

돼지 난포란으로부터 체외수정란의 생산에 있어서 항산화제의 첨가가 배 발달에 미치는 효과

박향¹ · 김재영¹ · 김자영¹ · 이정형² · 박흥대 · 김재명^{2,†}
대구대학교 식품·생명·화학공학부

Effect of Antioxidants for Porcine Oocytes during *In Vitro* Maturation, Fertilization and Development

H. Park¹, J. Y. Kim¹, J. Y. Kim¹, J. H. Lee², H. D. Park and J. M. Kim^{2,†}

Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Daegu University

SUMMARY

In recent years, an increasing number of studies on pig *in vitro* maturation(IVM) and *in vitro* fertilization(IVF) have been separated. the wide range of new technologies, including that in applied molecular genetics, has increased this interest. the production of viable porcine embryos *in vitro* is a prerequisites for the successful production of transgenic pigs to date. The efficiency of IVM/IVF techniques in the porcine is lower than that obtained in other species such as cattle and mouse. The several problems are generally thought to be the cause of poor results: the low rate of MPN formation derived from inadequate IVM of oocytes, the high incidence of polyspermy after IVF and cell blocking at 4 cell during embryos culture.

For there reasons overcoming, many studies have been conducted to improve *in vitro* embryogenic competence of oocytes. In the last several years, many maturation culture media have been evaluated and various exogenous factors such as hormones and grows factors have been tested to improve the efficiency of porcine *in vitro* system. In the study several antioxidants have been examined to improve *in vitro* fertilization and development of porcine oocytes.

In this study, several antioxidants were examined to determine the effects on the development of oocytes to the cleavage, morula and blastocyst stage when added at the maturation(IVM) or *in vitro* fertilization(IVF) or *in vitro* culture(IVC) of porcine embryos. Porcine oocytes were matured, fertilized and embryos were cultured in defind conditioned medium *in vitro* with or without supplementation with the antioxidants of cysteine, catalase and glutathione.

1. Significant improvement of blastocyst rate (27.2% versus 15.4%, $p<0.05$) were achieved when catalase(500U/ml) were added to TCM-199 medium and morula rate(72.0% versus 53.9%, $p<0.05$) were significantly higher when glutathione(1.0mM/ml) were added to TCM-199 medium than those of control.
2. In mTBM medium for oocytes fertilization, the addition of cysteine, catalase and glutathione had no positive effect on embryonic development.

¹ 차병원 여성의학연구소 불임의학연구소(Infertility Medical Center of CHA General Hospital)

² 포천중문의과대학교 (College of Medicine, Pochon CHA University)

[†] Correspondence : E-mail : dangi2359@hanmail.net

3. In NCSU-23 medium for embryos culture, the addition of cysteine, catalase and glutathione had no positive effect on embryonic development.

In conclusion, this study shows that addition of catalase, glutathione during IVM improved the rate of porcine embryo development.

(Key words : porcine embryos, culture system, sperm, antioxidant, cysteine, catalase, glutathione(GSH))

서 론

포유동물 난자는 체내 발생과정 중 어느 정도의 free radical과 기타 활성산소 및 과산화물을 생성하고 있으며, 난자의 세포질내에는 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화 물질도 존재하여 유해물질로부터 난자 스스로를 보호하고 있다. 그러나 이와 같은 활성산소로부터 난자내 방어에 이상이 야기되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 야기된다. 체내의 산소농도는 3~9% 존재하지만(Mastrianni 등, 1965), 일반적으로 난자를 체외배양할 경우 산소는 20%의 고농도로(Fowler 등, 1978) 공급하기 때문에 많은 free radical이 생성된다(Liu 등, 1995; Nasr-Esfahani 등, 1990). 이로 인해 발생된 많은 활성산소는 세포내 악영향을 미치게 되어 난자의 수정능력 및 배 발달을 저해시킨다고 한다(Lamirande E 등, 1997; Nasr-Esfahani 등, 1990). 또한 생식세포에 있어서 활성산소는 정자와 난자의 융합(fusion)을 억제할 뿐만 아니라(Aitken 등, 1993) 미토콘드리아의 dysfunction, DNA, RNA 및 단백질 손상(Comporti, 1989)등을 초래하여 배 발생을 억제시키는 물질로서, 체외배양란을 산화적 스트레스로부터 보호하기 위하여 이와 같은 free radical을 소거할 수 있는 화합물 또는 과산화물 생성 억제물질로서 SOD 또는 catalase등과 같은 항산화제를 배양액에 첨가하여 배양하는 연구가 시도되고 있다(Ali 등, 2003). Free radical은 산소원자나 분자에 부대전자가 존재하는 활성산소(reactive oxygen)로서, 생체내에서 생성되는 free radical의 종류는 초산화 음이온(superoxide anion, O_2^-), 과산화수소

