

돼지 단위발생란의 체외발육시 6탄당의 영향

윤선영¹ · 김정익 · 정희태 · 양부근 · 박춘근^{*}
강원대학교 동물자원과학대학

Effects of Hexoses on *In Vitro* Development of Parthenogenetic Embryos in the Pigs

S. Y. Yoon¹, C. I. Kim, H. T. Cheong, B. K. Yang and C. K. Park^{*}
College of Animal Resource Science, Kangwon National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of different hexoses (glucose, mannose, galactose and fructose) on *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the pigs.

When the parthenogenetic embryos were cultured in medium with concentrations of 5mM glucose or 1mM galactose, the rates of embryos developed to morula and blastocyst stages were significantly higher than those in another culture conditions ($P<0.05$). However, high concentration of galactose inhibited development to morula and blastocyst stages. Addition of hexoses at early stage of porcine parthenogenetic embryos were effective for *in vitro* development. Especially, the embryos cultured in medium with glucose at early stage were effective for development to 2-cell (72%) and blastocyst (19%) stages compared with embryo cultured without glucose.

From the present results, it is suggested that development of porcine parthenogenetic embryos can improve in medium with 5 mM glucose. The concentration of 1 mM galactose was also effective for development of porcine parthenogenetic embryos. It also show that parthenogenetic embryos cultured with glucose at early stage can improve *in vitro* development.

(Key words : parthenogenetic embryos, *in vitro* culture, hexoses, pigs)

서 론

최근 생명공학의 발달과 더불어 가축의 난포란을 이용한 체외 수정란의 생산과 핵치환 등의 기법을 통한 복제동물의 생산과 같은 각종 첨단 생명공학적인 연구가 활발히 수행되고 있다. 이러한 연구를 효율적으로 수행하기 위해서는 양질의 수정란을 대량으로 확보하는 것이 필수적이다. 이를 해결하는 수단으로 도축된 가축의 난소에서 채취된

다수의 미성숙 난포란을 체외 배양으로 성숙시켜 이용하고자 하는 실험이 여러 연구자들에 의하여 다양하게 수행되고 있다.

대부분 포유동물에서 체외배양은 일정한 세포기에 발육이 정지가 되는 체외에서 발육억제 현상(*in vitro* cell block)이 나타나기 때문에 정상적인 수정란의 확보에 많은 어려움이 있다. 특히, 돼지에서는 체외에서 발육 억제현상이 4 세포기에 발생되므로 난포란의 체외성숙율이 낮아 수정란 생

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10500-0) 지원으로 수행되었음.

¹ 삼성생명과학연구소(Samsung Biomedical Research Institute)

^{*} Correspondence : E-mail : parkck@kangwon.ac.kr

산이 제한되고 있다(Jarrell 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992). 체외발육 억제 현상은 체내의 난관 또는 자궁에서 분비되는 알려지지 않은 인자와 난관과 자궁의 조건 및 세포 발육에 유해한 영향을 미치는 요인에 의하여 발생하는 것으로 보고되고 있다(Bigger, 1987; Li 등, 1993; Rieger 등, 1991).

이러한 체외발육 억제현상을 극복하거나, 체외 발육률을 증가시키기 위하여 단백질원의 첨가, 가스농도 조절, 각종 호르몬 및 성장인자를 첨가하여 체외 발육율을 향상시키기 위한 연구가 검토되고 있다.

