

배양액과 삼투압이 돼지 난포란의 성숙과 단위발생란의 발육에 미치는 영향

김민경 · 권대진 · 박춘근 · 양부근 · 정희태[†]

강원대학교 동물자원과학대학

초 록

본 연구는 배양액의 종류에 따른 돼지 난자의 성숙 및 단위발생란의 배반포 형성율을 검토하였으며, 배양액의 삼투압과 발달 시기에 따른 배양액의 삼투압 변화가 돼지 단위발생란의 발달에 미치는 영향을 검토하였다. 실험 1에서 난포란을 NCSU-23, mWM 및 mKRB에 각각 성숙배양한 결과 성숙률은 62.1~71.3%로 배양액에 따른 차이가 없었다. 실험 2에서는 각각의 배양액으로 성숙된 난자를 활성화 처리 후 동일한 배양액으로 6일간 배양하여 발달율을 검토한 결과, 배반포 발육율은 NCSU-23에 배양 시 22.9%로 타 그룹(0~0.6%)보다 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 실험 3에서는 단위발생란을 NaCl 양에 의해 256, 280 및 300 mOsm(mOsm)로 조정된 NCSU-23에 6일간 배양한 결과, 배반포 발육율은 11.0~14.4%로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었으나 삼투압이 낮을수록 난자의 fragment 비율이 높게 나타났다($P<0.05$). 실험 4에서는 단위발생란을 삼투압이 조정된 세 종류의 NCSU-23에 48시간 배양한 후 삼투압이 높거나 낮은 NCSU-23으로 옮겨 4일간 추가 배양한 결과, 배반포 형성율은 배양 48시간 후에 배양액의 삼투압을 낮춰 주었을 때(21.0%)가 높여 주었을 때(11.8%) 보다 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 본 실험의 결과는 돼지 단위발생란의 발육이 배양액의 종류 및 삼투압에 의해 영향을 받으며, 배양액의 삼투압은 돼지 단위발생란의 발육 단계별로 영향을 주어, 초기에는 높은 삼투압의 배양액에서 배양하고 일정 시간 후 낮은 삼투압의 배양액으로 배양함으로써 발육이 증진될 수 있음을 시사한다.

(주제어 : Parthenigenetic embryos, *In vitro* culture, Osmolality, Porcine)

서 론

난포란의 체외 성숙, 수정 및 배양은 가축의 효율적인 번식과 DNA 도입을 통한 형질전환 동물, 복제 동물 등의 생산에 효과적으로 이용할 수 있다. 현재 실험동물뿐 아니라 여러 종의 동물 중에서 난포란의 체외 성숙 및 수정, 배양을 통한 배아이식으로 산자 생산이 되고 있으나, 돼지에서는 체내에서 성숙 및 수정된 배아보다 체외에서 성숙 및 수정된 배아의 발달율이 낮아 돼지 체외수정란 이식에 의한 산자 보고는 다른 동물 종에 비해 적다. Niwa (1993)는 체외에서 성숙된 돼지 난자의 불완전한 세포질 성숙이 낮은 초기배 발달의 원인이라 하였으며, Wang 등 (1997)은 체외 성숙 배양액이 돼지 난자의 세포질의 성숙에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. Funahashi 등 (1994a)은 체외에서 생산된 1세포기 난자를 동물의 난관에 이식 시 배반포의 세포 수 증가와 같은 난자의 질이 향상되는 것으로 보아 체외배양조건이 난자의 질에 영향을 미치는 것으로 보고하였다.