(hydrogen peroxide, H_2O_2), single oxygen($-O_2$), triplet oxygen($3O_2$) 및 peroxy radical(ROO^-) 등이 있다(Sign, 1989). 이러한 활성산소에 의한 산화적 스트레스로부터 난자를 보호하기 위해 radical 생성을 미연에 방지하는 예방적 항산화제(preventive antioxidant)와, 이미 생성된 radical을 빠르게 소거하는 연쇄절단형 항산화제(chain-breaking antioxidant)가 있으며, 전자에는 SOD, catalase, peroxidase 등과 같은 효소류가 있으며, 후자에는 xanthine oxidase 저해제, 금속 chelator 등이 있다. 이것들 중 과산화물결인 superoxide anion(O_2^-)은 SOD에 의해 H_2O_2 로 전환되며, 이 활성산소는 catalase 또는 glutathione peroxidase에 의해서 제거된다(Comporti, 1989). 그러나 실제 배양액내 이와 같은 항산화제의 첨가효과에 대해서는 연구자에 따라 품종간의 서로 다른 결과를 보고하였다. 예를 들면 생쥐(Nonogaki 등, 1991; Nonogaki 등, 1992)나 토끼(Lim 등, 1996) 난자의 체외배양 시 배 발달에 항산화제의 첨가가 효과적이었다는 반면, 소(Liu 등, 1995; Luvoni 등, 1996; Lequarre 등, 2001) 난자의 체외발생에는 어떤 효과도 없었다고 하였다. 한편 항산화물질로서 glutathione은 정자와 난자내에 존재하는 물질로서, 난포란의 체외성숙이 진행됨에 따라 그 수치는 증가하지만, 체외성숙된 난포란보다 수정된 전핵기의 수정란에서 더욱 증가하며, 이것은 햄스터(Perreault 등, 1988), 생쥐(Calvin 등, 1986), 돼지(Yoshida, 1993)의 수정란에서 확인되었다. 특히 Abeydeer 등(1998)에 의하면 돼지 난포란의 glutathione의 수치는 수정난자의 생존력과 관련하여 생화학적 marker로 중요한 역할을 지닌다고 하였다. 그러나 Jeong과 Yang(2001)의 보고에 의하면 glutathione은 난포란의 체외수정시의 조건에 따라 그 후 배 발생에 영향을 미친다고 한다. 즉 체외수정시 정자 수정능획득의 경우에만

glutathione을 처리하였던 것이 체외수정 배양액내에 첨가하였던 것보다 그 후 배반포로의 배 발생율이 상승하였으며, 또한 Yoshida 등(1993)과 Boquest 등(1999)에 의하면 체외수정 배양액내에 고농도의 glutathione 첨가군은 저농도의 glutathione 첨가군보다 초기 배 및 배반포로의 발달률을 저하시킨다고 하였다. 한편 glutathione의 전구물질인 cysteine은 체외배양에 많이 이용되고 있으며, 체외성숙된 돼지 난포란의 체외수정시 정자 핵응축(sperminuclear decondensation)에 중요한 역할을 한다고 하였다(Yoshida, 1993). Matos 등 (1997)과 Ali 등 (2003)에 의하면 체외성숙과 배양에 있어 cysteine을 첨가하였을 때 소 난자의 상실배와 포배기로의 발달율을 높였다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 돼지 난포란의 체외성숙과 수정 및 배양시 각 배양액내에 항산화제를 첨가하여 배양하였을 때 배 발달에 미치는 영향을 검토하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 배 지

본 연구를 위하여 사용된 배양액의 조성은 Table 1과 같다. 미성숙 난포란의 회수용 배양액은 10mM HEPES(N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid : Sigma, H-0763)와 3.0mg/ml BSA(bovine serum albumin: Sigma, A-6003)가 첨가된 TL-HEPES(HEPES buffered Tyrode's medium) 용액이며, 체외성숙용 배양액은 25mM HEPES, 0.22mg/ml pyruvate(Sigma, P-2256), 10% human follicle fluid(hFF), 1 μ g/ml follicle stimulating hormone(Sigma, F-8174), 10ng/ml epidermal growth factor(Sigma, E-4127), 1 μ g/ml β -estradiol(Sigma, E-2758), 1.0mM cysteine(Sigma, C-7352)이 첨가된 TCM199(Gibco, 12340-030) 용액이다. 체외성숙된 난포란의 체외수정용 배양액은 1.0mg/ml BSA와 1mM caffeine(Sigma, C-4144)이 첨가된 mTBM 용액이다. 정자처리용 배양액은 1.0mg/ml BSA가 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS: Gibco, 14287-080) 용액이다. 수정된 배의 체외배양용 배양액은 4.0mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23

용액이다. 각각의 배양액은 0.22 μ m millipore filter로 여과한 후 분주하여 4 $^{\circ}$ C에 냉장보관하였으며, 각각 약 2주간 사용하였다. 실험에 제공되는 배양액은 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 이상 전 배양을 실시하여 사용하였다.

