestroni, G.J.M. 1996. Melatonin as a therapeutic

agent in experimental endotoxic shock. J. Pineal. Res. 20:84.
11. Moncada, S., Palmer, R.M.G. and Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide : physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43:109-142.
12. Okatani, Y., Watanabe, K., Wakatuki, A. and Sagara, Y. 1997. Melatonin inhibits vasopastic action of hydrogen peroxide in human umbilical artery. J. Pineal Res. 22:163-168.
13. Poeggeler, B., Tan, D.X., Reiter, R.J., Chen, L.D., Chen, S., Manchester, L.C. and Barlow-Walden, L.R. 1993a. Cancer. Lett. 70:65-71.
14. Poeggeler, B., Reiter, R.J., TAN, D.X., Dhen, L.D. and Manchester, L.C. 1993b. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and againg : A hypothesis. J. Pineal Res. 14:151-168.
15. Reiter, R.J. 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. Prog. Neurobiol. 56:359-384.
16. Reiter, R.J., Poeggeler, B., TAN, D.X., Dhen, L.D. and Manchester, L.C. and Guerrero, J.M. 1993. Antioxidant activity of melatonin : A Novel action not requiring a receptor. Neuroendocrinol. Lett. 15: 103-116.
17. Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G. and Acuna-Castroviejo, D. 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. J. Pineal Res. 18:1-11.
18. Zini, A., Lamirande, E.C. and Gangon, C. 1995. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation *in vitro*. J. Androl., 16:424-431.

(접수일자: 2004. 3. 15. / 채택일자: 2004. 6. 18.)

The Effects of Melatonin and Sodium Nitroprusside (SNP) on Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Jang, H. Y., J. Y. Oh, J. T. Kim, C. K. Park, H. T. Cheong, C. I. Kim, H. K. Lee, K. D. Choi and B. K. Yang

College of Animal Resources Science, Kangwon National University

ABSTRACT

The objective of this study was performed to establish the *in vitro* culture system of porcine *in vitro* maturation and in vitro fertilization(IVM/IVF) embryo. These studies was to determine the effects of melatonin, nitric oxide donor(SNP), and the combination effects of SNP and melatonin in porcine IVM/IVF embryos. In routine porcine IVM/IVF procedure, oocytes were cultured for 40~44h incubation, and the zygotes were cultured for 40~44h in NCSU 23 medium. Then 2 to 8 cell embryos were removed cumulus cell and were allotted randomly to NCSU 23 containing different concentration of melatonin, SNP and SNP plus melatonin in 5% O_2, 5% CO_2 and 90% N_2 at 38.5℃. Cell numbers of blastocyst were also counted using double fluorescence stain method. In NCSU 23 medium treated with melatonin 0, 1, 5 and 10 nM, the developmental rate of morula plus blastocysts were 33.3%, 39.1%, 33.3% and 27.9%, respectivly. This result show that the developmental rate of morula and blascytocys treated with 1 nM melatonin was higher than in any other groups($P<0.05$). The developmental rates of morula plus blastocysts were 41.9% in 0 uM SNP, 25.6% in 50 uM and 28.4% in 100 uM, respectively. The developmental rate of morula plus blastocysts were decreased treated with SNP in NCSU 23. In combined effects of SNP plus melatonin (0, SNP 50 uM, SNP 50 uM plus melatonin 1 nM , SNP 50 uM plus melatonin 5 nM and SNP 50 uM plus melatonin 10 nM), the developmental rates beyond morula stage of porcine embryos were 31.3%, 34.1%, 39.5%, 29.4% and 39.5%, respectively. The addition of SNP 50 uM plus maltonin 1 nM , developmental rates of blastocyst was higher rate than in any other groups. Cell numbers of blastocyst in NCSU 23 treated with melatonin 0, 1, 5 and 10 nM were 41.0, 42.6, 39.6 and 33.0, respectively. In combined effects of SNP plus melatonin (0, SNP 50 uM, SNP 50 uM plus melatonin 1 nM , SNP 50 uM plus melatonin 5 nM and SNP 50 uM plus melatonin 10 nM), cell numbers of developed blastocyst were 36.3, 34.6, 39.0, 39.9 and 39.0, respectively. These result show that the cell numbers of blastocyst treated with 0, 1 and 5 nM melatonin were higher than in 10 nM group($P<0.05$), but cell numbers of blatocyst produced by SNP plus melatonin were not significantly difference in all experimental groups.

(Key words : Porcine embryo, Melatonin, Sodium nitroprusside(SNP), NCSU 23 medium)