체외에서의 초기배 발달에 영향을 미치는 여러 요인 중 하나로 체외배양액의 삼투압을 들 수 있다. 적절한 삼투압은 동물 종별로 다를 뿐만 아니라 수정란의 발달 단계

에 따라서도 다르다. 1세포기 수정란에 적합한 삼투압은 토끼에서 250~270 mOsm(Liu와 Foot, 1995), 랫에서는 212~276 mOsm(Miyoshi 등, 1995)이며, 햄스터는 250~325 mOsm(Mckiernan과 Bavister, 1990), 그리고 마우스는 272~280 mOsm(Lowittes와 Biggers, 1991)로 알려져 있다. 또한 랫에서는 삼투압이 304 mOsm인 배양액에서 배아 발달이 저해된다고 보고되었으며(Miyoshi 등, 1994), 토끼에서는 접합자가 2세포기 배아보다 NaCl에 의한 삼투압에 예민하여 배양액 내 NaCl의 농도를 낮추거나(40 mM) 높일(116 mM) 경우 배반포 형성이 저해된다고 하였다(Li와 Foot, 1996). 소에 있어서 수정란의 배양시 Cl⁻량과 삼투압 모두 중요하게 작용하며(Lim 등, 1994), 배양액의 NaCl 농도를 95 mM 이하, 배양액의 삼투압을 250~270 mOsm로 조절하여야 한다고 알려져 있었으나(Liu와 Foot, 1996), 최근 소 난자를 등장액(280 mOsm)보다 저장액(245 mOsm)에 배양할 때 배반포 형성이 향상되는 것으로 나타났다(Duque 등, 2003). 마우스의 경우, 배양액 내 높은 NaCl 농도(125 mM)는 mRNA의 합성 및 안정성을 떨어뜨리며 단백질 합성 양상의 변화를 유도할 뿐만 아니라 체외 배 발달을 감소시킨다(Ho 등, 1994). 돼지에 있어서 성숙 배양액내 NaCl의 농도를 줄이거나 sobitol과 같은 organic osmolytes의 첨가시 난자의 세포질 성숙이

* 본 연구는 2004년도 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구지원(300012-5)에 의해 수행되었음.

[†] Corresponding author : Dr. H. T. Cheong, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea,

E-mail: htcheong@kangwon.ac.kr

향상되는 것으로 보고되었으며(Funahasi 등, 1994b, 1996), 이후 Nguyen 등 (2003)의 실험 결과, 삼투압에 따른 배양 성적의 차이는 Na^+/K^+ 비율에 의한 것이 아닌 단순히 삼투압의 차이에 의한 것으로 나타나, NaCl 농도에 따른 배양액의 삼투압 차이가 돼지 초기배 발달에 영향을 미치는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 삼투압이 다른 배양액을 이용하여 배양액의 종류에 따른 돼지 난자의 성숙 및 단위발생란의 배반포 형성율을 검토하였으며, 배양액의 삼투압과 발달 시기에 따른 배양액의 삼투압 변화가 돼지 단위발생란의 발육에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

난자의 회수

도축장에서 도축한 직후 회수한 난소를 32~35°C의 생리식염수(0.9% NaCl)에 넣어 3시간 내에 실험실로 운반하였다. 실험실에서 약 37°C 생리식염수로 난소를 3회 이상 세척한 뒤 직경 5 mm 내외의 난포에서 18 gauge 주사침이 부착된 10 mL 주사기로 흡인하여 채란하였다. 흡인된 난포란을 TL-Hepes(114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM NaHCO_3 , 0.4 mM $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10.0 mM Na-lactate, 2.0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.0 mM Hepes)로 3회 세척하여 실제 현미경 하에서 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 난자만을 선별하여 실험에 공시하였다.

난자의 체외성숙

난포란의 체외성숙에는 mWM(modified Whitten medium), NCSU-23(North Carolina State University-23) 및 mKRB(modified Krebs's ringer bicarbonate medium) 배양액을 사용하였다. 체외성숙 배지는 10% PFF(porcine follicular fluid)와 호르몬(10 IU/mL PMSG, 10 IU/mL hCG)이 첨가된 배양액(실험 1, 2 : mKRB, mWM, NCSU-23; 실험 3, 4: NCSU-23)을 4-well dish에 well 당 500 μL 씩 넣고, 각 well 당 100~150개의 난구세포-난자 복합체를 넣어 39°C, 5% CO_2 조건 하에서 22시간 동안 배양한 뒤 호르몬을 첨가하지 않은 동일한 배양액 내로 옮겨 22시간 동안 성숙배양하였다.