2. 공시 난포란의 회수 및 체외성숙

본 실험에 공시된 돼지 난소는 경북 경산시 대평동에 소재한 경신산업에서 도축된 암돼지로부터 적출하여 25~30 $^{\circ}$ C의 25mg/ml gentamycin(Gibco, 15750-011)이 첨가된 0.9% 생리식염수가 들어 있는 보온병에 담아, 도축 후 1~2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 2~3회 세척하여 난소에 존재하는 이물질을 제거한 후, 18gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기를 이용하여 직경 3~6mm 난포액을 흡입함으로써 난포란을 회수하였다. 회수된 난포액은 15ml 원심분리관에 일정시간동안 정치시켜 하강을 유도한 후 상층액을 제거하고 일정량의 배양액과 희석하였다. 실제 현미경하에서 난구세포가 치밀하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 TL-HEPES로 2~3회 세척 후 체외성숙에 사용하였다.

선별된 난포란을 TCM-199 용액으로 2~3회 세척한 후 500 μ 씩 분주된 4well dish(NUNC, 176740)의 각 소적당 50개의 난포란을 적하시켜 5% CO₂, 39 $^{\circ}$ C 배양기에서 44시간동안 배양시킴으로써 난포란의 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

1) 정자처리

본 실험에 사용된 정액은 액상정액으로 다비 A·I CENTER(충남 충주시 노은면 소재)에서 제작된 희석정액을 이용하였으며, 17 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관하여 3일 동안 사용하였다. 정액처리는 15ml 원심분리관(Falcon, 2097)에 각각 1ml씩의 90% percoll과 45% percoll이 섞이지 않게 작성한 후 상층부에 정액을 조심스레 넣고 500 \times g에서 20분간 원심분리 후 상층액은 버리고 하층부의 정자괴만을 회수하였다. 회수한 정자괴를 DPBS 용액으로 희석한 후 500 \times g로 5분간 원심분리를 2회 실시·세척하

여 mTBM 용액으로 5×10^5 cells/ml의 농도로 희석한 후 체외수정에 이용하였다.

2) 체외수정

체외성숙 유도 후 형태적으로 난구세포가 확장된 난포란만을 선별하여 0.1% hyaluronidase(Sigma, H-3506)가 첨가된 TL-HEPES 용액에 일정시간 배양한 후 pipetting으로 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자는 신선 mTBM 용액으로 3회 이상 세척한 후 체외수정에 공시하였다.

체외수정은 난자 동결시 사용하는 0.25ml의 plastic straw(IMV, 5565)를 이용하여 Yong-Hai 등(2003)의 방법에 준하여 행하였다(Fig. 1). 즉 Fig. 1에서 보는 바와 같이 먼저 각각 1cm씩 oil과 air를 차례로 흡입하고 준비된 정자를 1cm 흡입 (최종정자농도 1×10^5 cell/ml)한 다음 체외수정 용액을 5cm 흡입하고 그 끝 부위에 난자를 흡입한 후 다시 air와 oil을 각각 1cm씩 차례로 흡입하여 straw를 수평으로 6시간 동안 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

4. 체외배양

체외수정 6시간 후 난자를 TL-HEPES 용액으로 3회 세척함으로써 정자를 포함한 불순물을 제거하였으며, 재차 NCSU-23 용액으로 2~3회 세척하였다. 세척된 난자는 60mm petri dish(Falcon, 3002)에 mineral oil로 피복된 50µl의 NCSU-23 용액에 25~30개 정도의 난자를 적하시킨 후, CO₂ 배양기에서 7일간 배양하면서 난자의 분할, 상실배, 배반포로의 배 발달을 관찰하였다.

5. 항산화제 처리

돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 있어서 여러 항산화제의 각각의 농도를 배양액에 첨가하여 난자를 배양한 후 난자의 8세포로의

Table 1. Experimental design of antioxidants on *in vitro* development of porcine embryos produced

Medium	IVM	IVF	IVC
	TCM-199	mTBM	NCSU-23
Experiment 1	+	-	-
Experiment 2	-	+	-
Experiment 3	-	-	+

+ With antioxidant in medium.

- Without antioxidant in medium.