그 중 사람뿐만 아니라 동물의 자성 생식기관에 존재하는 glucose를 포함한 6탄당에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 체내에 함유되어 있는 glucose의 기본 농도는 종에 따라 다르기는 하지만 mouse(Gardner와 Leese, 1990), 토끼(Leese, 1988), 양(Wales, 1973), 돼지(Nichol 등 1992), 소(Carlson 등, 1970), 사람(Lippes 등, 1972)을 포함한 모든 종의 자성 생식기관에 존재한다. 또한 수정란 배양 media에서 glucose는 주요 에너지 기질로 넓게 사용되어진다. Hamster(Barnett 등, 1993), mouse(Lane과 Gardner, 1998), 그리고 domestic animals(Flood와 Weibold, 1988; Thompson 등, 1991; Rieger 등, 1992; Gardner 등, 1993; Guyader-joly 등, 1996)에서 glucose의 대사는 수정란 발육의 초기에 낮지만, 배반포 단계에서 해당작용을 증가시킨다. 그러나 현재 glucose가 초기 배발육에 해로운 영향을 끼친다는 보고가 있다(Chatot 등, 1989; Lawitts와 Bigger, 1991). 이와 같은 glucose는 소 수정란의 배반포 형성을 위한 중요한 기질로 알려져 있다(Rieger 등, 1992). 또한 glucose와 같은 fructose나 galactose, mannose와 같은 monosaccharide 6탄당은 해당작용을 위한 기질로 사용할 수 있다. 최근에 fructose는 여러 종의 번식기관에 존재하여 착상 전 수정란에 의해 대사되며(Gregorie와 Gibbon, 1965; Haynes와 Lamming, 1967; Douglas 등, 1970; Suga와 Masaki, 1973; Aitken, 1976; Greven, 1984), hamster(Ludwig 등, 2001)와 소 수정란(Guyader-Joly 등, 1996)에서 수정란 발육에 효과적으로 도움을 준다는 것이 보고되었다. 또한 인간의 존재 시, 배양액 내 glucose 대신 fructose를 첨가하였을

때 이종간 mouse 수정란의 cell-block을 완화시켜 배반포 형성을 촉진시킨다는 보고(Menezo와 Khat-chadourian, 1990)가 있고 소 수정란과 체세포 핵이식 된 소 난자에서 fructose가 배반포 발육에 가장 적합한 6탄당이며, TE로 분화하는 세포를 촉진하고 glucose는 ICM cell 분화를 자극한다(Kwon 등, 2003)는 보고가 있지만 돼지 수정란이나 단위 발생란의 체외발달에 있어 glucose와 fructose를 포함한 6탄당의 영향은 아직 확실하게 밝혀진 바가 없다.

특히 단위발생의 경우, 지금까지 연구는 주로 단위발생 유기 방법에 관한 것들이 주류를 이루고 있으며 체외발육에 대한 연구는 제한적으로 이루어져 왔다. 그러므로 단위발생 유기 후에 염색체 이상 분석, 세포 유전학, 발생학 등의 연구에 폭넓게 이용할 수 있는 단위발생란의 발달에 관한 연구가 요구된다.

따라서 본 연구는 이러한 체외발육 억제현상을 극복하고 돼지 난자의 체외배양 체계의 확립에 필요한 기초자료를 얻고자 돼지에 있어서 활성화 처리한 단위발생란의 체외배양 시 6탄당의 첨가에 따른 체외발육 성적을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 난자의 준비

실험에 사용된 난자는 품종에 구분없이 도축 직후의 암돼지로부터 적출한 난소에서 채취하였다. 도축 직후 회수한 난소를 35~37℃의 생리식염수(NaCl 0.9%) 내에 넣어 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 3회 세척한 후 2~6mm 직경의 난포로부터 18-gage 주사침이 부착된 일회용 10ml 주사기를 이용하여 흡입하였다. 흡인된 난포란은 TL-Hepes(114mM NaCl, 3.2mM KCl, 2.0mM NaHCO₃, 0.4mM NaHPO₄ · H₂O, 10.0mM Na-lactate, 2.0mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.5mM MgCl₂ · 6H₂O, 10.0mM Hepes(Quantum, Biotechnologies INC, USA), 100IU penicillin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, pH 7.4, 280 Osm로 적정)로 3회 세척하여 현미경을 통해 육안으로 선별하였다.

2. 난자의 체외성숙

난자의 체외성숙에 사용된 배양액은 NCSU-23을 사용하였다. 선별된 난자는 NCSU-23에 10% porcine follicular fluid(pFF), 5.0mM hypotaurin, 0.57mM cysteine solution, 10 μ l/ml PMSG 및 1 μ l/ml hCG를 첨가한 배양액 50 μ l에 22시간 동안 39°C, 5% CO₂ 조건 하에서 성숙배양하였다. 이후 같은 조건에서 TCM-199(0.1% PVA, 3.1mM glucose, 0.9mM Na-pyruvate, 25.0mM NaHCO₃, 25.0 mM HEPES, 75 μ g/ml penicillin G, 50 μ g/ml streptomycin)에 0.6mM cysteine, 10ng/ml EGF를 첨가한 배양액으로 22시간 동안 2차 성숙배양하였다.