난자의 활성화 처리

체외 성숙시킨 난포란을 0.1% hyaluronidase가 들어 있는 원심관에 옮겨 vortex mixer로 4분간 처리하여 난구세포를 제거한 후, 세포질의 색조가 균일하고 제1극체가 확인된 난자만을 성숙된 난자로 판단하여 실험에 공시하였다. 난자의 활성화를 유도하기 위하여 BTX200 세포융합장치(BTX, San Diego, CA, USA)를 이용하여 성숙된 난자를 0.1 mM MgSO_4 , 0.5 mM CaCl_2 , 0.01%(w/v) PVA가 첨가된 0.3 M mannitol 용액을 넣은 1.0 mm 폭의 wire chamber의 양 전극 사이로 옮긴 후, 1.5 kV/cm의 직류(DC)전류를 30 μsec 간 1회 통전하였다. 통전 후 즉시 2 mM 농도의 6-dimethylaminopurin(6-DMAP, Sigma, St-

Louis, MO, USA)이 첨가된 배양액(실험 2: mKRB, mWM, NCSU-23; 실험 3, 4: NCSU-23)의 drop 내로 옮겨 4시간 동안 배양하였다.

난자의 체외배양

활성화 처리한 난자를 체외 배양액 50 μL 의 소적에 10~15개씩 넣어 39°C, 5% CO_2 조건하에서 6일간 배양하였다. 체외 배양액으로는 mKRB, mWM, NCSU-23 배양액에 4mg/mL BSA를 첨가하여 사용하였으며, 실험 3과 4에서는 NaCl 량으로 삼투압을 조절한 NCSU-23(256 mOsm, 102.84 mM NaCl; 280 mOsm, 115.57 mM NaCl; 300 mOsm, 130.00 mM NaCl) 배양액을 사용하였다.

배반포의 세포수 검사

배양 6일째 형성된 배반포는 2mg/mL 농도의 Hoechst33342로 15분간 염색한 다음 vaseline과 paraffin 혼합물(9:1)로 사각에 소적을 배치한 slide glass 위에 소량의 배양액과 함께 옮겨놓고 cover glass로 가볍게 압착하여 형광현미경 하에서 세포 수를 검사하였다.

실험 설계

실험 1. 체외배양액에 따른 돼지 난포란의 체외 성숙

배양액에 따른 성숙율을 검토하기 위하여 NCSU-23, mKRB, mWM을 이용하여 미성숙란을 44시간 동안 성숙 배양한 후 난자의 체외성숙율을 검사하였다.

실험 2. 체외배양액에 따른 돼지 단위발생란의 체외 발육

배양액에 따른 단위발생란의 체외발육율을 검토하기 위하여 성숙된 난자를 활성화 처리 후 NCSU-23, mKRB, mWM을 이용하여 6일간 배양하여 배반포 형성율 및 세포수를 검사하였다.

실험 3. 배양액의 삼투압에 따른 돼지 단위발생란의 체외 발육

배양액의 삼투압이 발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 성숙된 난자를 활성화 처리한 후 NaCl 량으로 삼투압을 조절한 NCSU-23(256, 280 및 300 mOsm) 배양액으로 6일간 배양하여 배반포 형성율 및 세포수를 검사하였다.

실험 4. 배양액의 삼투압 변화에 따른 돼지 단위발생란의 체외 발육

단위발생란의 체외배양 시 삼투압의 변화에 따른 발육율을 검토하기 위하여 실험 3의 방법으로 배양을 시작한 후, 배양 48시간째에 삼투압이 서로 다른 배양액으로 교체하여 4일간 추가 배양하여 배반포 형성율 및 세포수를 검사하였다.