분할율(수정 2일 후), 상실배율(수정 4일 후) 및 배반포(수정 5~7일 후)로의 배 발달을 조사하였다.

1) 체외성숙시 배양액내 항산화제의 첨가효과

체외성숙 배양액인 TCM-199 용액에 catalase(Sigma, C-1345)와 glutathione(Sigma, G-6013)을 첨가하여 난자의 체외성숙을 유도하였다. 각각의 첨가농도는 catalase의 경우 100, 200, 500U/ml이었으며, glutathione의 경우 0.5, 1.0, 1.5mM/ml이었다.

2) 체외수정시 배양액내 항산화제의 첨가효과

체외수정 배양액인 mTBM 용액에 cysteine(Sigma, C-7352), catalase 및 glutathione을 첨가하여 체외수정을 실시하였다. 각각의 첨가농도는 cysteine의 경우 0.1, 0.6, 1.0mM/ml, catalase의 경우 100, 200, 500U/ml이었으며, glutathione의 경우 0.5, 1.0, 1.5mM/ml이었다.

3) 체외배양시 배양액내 항산화제의 첨가효과

체외배양용 배양액인 NCSU-23 용액에 cysteine, catalase 및 glutathione을 첨가하여 체외배양하였다. 각각의 첨가농도는 cysteine의 경우 0.1, 0.6, 1.0mM/ml, catalase의 경우 100, 200, 500U/ml이었

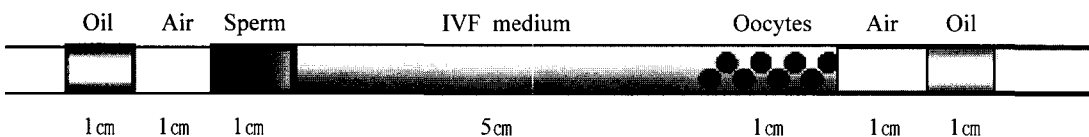


Fig. 1. Diagram of IVF of porcine oocytes in embryo cryopreservation straws.

으며, glutathione의 경우 0.5, 1.0, 1.5 mM/ml이었다.

6. 통계처리

본 실험에서의 각 처리 구는 최소한 4회 이상 반복 실시하였으며, 실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2 -test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 체외성숙 배양액내 항산화제의 첨가효과

돼지 난포란의 체외성숙 시 배양액내 catalase 및 glutathione을 각각 100, 200, 500U/ml 및 0.5, 1.0, 1.5/ml을 첨가하여 체외성숙을 유도한 후, 체외수정과 배양을 실시하여 난자의 분할율과 배 발달율을 관찰한 결과는 Table 2와 같다.

돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 후 수정난자의 분할율 및 상실배와 배반포로의 배 발달율은 대조군에서는 각각 68.9%(104/151) 및 53.9%(56/104)와 15.4%(16/104)이었다. 한편 catalase의 첨가군 100, 200, 500U의 경우 수정난자의 분할율은 77.3%(85/110)~79.4%(81/102)로서, 대조군보다 약

간 상승하였지만 유의차는 없었다. 그리고 상실배로의 발달율은 52.9%(45/85)~61.7%(50/81)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 그러나 배반포로의 발달율은 각 13.8%(11/80), 23.5%(20/85), 27.2%(22/81)로서, 대조군보다 상승하였다. 특히 500U 첨가군에서는 유의하게 상승하였다($p<0.05$).

포유동물의 수정란의 체내의 배양에 있어서 발생되는 활성산소의 악영향을 해소할 수 있는 항산화소로서 catalase의 중요성이 재인식되었지만, Park 등(1996)에 따르면 체외성숙용 배양액으로서 Waymouth 용액내 catalase를 첨가했을때 농도와 관계없이 효과가 없었고, Han 등(2003)도 NCSU-23 용액내 catalase 100, 500, 1,000U/ml첨가하여 체외성숙유도 후 체외수정, 배양을 실시한 결과 무첨가군에서 높은 배반포 발달율을 보고하여 본 연구와는 일치하지 않았다. 본 연구에서는 500U 첨가군에서 높은 배반포의 발달율을 나타냈으나 배양액 내의 catalase의 활성과 배양액내에 발생하는 활성산소량의 수준에 따른 분자생물학 수준의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Glutathione의 첨가군 0.5, 1.0, 1.5mM/ml의 경우 수정난자의 분할율은 66.9% (103/154)~69.9%(102/

Table 2. Addition concentration of catalase and glutathione in IVM medium on *in vitro* development of porcine embryos