3. 난자의 활성화 처리

체외 성숙시킨 난포란을 0.1% hyaluronidase가 첨가된 배양액이 들어 있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 4분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제 1극체가 확인된 난자만을 성숙된 난자로 판단하여 실험에 공시하였다. 난자의 활성화를 유도하기 위하여 BTX200 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA)를 이용하여 성숙된 난자를 0.1mM MgSO₄, 0.5mM CaCl₂가 첨가된 0.3M mannitol 용액을 넣은 1.0mm 폭의 wire chamber의 양 전극 사이로 옮긴 후, 1.0kV/cm의 직류(DC) 전류를 50 μ sec 간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 2mM 농도의 6-dimethylaminopurine(6-DMAP, Sigma, St Louis, Mo, USA)이 첨가된 배양액(PZM-3)의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하였다.

4. 난자의 배양

단위발생란의 체외 배양을 위해서는 PZM-3 (108.7mM NaCl, 10mM KCl, 0.4mM MgSO₄ · 7H₂O, 25.1mM NaHCO₃, 0.4mM KH₂PO₄, 0.2mM Na-pyruvate, 2.0mM Ca-(lactate)₂ · 5H₂O, 1.0mM glutamine, 50 μ g/ml gentamycin)를 사용하였다. 4시간 DMAP 처리 후에 배양을 실시하였으며 이때 체외 배양액 내에 일정량의 6탄당을 첨가하여 다음과 같은 조건 하에서 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

5. 실험계획

- 1) 돼지 단위발생란을 PZM-3 배양액에 각각의 glucose, mannose, galactose 및 fructose를 0, 1, 2, 5, 10mM의 농도로 첨가하여 7일간 배양하여 발육율을 검토하였다.
- 2) 돼지 단위발생란을 5mM의 glucose가 첨가된 배양액에 5mM의 mannose, galactose 및 fructose를 추가 첨가하여 7일간 배양한 후 발육율을 검토하였다.
- 3) 돼지 단위발생란을 5mM의 glucose, mannose, galactose 및 fructose가 각각 첨가된 배양액에서 48시간(2일) 동안 배양한 후 다시 위의 6탄당이 첨가되지 않은 배양액에서 120시간(5일) 동안 배양한 후 발육율을 검토하였다.
- 4) 돼지 단위발생란을 6탄당이 첨가되지 않은 배양액에서 48시간(2일) 동안 배양한 후 다시 5mM의 glucose, mannose, galactose 및 fructose가 각각 첨가된 배양액에서 120시간(5일) 동안 배양한 후 발육율을 검토하였다.

6. 통계처리

실험으로부터 얻은 결과의 분석은 χ^2 -검정과 Duncan의 다중검정으로 각 처리구간 유의성을 검정하였다.

결 과

본 연구에서는 6탄당인 glucose, mannose, galactose 및 fructose를 서로 다른 농도로 첨가하여 돼지 단위발생란을 체외에서 배양하여 발육율을 검토하였다.

Table 1에서 나타낸 바와 같이 2세포기로 분할한 난자의 비율은 glucose 첨가시 무첨가에 비해 높은 발육율을 나타냈으며, 5mM의 glucose를 첨가한 경우 배반포 단계로 발육한 비율이 14%(14/104)로 0 및 1mM의 glucose를 첨가한 경우의 발육율에 비해 유의적으로 높은 발육율 보였다($P < 0.05$). 그러나 배반포기배의 세포수는 glucose 농도에 의한 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 높은 glucose 농도에서 많은 세포수를 나타냈다.

Table 2에서는 mannose를 서로 다른 농도로 첨

Table 1. Effects of concentrations of glucose on *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the pigs

Concentrations of glucose (mM)	No. of oocytes examined	No. (%) oocytes developed to			Cell no. in blastocyst (mean±SE)
		2-Cell	Morula	Blastocyst	
0	154	72(47) ^b	26(17)	8(5) ^b	27.3±3.9
1	116	70(60) ^a	14(12)	6(5) ^b	26.7±4.3
2	112	64(57) ^{ab}	12(11)	10(9) ^{ab}	24.2±1.6
5	104	64(62) ^a	14(13)	14(14) ^a	31.2±3.9
10	104	56(54) ^{ab}	18(17)	6(6) ^{ab}	33.3±8.1

^{ab} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

Table 2. Effects of concentrations of mannose on *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the pigs