통계처리

실험의 결과는 SAS(Statistical Analysis System)의 GLM(Generalized Linear Model)을 이용하여 통계분석을 실시하였고, 모든 처리평균 간의 차이는 Duncan's multi-

ple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

체외배양액에 따른 돼지 난포란의 체외성숙

배양액에 따른 돼지 난포란의 체외성숙율을 검토한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 난자의 성숙률은 62.1~71.3%로 배양액에 따른 차이가 없었으며 퇴화된 난자의 비율 역시 14.2~17.7%로 배양액에 따른 차이가 없었다.

체외배양액에 따른 돼지 단위발생란의 체외발육

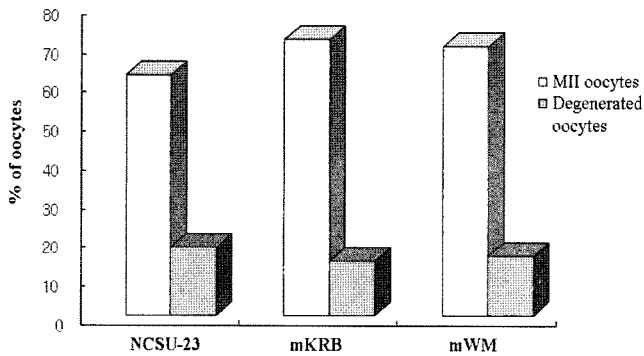


Fig. 1. Effect of culture medium on maturation rate of porcine oocytes.

활성화 자극 후 배양 48시간째 정상적인 난할 양상을 보인 단위발생란은 mKRB로 배양 시 82.9%로 나타나 NCSU-23(75.0%)와 mWM(77.1%)을 이용한 실험군보다 다소 높았으나 유의적 차이는 없었다(Table 1). 배반포로 발달한 단위발생란의 비율은 NCSU-23에 배양 시 22.9%로 mKRB 및 mWM에서 배양시(0~0.6%)보다 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$).

배양액의 삼투압에 따른 돼지 단위발생란의 체외발육

배양액의 삼투압을 300, 280 및 256mOsm로 조정하여 단위발생란의 체외 발육율을 검토한 결과, 분할율 및 배반포 발육율은 각각 58.3~69.6%와 11.0~14.4%로 유의적인 차이가 없었다. 그러나 fragment 비율은 배양액의 삼투압이 낮을수록 증가하였다(Table 2).

배양액의 삼투압 변화에 따른 돼지 단위발생란의 체외발육

배양 48시간째에 정상적 난할을 보인 난자의 비율은 모든 실험군에서 유의적인 차이가 없었으나(65.9%~81.4%) fragment된 난자의 비율은 배양 48시간에 배양액의 삼투압을 낮춰준 군(6.4%)이 삼투압을 높여준 군(21.8%)에 비해 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 배반포 형성율은 배양 48시간에 배양액의 삼투압을 낮춰 주었을 때(21.0%)가 높여 주었을 때(11.8%)보다 유의적으로 높게 나타났으며($P<0.05$), 배반포의 세포수도 삼투압을 낮춰 주었을 때(23.1개)가 삼투압을 높여주었을 때(20.4개)보다 유의적으로 높았다($P<0.05$). 삼투압을 낮춰준 실험군과 높여준 실험군 내에서는 유의적인 차이가 없었다(Table 3).