Antioxidant in IVM medium		No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved (%)	No. of embryos developed to	
Kinds	Con.*			Morula (%)	Blastocyst (%)
Control		151	104 (68.9) ^a	56 (53.9) ^a	16 (15.4) ^a
Catalase	(U)				
	100	102	80 (78.4) ^a	47 (58.8) ^a	11 (13.8) ^a
	200	110	85 (77.3) ^a	45 (52.9) ^a	20 (23.5) ^{ab}
	500	102	81 (79.4) ^a	50 (61.7) ^a	22 (27.2) ^b
Glutathione	(mM)				
	0.5	146	102 (69.9) ^a	60 (58.8) ^a	13 (12.8) ^a
	1.0	147	100 (68.0) ^a	72 (72.0) ^b	18 (18.0) ^a
	1.5	154	103 (66.9) ^a	59 (57.3) ^a	12 (11.7) ^a

^{a,b}: Values with different superscripts were significantly different($p<0.05$).

* Con.: concentration.

146)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 그러나 상실배로의 발달율은 각각 58.8%(60/102), 72.0%(72/100), 57.3%(59/103)로서, 대조군보다 상승하였고, 특히 1.0mM 첨가군에서는 유의하게 상승하였다($p < 0.05$). 또한 배반포로의 발달율에서도 1.0mM 첨가군이 18.0% (18/100)로서, 대조군보다 약간 상승하였지만, 유의차는 인정되지 않았다.

Luvoni 등(1996)과 Calvin 등(1986)에 의하면 소 미성숙 난자의 체외성숙시 glutathione의 첨가는 무첨가군보다 수정난자의 분할율 및 배반포로의 배 발달율이 높았다고 보고하였으며, 본 실험에서도 유사한 결과를 얻었다. 따라서 glutathione은 체외성숙 시 난포란의 체외성숙을 유도하여 최종적으로 후기 배발생에 어떤 영향을 미치는 것으로 사료되며, 나아가서 난포란을 이용한 배반포의 효율적인 생산은 난포란의 체외성숙 방법에 따라 좌우될 수 있다는 것을 암시한다.

2. 체외수정 배양액내 항산화제의 첨가효과

항산화제가 첨가되어 있지 않은 배양액에서 체외성숙된 돼지 난포란의 체외수정에 있어서 배양액내에 cysteine, catalase 및 glutathione을 각각 0.1, 0.6, 1.0mM/ml, 100, 200, 500U/ml 및 0.5, 1.0, 1.5/ml을 첨가하여 체외수정을 유도한 후 배양을 실시하여 난자의 분할율과 배 발달율을 관찰한 결과는 Table 3과 같다.

돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 후 수정난자의 분할율 및 상실배와 배반포로의 배 발달율은 대조군에서는 각각 70.9%(78/110) 및 56.4%(44/78)와 17.9%(14/78)이었다. 한편 cysteine의 첨가군 0.1, 0.6, 1.0mM의 경우 수정난자의 분할율은 60.2%(68/113)~70.4%(81/115)로서, 대조군보다 0.1mM 첨가군에서 낮았지만, 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 상실배로의 발달율은 각각 42.6%(29/68), 45.7%(37/81), 52.1%(38/73)로서, 대조군보다 낮았

Table 3. Addition concentration of cysteine, catalase and glutathione in IVF medium on *in vitro* development of porcine embryos

Antioxidant in IVF medium		No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved (%)	No. of embryos developed to	
Kinds	Con.*			Morula (%)	Blastocyst (%)
Control		110	78 (70.9) ^a	44 (56.4) ^a	14 (17.9) ^a
Cysteine	(mM)				
	0.1	113	68 (60.2) ^a	29 (42.6) ^b	8 (11.8) ^{ab}
	0.6	115	81 (70.4) ^a	37 (45.7) ^{ab}	9 (11.1) ^{ab}
	1.0	107	73 (68.2) ^a	38 (52.1) ^{ab}	4 (5.5) ^b
Catalase	(U)				
	100	114	67 (58.8) ^{ab}	33 (49.3) ^a	10 (14.9) ^a
	200	91	58 (63.7) ^{ab}	32 (55.2) ^a	6 (10.3) ^a
	500	97	49 (50.5) ^b	27 (55.1) ^a	8 (16.3) ^a
Glutathione	(mM)				
	0.5	102	73 (71.6) ^a	39 (53.4) ^a	14 (19.2) ^a
	1.0	126	89 (70.6) ^a	48 (53.9) ^a	13 (14.6) ^a
	1.5	95	51 (53.7) ^b	26 (51.0) ^a	6 (11.8) ^a

^{a,b}: Values with different superscripts were significantly different($p < 0.05$).

* Con.: concentration.