Concentrations of mannose (mM)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes developed to			Cell no. in blastocyst (mean±SE)
		2-Cell	Morula	Blastocyst	
0	154	72(47)	26(17)	8(5)	27.3±3.9
1	138	60(44)	20(14)	8(6)	26.3±2.5
2	152	70(46)	18(12)	6(4)	21.0±1.0
5	132	70(53)	20(15)	6(5)	22.7±0.9
10	118	50(42)	12(10)	4(3)	30.5±9.5

가한 경우 돼지 단위발생란의 체외발육에 관한 결과를 나타냈다. 그 결과, mannose의 첨가 농도에 관계없이 분할율, 배반포기배로의 발육율 및 배반포기 단계에서의 세포수에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 3에서는 galactose의 농도별 첨가에 의한

돼지 단위발생란의 체외발육율을 나타내었다. 그 결과 배반포기배 단계로 발육한 비율은 1mM의 galactose 첨가시 13%로 0과 10mM의 galactose를 첨가한 경우의 발육율(5%와 5%)에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타냈다($P<0.05$). 한편 상실기배에서의 발육율은 1mM의 galactose첨가시 10mM의

Table 3. Effect of concentrations of galactose on *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the pigs

Concentrations of galactose (mM)	No. of oocytes examined	No. (%) oocytes developed to			Cell no. in blastocyst (mean±SE)
		2-Cell	Morula	Blastocyst	
0	154	72(47)	26(17) ^{ab}	8(5) ^b	27.3±3.9
1	96	48(50)	20(21) ^a	12(13) ^a	24.5±1.1
2	96	42(44)	18(19) ^{ab}	10(10) ^{ab}	23.0±1.0
5	92	42(46)	14(15) ^{ab}	8(9) ^{ab}	22.6±0.7
10	82	36(44)	8(10) ^b	4(5) ^b	20.5±0.5

^{ab} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

첨가에 비해 유의적으로 높은 발육율을 나타냈다. 그러나 2세포기로의 분할과 배반포기배에서의 세포수는 galactose의 첨가농도에 의한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

Table 4에서는 fructose의 서로 다른 농도를 첨가한 경우 돼지 단위발생란의 체외발육 상황을 나타내었다. 그 결과 2세포기로의 분할은 초기 배양 시에는 5mM의 농도에서 0, 1 및 10mM에 비해 유의적으로 발육율을 나타냈다($P<0.05$). 그러나 상실기배로의 발육은 fructose의 무첨가시(17%) 1mM의 fructose의 첨가에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 그러나 배반포기로의 발육율과 세포수에서는 fructose의 농도에 의한 차이는 인정되지 않았다.

한편 5mM의 glucose가 기본적으로 첨가된 배양액에 mannose, galactose 및 fructose를 각각 추가 첨가한 실험에서는 전체적으로 발육율 및 세포수에 있어서 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 5).

Table 6에서는 glucose, mannose, galactose 및 fructose를 각각 5mM 첨가하여 48시간 배양한 후 그 이후에는 6탄당을 첨가하지 않고 배양하여 발육율을 검토한 결과와, 초기 48시간 동안 6탄당을 첨가하지 않고 48시간 이후에 6탄당을 첨가하여 배양한 실험 결과를 나타냈다. 그 결과 초기 48시간 동안 6탄당을 첨가해 주는 것이 첨가하지 않은 처리구보다 발육율이 높은 것으로 나타났으며, 특히 glucose에서 2-cell 단계로의 발육율이 72%, 배반포 단계에서의 발육율이 19%로 가장 높게 나타났다($p<0.05$). 그러나 배반포기 단계에서의 세포수는 6탄당의 종류, 첨가 유무 및 배양조건에 따른 차이가 인정되지 않았다.