Table 1. Effect of culture medium on *in vitro* development of parthenogenetic porcine oocytes

Culture medium	No. of activated oocytes	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of fragmented embryos	Cell No. in blastocyst (Mean±SE)
		2-Cell	Blatocysts		
NCSU-23	144	108(75.0)	33(22.9) ^a	19(13.2)	22.8±1.4 ^a
mKRB	181	150(82.9)	0 ^b	22(12.2)	-
mWM	157	121(77.1)	1(0.6) ^b	30(19.1)	14.0 ^b

^{a,b} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 2. Effect of osmolarity of culture medium on *in vitro* development of parthenogenetic porcine oocytes

Osmolarity (mOsm)*	No. of activated oocytes	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of fragmented embryos	Cell No. in blastocyst (Mean±SE)
		2-Cell	Blatocysts		
300	237	165(69.6)	34(14.4)	14(5.9) ^b	22.1±1.5
280	271	171(63.1)	38(14.0)	44(16.2) ^{ab}	19.7±1.0
256	218	127(58.3)	24(11.0)	46(21.1) ^a	20.0±1.4

* Activated oocytes were cultured in NCSU-23 with adjusted osmolarity from 256~300 mOsm by addition of NaCl.

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 3. Effect of change of osmolarity of culture medium on *in vitro* development of parthenogenetic porcine oocytes

	Osmolarity (mOsm)	No. of activated oocytes	No. (%) of embryos developed to		No. (%) of fragmented embryos	Cell No. in blastocyst (Mean±SE)
			2-Cell	Blatocysts		
High → Low	300-256	151	101(66.9)	29(19.2) ^a	6(4.0) ^a	22.2±1.0 ^{ab}
	300-280	171	134(78.4)	36(21.1) ^a	13(7.6) ^{ab}	24.7±1.5 ^a
Low → High	280-256	145	118(81.4)	33(22.8) ^a	11(7.6) ^a	21.9±1.4 ^{ab}
	Total	467	353(75.6)	98(21.0) ^A	30(6.4) ^A	23.1±0.8 ^A
Low → High	280-300	131	89(67.9)	12(9.2) ^b	22(16.8) ^{ab}	18.2±2.3 ^b
	256-280	197	130(66.0)	32(16.2) ^{ab}	50(25.4) ^b	22.0±1.6 ^{ab}
High → Low	256-300	173	114(65.9)	15(8.7) ^b	37(21.4) ^{ab}	18.9±1.4 ^b
	Total	501	333(66.5)	59(11.8) ^B	109(21.8) ^B	20.4±1.1 ^B

^{a,b} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

^{A,B} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

고찰

본 실험에서 돼지 난자 배양에 쓰이는 배양액 중 NCSU-23, mWM, mKRB 배양액을 이용하여 배양액의 종류에 따른 돼지 난자의 성숙 및 배반포 형성율을 검토한 결과, 배양액에 따라 성숙율에는 차이가 없었으나, 이후 배반포 형성율에 있어서는 NCSU-23 배양액에서 배양 시 mWM이나 mKRB 배양액에서 배양했을 때보다 유의적으로 높아 배양액에 따라 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. Wang 등(1997)은 다양한 배양액을 이용하여 체외 성숙 및 체외수정란의 발육율을 비교한 결과, MPN(male pronucleus) 형성율에는 차이가 없어 난자의 성숙에는 차이가 없었지만 이후 배양 시 배양액에 따라 배반포까지의 발육에 차이가 있어 배양액이 돼지 초기배 발육에 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 그러나 이러한 체외배양에서 얻어진 배반포는 난관에서 배양한 배반포보다 적은 수의 세포로 이루어져 있어(Funahasi 등, 1994a) 보다 적합한 체외 배양조건의 확립이 필요한 것으로 사료된다.

돼지 난자의 체외성숙배양 시 cysteine의 첨가는 세포질 내 glutathione의 합성을 증가시킨다(Yoshida, 1993). 또한 cysteine이 첨가된 배양액에서 성숙된 난자는 MPN형성과 이후 배반포로의 발육이 향상되어 세포내 glutathione의 농도가 돼지 체외성숙란의 발육능에 연관되어 있는 것으로 보인다(Abeydeera 등, 1998). 그러나 Wang 등(1997)은 서로 다른 배양액(TCM-199, mWM, NCSU-23)에 동일한 양의 cysteine를 첨가하여 체외 성숙 및 수정 후 NCSU-23 배양액에서 배양한 결과 배반포 발육율에 차이가 있어 배양액에 따라 발육율이 달라지는 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험에서 cysteine이 첨가되어 있는 NCSU-23 배양액으로 배양시 초기배 발달이 가장 높게 나타났지만 이러한 차이가 cysteine 첨가에 기인된다고만은 볼 수 없다.