고, 특히 0.1mM 첨가군에서는 유의하게 낮았다($p<0.05$). 또한 배반포로의 발달율에서도 각각 11.8%(8/68), 11.1%(9/81), 5.5%(4/73)로서, 대조군보다 낮았으며, 특히 1.0mM 첨가군에서는 유의하게 낮았다($p<0.05$).

Catalase의 첨가군 100, 200, 500U의 경우, 수정난자의 분할율은 각각 58.8%(67/114), 63.7%(58/91), 50.5%(49/97)로서, 대조군보다 낮았고, 특히 500U 첨가군에서는 유의하게 낮았다($p<0.05$). 그러나 상실배로의 발달율은 49.3%(33/114)~56.4%(44/110)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 그리고 배반포로의 발달율도 10.3%(6/58)~16.3%(8/49)로서, 대조군보다 약간 낮았지만, 유의차는 인정되지 않았다.

Glutathione의 첨가군 0.5, 1.0, 1.5mM의 경우, 수정난자의 분할율은 각각 71.6%(73/102), 70.6%(89/126), 53.7%(51/95)로서, 특히 1.5mM 첨가군은 대조군보다 유의하게 낮았다($p<0.05$). 그러나 상실배로의 발달율은 51.0%(26/51)~53.9%(48/89)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 그리고 배반포로의 발달율도 11.8%(6/51)~19.2%(14/73)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다.

Ali 등(2003)에 의하면 소 난자의 체외수정시 고농도의 cysteine과 catalase의 첨가는 후기 배 발달에 악영향을 미친다고 하였고, Blondin 등(1997)에 의하면 미량의 활성산소는 체외수정시 난자와 정자의 융합에, Aitken 등(1996)은 정자의 수정능 획득에 필수적이라고 하였다. 그리고 본 연구에 있어서도 여러 종류의 항산화제의 첨가농도와 관계없이 수정 후 배 발달에는 효과가 없었다. 이상의 결과를 토대로 종합해 보면 수정의 장에서는 아마도 항산화제의 처리시간과 관계가 있는 것으로 사료된다. 아울러 정자의 처리에 있어서 항산화제의 첨가효과는 더욱 검토할 필요가 있다.

3. 체외배양 배양액내 항산화제의 첨가효과

항산화제가 첨가되어 있지 않은 배양액내에서 체외성숙과 체외수정시킨 수정난자의 체외발달에 있어서 배양액내에 cysteine, catalase 및 glutathione을 각각 0.1, 0.6, 1.0mM/ml, 100, 200, 500U/ml 및 0.5, 1.0, 1.5/ml을 첨가하여 배양후 난자의

분할율과 배 발달율을 관찰한 결과는 Table 4와 같다.

돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 후 수정난자의 분할율 및 상실배와 배반포로의 배 발달율은 대조군에서는 각각 63.7%(107/168) 및 57.9%(62/107)와 19.6%(21/107)이었다. 한편 cysteine의 첨가군 0.1, 0.6, 1.0mM의 경우 60.6%(100/165)~66.0%(95/144)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 그리고 상실배로의 발달율도 53.7%(51/95)~59.0%(59/100)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 또한 배반포로의 발달율도 16.8%(16/95)~20.0%(19/95)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다.

Catalase의 첨가군 100, 200, 500U의 경우, 수정난자의 분할율은 68.7%(114/166)~72.5%(111/153)로서, 대조군보다 약간 상승하였지만, 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 상실배로의 발달율은 50.9%(54/106)~61.4%(70/114)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 또한 배반포로의 발달율도 14.2%(15/106)~20.2%(23/114)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다.

Glutathione의 첨가군 0.5, 1.0, 1.5mM의 경우, 수정난자의 분할율은 64.9%(98/151)~67.8%(101/149)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 그리고 상실배로의 발달율은 51.0%(50/98)~60.4%(61/101)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다. 또한 배반포로의 발달율도 16.3%(16/98)~21.8%(22/101)로서, 대조군과 비슷한 경향이였다.

그러나 Ali 등(2003)은 소 수정난자의 체외배양시 cysteine이 배 발달율을 상승시킨다고 하였으며, Lim 등(1996)과 Caamano 등(1996)은 thiol 화합물은 소 수정란의 세포내로 잘 흡수되어 활성산소를 제거시킴으로써 배 발달율을 높인다는 결과와 본 실험의 결과와는 상반된 것으로서, 이것은 아마도 실험에 사용된 동물 종의 차이에 의한 것으로 사료된다.