고 찰

본 연구는 돼지 난자의 체외발육 억제현상을 극복하고 체외배양 체계의 확립에 필요한 기초 자

Table 4. Effects of concentrations of fructose on *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the pigs

Concentrations of fructose (mM)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes developed to			Cell no. in blastocyst (mean±SE)
		2-Cell	Morula	Blastocyst	
0	154	72(47) ^b	26(17) ^a	8(5)	27.3±3.9
1	128	62(48) ^b	9(7) ^b	4(3)	20.5±0.5
2	128	68(53) ^{ab}	16(13) ^{ab}	10(8)	21.0±1.6
5	136	80(58) ^a	17(13) ^{ab}	10(7)	24.0±2.3
10	132	61(47) ^b	16(12) ^{ab}	7(5)	22.0±1.3

^{ab} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Effects of glucose and other hexoses on *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the pigs

Culture type*	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes developed to			Cell no. in blastocyst (mean±SE)
		2-cell	Morula	Blastocyst	
Glucose	127	78(60)	20(15)	5(4)	21.5±0.5
Glucose + Mannose	105	76(58)	16(12)	4(3)	21.0±1.0
Glucose + Galactose	119	74(57)	13(10)	2(2)	20.5±0.5
Glucose + Fructose	124	78(56)	15(11)	1(1)	22

* All hexoses concentrations are 5mM.

Table 6. Effects of hexoses on *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the pigs

Hexoses*	Presence of hexoses		No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to			Cell no. in blastocyst (Mean±SE)
	0h	48h		2-cell	Morula	Blastocyst	
Glucose	+	-	134	96(72) ^a	32(24) ^a	26(19) ^a	24.7±1.0
	-	+	126	58(46) ^b	19(15) ^{ab}	4(3) ^b	21.0±1.0
Mannose	+	-	160	99(62) ^{ab}	20(13) ^b	12(8) ^b	20.3±0.3
	-	+	120	56(47) ^b	22(18) ^{ab}	6(5) ^b	22.7±1.2
Galactose	+	-	120	75(63) ^{ab}	12(10) ^b	4(3) ^b	26.5±5.5
	-	+	126	58(46) ^b	20(16) ^{ab}	4(3) ^b	21.5±0.5
Fructose	+	-	120	70(58) ^b	16(13) ^b	6(5) ^b	23.0±0.9
	-	+	134	66(49) ^b	17(13) ^b	3(2) ^b	20.5±0.5

^{ab} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

* All hexoses concentrations are 5mM.

료를 얻고자 돼지의 활성화 처리한 단위발생란의 체외배양시 6탄당의 첨가에 따른 체외 발육 성적을 검토하였다.

많은 동물 중에서 glucose는 수정란 발육을 위한 배양액 내에서 주요 에너지 기질로 넓게 이용되고 있다. 착상 전 발육에서 glucose의 역할은 많은 동물 중에서 증명되었다. 소 수정란 발육에서 glucose는 배반포 형성을 위해 중요한 에너지 기질이다(Rieger 등, 1992). Table 1에서 나타낸 바와 같이 5mM의 glucose 첨가가 단위발생란에서도 가장 높은 배 발육율을 보였다. 이와 비슷한 결과로 Ludwig 등(2001)은 mouse 수정란의 체외배양에 있어 glucose 첨가 시 배반포기까지의 좋은 초기배발육을 보고하였다.

수정란의 초기 배양동안 glucose는 hamster (Schini와 Bavister, 1988; Barnett과 Bavister, 1996; Barnett 등, 1997), mouse(Chatot 등, 1989; Menezes와 Katchadourian, 1990; Lawitts와 Biggers, 1991; Scott과 Whittingham, 1996), rat(Kishi 등, 1991; Miyoshi 등, 1994), 소(Kim 등, 1993), 양(Thompson 등, 1992)과 사람(Conaghan 등, 1993; Quinn, 1995)을 포함한 많은 종에서 발육지연의 원인이라 보고된 것과 반대로, Table 6에서 보는 바와 같이 초기 배양 48시간에 첨가해 주었을 때 타 처리구

에 비해 더 좋은 배 발육율을 볼 수 있어 glucose의 역할은 초기배부터 나타나는 것을 확인할 수 있어 체외배양 시에 6탄당 중에 glucose를 첨가해 주는 것이 가장 좋은 효과를 얻을 수 있을 것이라 추측되고 있다.