Johnson과 Nasr-Esfahani(1993)는 catalase가 배양액내에서 쉽게 불활성화 되기 때문에 소 체외수정난자의 배 발생에는 그다지 영향이 없었다고 보고하였으며, Ali 등(2003)은 소 수정난자의 체외배양시 glutathione의 첨가로 배 발달율을 높인다는 결과와 본 실험의 결과와는 상반된 것으로서, 이것

Table 4. Addition concentration of cysteine, catalase and glutathione in IVC medium on *in vitro* development of porcine embryos

Antioxidant in IVC medium		No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved (%)	No. of embryos developed to	
Kinds	Con.*			Morula (%)	Blastocyst (%)
Control		168	107 (63.7) ^a	62 (57.9) ^a	21 (19.6) ^a
Cysteine	(mM)				
	0.1	165	100 (60.6) ^a	59 (59.0) ^a	19 (19.0) ^a
	0.6	151	95 (62.9) ^a	55 (57.9) ^a	16 (16.8) ^a
	1.0	144	95 (66.0) ^a	51 (53.7) ^a	19 (20.0) ^a
Catalase	(U)				
	100	153	111 (72.5) ^a	58 (52.3) ^a	17 (15.3) ^a
	200	152	106 (69.7) ^a	54 (50.9) ^a	15 (14.2) ^a
	500	166	114 (68.7) ^a	70 (61.4) ^a	23 (20.2) ^a
Glutathione	(mM)				
	0.5	149	100 (67.1) ^a	60 (60.0) ^a	21 (21.0) ^a
	1.0	149	101 (67.8) ^a	61 (60.4) ^a	22 (21.8) ^a
	1.5	151	98 (64.9) ^a	50 (51.0) ^a	16 (16.3) ^a

^a : Values with different superscripts were significantly different($p < 0.05$).

* Con.: concentration.

은 아마도 실험에 사용된 재료 및 방법의 차에 기인하는 것으로 사료되기 때문에 보다 체계적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

이상의 결과를 종합적으로 요약하면 돼지 난포란을 이용한 배반포의 체외생산에 있어서 배양액 내 항산화제의 첨가는 체외성숙단계에서만 효과적이었다. 이것은 아마도 항산화제가 체외성숙 시 난포란 내에서 일어나는 여러 가지의 생화학 반응을 처리시간과 관련하여 활성화를 조절시킴으로써 난포란의 생존력을 높인 것이라고 사료되기 때문에 앞으로는 돼지 난포란의 효율적인 체외성숙에 대해서 배양액내 첨가물질은 물론 나아가서 방법론적인 측면에서 더욱 연구되어야 할 것이다.

적 요

포유동물 난자의 체외수정은 외래유전자 도입

에 의한 형질전환동물 생산과 우수한 형질을 가진 개체의 보존, 인간의 불임연구 등과 같은 수정란이식 기술로서 널리 이용되고 있다. 돼지 난포란을 이용한 체외수정란의 생산은 초기단계인 체외성숙 기술의 미확립, 그로인한 체외수정 시 높은 다정자 침입율과 불완전한 응성전핵 형성 및 체외발달능 정지현상(cell blocking) 등 어려움 때문에 아직도 다른 가축보다 양질의 수정란을 생산하기가 어려운 것으로 알려져 있다.

이와 같은 것을 해결하기 위하여 많은 연구자들은 배양액내에 hormone, growth factor, antioxidants 등과 같은 외인성 인자들을 첨가하고 있다. 이들 인자 중 antioxidant는 free radical을 소거하고 과산화물 생성을 억제하여 난자를 산화적 스트레스로부터 보호한다.

따라서 본 연구는 돼지 난포란으로부터 체외수정란의 생산에 있어서 배양액내 cysteine, catalase

및 glutathione의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 체외배양에 어떤 영향을 미치는지를 검토하였다.

실험 1은 체외성숙용 배양액인 TCM-199 용액에 catalase(100, 200, 500U/ml)와 glutathione(0.5, 1.0, 1.5mM/ml)의 첨가, 실험 2는 성숙된 난자의 체외수정용 배양액인 mTBM 용액에 cysteine(0.1, 1.6, 1.0mM/ml), catalase(100, 200, 500U/ml)와 glutathione(0.5, 1.0, 1.5mM/ml)의 첨가, 실험 3은 체외성숙 및 체외수정된 난자의 체외배양용 배양액인 NCSU-23 용액에 cysteine(0.1, 1.6, 1.0mM/ml), catalase(100, 200, 500U/ml)와 glutathione(0.5, 1.0, 1.5mM/ml)을 첨가하여 배반포로의 배 발달율을 관찰하였던 결과는 다음과 같다.