한편, glucose와 mannose를 제외한 galactose와 fructose의 경우 서로의 기작이 다르게 나타났다. Sakkas 등(1993)의 연구에 따르면 glucose가 4-cell 단계 이후에 부족하면 세포 분열을 지연시키고 fructose는 glucose를 보충하는 부분으로 활동한다고 보고하였다. 또 Ludwig 등(2001)의 연구에서도 fructose의 영향이 증명되었고, Kwun 등(2003)의 연구에서도 fructose는 체세포 핵이식(SCNT) 소 수정란과, IVF 소 수정란에서 배반포 발육을 위해 가장 적당한 기질이 6탄당이라고 보고하였으나 본 연구에서 fructose의 영향은 그리 뚜렷하게 나타나지 않았다(Table 4). 또한 Ludwig 등(2001)은 glucose와 fructose의 대사작용과 연관시켜 glucose와 fructose를 함께 첨가하면 더 좋은 발육율을 얻을 것이라는 예상과는 달리 Table 5에서 나타났듯이 glucose를 단독으로 첨가했을 때와 비교하여 비슷한 발육율을 보였다.

1mM의 galactose는 Table 3에 나타났듯이 6탄당 무첨가구보다는 높은 상실배 및 배반포기로의

발육을 보였으나 높은 농도(10mM)에서는 발육율이 낮게 나타났다. Ludwig 등(2001)의 연구에 의하면 hamster 수정란에서는 낮은 galactose 농도에서조차도 유해하였고, Kwun 등(2003)의 연구에서도 galactose가 IVF 소 수정란의 발육에 좋지 않았으나, 같은 연구의 체세포 핵이식(SCNT)된 소 수정란에서는 1.5mM의 galactose가 발육에 효과적이었으며 본 실험에서도 1mM의 galactose가 발육에 도움이 되었다. 이와 같은 차이는 동물 종간에 수정의 다른 패턴에 의한 결과로 대사 활성이 다르다는 증거이다. 그러나 glucose를 제외한 다른 6탄당들은 6탄당을 첨가하지 않은 처리구와 비교하여 크게 영향을 미치지 못하였으며, 대부분의 media에서 쓰이는 glucose를 대체하기는 어려울 것으로 생각된다.

한편, Glucose의 이로운 작용은 대사과정과 관련이 있을 것으로 추측되는데 단백질 합성, 핵산 합성 및 이온 수송을 포함한 에너지 의존적 생물학적 과정은 배반포 단계를 이끄는 대사활성을 향상시키는 원인과 필요성을 증가시킨다(Wales, 1973). 즉, 세포 내에서 전형적인 대사과정에 있어 어떠한 변화나 질충이 없을 경우 수정란의 체외 발육에 있어서 실패를 가져오는 것은 당연한 결과이다(Seshagani와 Bavister, 1991; Brinson과 Leese, 1994; Houghton 등, 1996). 이와 같은 높은 에너지 요구에 응하기 위해 수정란에게 특별한 에너지 제공이 가능한 기질은 수정란의 발육 잠재력을 증가시킬 수도 있다. 또한 glucose는 단백질 합성을 증가시키므로 초기배의 발육에 효과적인 영향을 미치는 것으로 생각되는데, glucose는 glutamine 기질이어서 효율적인 생산능력으로 적합하게 포도당화된 단백질은 수정란 발육에 유리하게 작용하기 때문에 본 연구 결과 5mM의 glucose의 첨가는 돼지 단위발생란의 체외배양 시 배발육에서 4-cell block 완화에는 효과적인 영향을 끼쳤으며, 1mM의 galactose도 단위발생란의 체외발육율의 개선에 도움이 될 것으로 생각된다. 이는 체외발육율이 타 가축에 비해 낮은 돼지의 수정란 생산에 있어 체외배양체계의 개선에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Aitken RJ. 1976. Uterine secretion of fructose in the roe deer. *J. Reprod. Fertil.*, 46:439-440.
- Barnett DK and Bavister BD. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.*, 43:105-133.
- Barnett DK, Clayton MK, Kimura J and Bavister BD. 1997. Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria. *Mol. Reprod. Dev.*, 48:227-237.
- Barnett DK, Reiger D and Bavister BD. 1993. Changes in the metabolism of glucose and glutamine during development of the hamster embryo. *Theriogenology Abst.*, 39:185.
- Bigger JD. 1987. Pioneering mammalian embryo culture. In: *The mamalian preimplantation embryo*. Bavister B. C(ed). : Plenum press New York:1-22.
- Brison DR and Leese HJ. 1994. Blastocoel cavity formation by preimplantation rat embryos in the presence of cyanide and other inhibitors of oxidative phosphorylation. *J. Reprod. Fertil.*, 101:305-309.
- Carlson D, Black DL and Howe GR. 1970. Oviduct secretion in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 22:549-552.
- Chatot CL, Ziomek C, Bavister BD, Lewis JL and Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryo *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 86: 679-688.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RM and Leese HL. 1993. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 99:87-95.
- Douglas CP, Garrow JS and Pugh EW. 1970.