1. 체외성숙시 catalase의 경우는 500U 첨가군의 27.2%로 무첨가군의 15.4%보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 한편 glutathione의 경우 배반포로의 배 발달율은 무첨가군과의 차이는 없었다. 그러나 1.0mM 첨가군에서 상실배까지의 배 발달율인 72%는 무첨가군의 53.9%보다 유의하게 높았다($p<0.05$).
2. 체외수정시 여러 종류의 항산화제 첨가는 첨가하는 농도와 관계없이 배반포로의 배 발달율은 무첨가군과 차이가 없었다.
3. 체외배양시 여러 종류의 항산화제 첨가는 첨가하는 농도와 관계없이 배반포로의 배 발달율은 무첨가군과 차이가 없었다.

이상의 결과를 종합적으로 요약하면 돼지 난포란을 이용한 배반포의 체외생산에 있어서 배양액내 항산화제의 첨가는 체외성숙단계에서만 효과적이었다. 이것은 아마도 항산화제가 체외성숙 시 난포란 내에서 일어나는 여러 가지 생화학 반응의 처리시간과 관련하여 활성화시킴으로써 난포란의 생존력을 높인 것이라고 사료되기 때문에 앞으로는 돼지 난포란의 효율적인 체외성숙에 대해서 배양액내 첨가물질은 물론 나아가서 방법론적인 측면에서 더욱 연구되어야 할 것이다.

참고문헌

Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS and Day BN. 1998. Presence of beta-mercapto-

ethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50:747-756.

Aitken RJ, Buckingham DW, West K and Brindle J. 1996. On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 35:541-551.

Aitken RJ, Harkiss D and Buckingham D. 1993. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. Reprod. Fertil.*, 98:257-265.

Ali AA, Bilodeau JF, and Sirard MA. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59:939-949.

Blondin P, Coenen K and Sirard MA. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.*, 18:454-460.

Byeong-Seon J and Xiangxhong Y. 2001. Cysteine, Glutathione and percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 59:330-335.

Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA and Youngs CR. 1996. beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. *Biol. Reprod.*, 55: 1179-1184.

Calvin HI, Grosshan K and Blake EJ. 1986. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res.*, 14:265-275.

Comporti M. 1989. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem. Biol. Interact.*, 72: 1-56.

Boquest AC, Abeydeera LR, Wang WH and Day BN. 1999. Effect of adding reduced glutathione

- during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 51: 1311-1319.
- Fowler CJ and Callingham BA. 1978. Substrate-selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. *Biochem. Pharmacol.*, 2:1995-2000.
- Funahashi H, Stumpf TT, Cantely TC, Kin NH and Day BN. 1995. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and/or electrical activation. *Zygote*, 3:273-281.
- Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Schultz GA and Watson AJ. 1995. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol. Reprod.*, 53:532-540.
- Johnson MH and Nasr-Esfahani MH. 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays.*, 16:31-38. Review.
- Lequarre AS, Feugang JM, Malhomme O, Donnay I, Massip A, Dessy F and VanLangendonck A. 2001. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of *in vitro* culture. *Mol. Reprod. Dev.*, 58:45-53.
- Lim JM, Liou SS and Hansel W. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, 46:429-439.
- Liu Z and Foote RH. 1995. Effects of amino acids on the development of *in-vitro* matured/ *in-vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. *Hum. Reprod.*, 10:2985-2991.
- 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.
- Luvoni GC, Keskinetepe L and Brackett BG. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:437-443.
- Mastroianni JL and Jones R. 1965. Oxygen tensions in rabbit fallopian tube. *J. Reprod. Fertil.*, 9:99-102.
- Matos DG, Furnus CC and Moses DF. 1997. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes, role of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 57:1420-1425.
- Miyamura M, Yoshida M, Hamano S and Kuwamura M. 1995. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*, 43:282.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken JR and Johnson MH. 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development*, 109:501-507.
- Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y and Mori T. 1991. Protection from oxidative stress by thioredoxin and superoxide dismutase of mouse embryos fertilized *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 6:1305-1310.
- Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y and Mori T. 1992. Effects of superoxide dismutase on mouse *in vitro* fertilization and embryo culture system. *J. Assist Reprod. Genet.*, 9:274-280.
- 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).
- Perreault SD, Barbee RR and Slott VL. 1988. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.*, 125:181-186.

Yong-Hai L, Wei M, Ming L, Yi H, Li-Hong J and Wei-Hua W. 2003. Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new *in vitro* fertilization (IVF) system: straw IVF. Biol. Reprod., 69:1580-1585.

Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T and Chikyu M. 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.

Yoshida M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 35:76-81.

한만희, 이경분, 천행수, 박병권, 이경광, 이규승, 서길웅. 2003. 산소조건 및 catalase 가 돼지 난포란의 체외성숙과 배 발달에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 27(2):115-123.

(접수일: 2004. 8. 6 / 채택일: 2004. 10. 10)