- Investigation into the sugar content of endometrial secretion. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Common.*, 77:891-894.
- Flood MR and Weibold JL. 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 72:9-13.
- Gardner DK and Leese HJ. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 88:361-368.
- Gardner DK, Lane M and Batt P. 1993. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed *in vivo*. *Mol. Reprod. Fertil.*, 36:313-319.
- Gregorie AT and Gibbon R. 1965. Glucosyl oligosaccharides of the rabbit genital tract: effects of ovarian hormone administration. *Int. J. Fertil.*, 10:151-157.
- Greven H. 1984. The distribution of monosaccharides and hexosamines in the oviduct of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 79:229-232.
- Guyader-Joly C, Kahtchadourian C and Menezo Y. 1996. Comparative glucose and fructose incorporation and conversion by *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote*, 4:85-91.
- Haynes NB and Lamming GE. 1967. Carbohydrate content of sow uterine flushings. *J. Reprod. Fertil.*, 14:335-337.
- Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ and Leese HJ. 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 44:476-485.
- Jarrell VL, Day BN and Prather RS. 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein syntheses. *Biol. Reprod.*, 77:62-68.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
- Kishi J, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y and Mori T. 1991. Block to development in cultured rat one-cell embryos is overcome using medium HECM-1. *Hum. Reprod.*, 6:1445-1448.
- Kwon J, Chang K, Lim J, Lee E, Lee B, Kang S and Hwang W. 2003. Effects of exogenous hexoses on bovine *in vitro* fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. *Mol. Reprod. Dev.*, 65(2):167-74.
- Lane M and Gardner DK. 1998. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod.*, 13:991-997.
- Lawitts JA and Bigger JD. 1991. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J. Reprod. Fertil.*, 91:543-556.
- Leese H. 1988. The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 82:843-856.
- 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.*, 49:33-37.
- Lippes J, Enders RG and Pragay DA. 1972. The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception*, 5:85-103.
- Ludwig TE, Lane M and Barister BD. 2001. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol. Reprod.*, 64:1366-1374.
- Menezo Y and Khatchadourian C. 1990. Involvement of glucose 6 phosphate isomerase activity (EG5.3.1.9) in the mouse embryo "2 cell block" *in vitro*. *C. R. Acad Sci. Paris*, 310:

- 297-301.
- Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K and Niwa K. 1994. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: Effects of glucose, phosphate, and osmolarity. *J. Reprod. Fertil.*, 100:21-26.
- Nichol R, Hunter RFK, Gardner DK, Leese HJ and Cooke GM. 1992. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J. Reprod. Fertil.*, 96:699-707.
- Quinn P. 1995. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12:97-105.
- Rieger D, Luskutoff NM and Betteridge KJ. 1991. Developmentally related changes in the metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced and co-culture *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 95:585-595.
- Rieger D, Luskutoff NM and Betteridge KJ. 1992. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 4:547-557.
- Sakkas D, Urner F, Menezes Y and Leppens G. 1993. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos *in vitro*. *Bio. Reprod.*, 49:1288-1292.
- Schini SA and Bavister BD. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39:1183-1192.
- Schoenbeck RA, Peter MS, Rickords LF, Stumpf TT and Prather RS. 1992. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryo. *Biol. Reprod.*, 47: 1118-1125.
- Scott L and Whittingham DG. 1996. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 4:336-346.
- Seshagiri PB and Bavister BD. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "Crabtree effect." *Mol. Reprod. Dev.*, 30:105-111.
- Suga T and Masaki J. 1973. Studies on the secretions of the cow. 6. Sugar and polyol constituents in the luminal fluid of the bovine uterus. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 18:143 - 147.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA and Tervit HR. 1992. Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:253-257.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Wright RW and Tervit HR. 1991. Glucose utilization by sheep embryos derived *in vivo* and *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 3:571-576.
- Wales RG. 1973. The uterus of the ewe. II. Chemical analysis of the uterine fluid collected by cannulation. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:947 - 959.

(접수일: 2005. 5. 19 / 채택일: 2005. 6. 30)