발육율에 차이를 보이는 또 다른 원인으로 배양액의 삼투압을 들 수 있을 것이다. 배양액의 삼투압은 NaCl의 농도에 따라 크게 달라지는데, 초기배 배양액내 NaCl의 증가는 glucose 대사를 pentosephosphate-pathway에서 glycolytic pathway로 전환시킴으로써 Crabtree effect로 알려져 있는 세포 호흡의 방해로 인해 배아의 glucose 이용능력을 변하게 하며 세포 성장 및 DNA 합성을 저해한다(Leese, 1990). 또한 배양액내 NaCl의 농도는 세포질 내 glutathione 농도를 변화시켜 MPN 형성에 영향을 미치며(Funahasi 등, 1994c), 돼지 수정란의 체외발육능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Beckmann과 Day, 1993). 본 실험에서 배양액의 삼투압(259-300 mOsm)과 NaCl(102.8~130.0 mM)의 농도에 따른 돼지 단위발생란의 배반포 형성율을 검토한 결과 처리군 간에 차이가 없었다. 따라서 실험 2에서의 발육율의 차이는 배양액의 차이에 의한 것으로 여겨진다. 그러나 발육율에서는 차이가 없었으나 배양액의 삼투압이 낮아질수록 비정상적으로 분할되는 난자의 비율이 높아졌다. Fragmentation은 세포의 apoptosis와 관련이 있으며(Juriscova 등, 1996; Hao 등, 2003), 적절하지 못한 배양조건이 fragmentation의 한 원인으로 알려져 있다(Dumoulin 등, 1991). 돼지 초기배 배양에 있어서 저삼투압 배양액이 초기배 발달에 효과적인 것으로 알려져 있었으나(Funahashi 등, 1994b), Nguyen 등(2003)은 돼지 초기배를 저삼투압 배양액에서 배양 시 분할 및 상실배로의 발달을 억제하지만 배양 48시간 이후부터 저삼투압 배양액에 배양 시 상실배의 포배강 형성능력을 증진시켜 배반포 형성을 유도한다고 보고하였다. 본 실험에서는 Nguyen 등(2003)과는 달리 배양 초기 4시간까지는 삼투압이 서로 다른 모든 실험군 간에 발육양상의 차이를 보이지 않았으나 48시간 이후 그 이전보다 배양액의 삼투압을 낮춘 실험군이 삼투압을 높여준 실험군보다 상대적으로 배반포 형성율이 높았다. 이와 같은 결과는 배양액의 삼투압이 돼지 단위발생란의 발육

단계별로 영향을 주어, 초기에는 높은 삼투압의 배양액에서 배양하고 일정 시간 후 낮은 삼투압의 배양액으로 배양함으로써 발육능이 증진될 수 있음을 보여준다.

Effects of Culture Medium and Osmolarity on *In Vitro* Maturation of Follicular Oocytes and Development of Parthenogenetic Embryos in Porcine

M. K. Kim, D. J. Kwon, C. K. Park, B. K. Yang
and H. T. Cheong

College of Animal Resource Sciences, Kangwon National University

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of culture medium, and the osmolarity and osmotic change of the culture medium on *in vitro* maturation of porcine oocytes and development of porcine parthenogenetic embryos. In Experiment 1, cumulus-oocyte complexes were matured in NCSU-23, mWM and mKRB, respectively. There was no difference in maturation rate(62.1~71.3%) among groups. In Experiment 2, matured oocytes in each medium were activated and cultured for 6 days in the same media. Blastocyst formation rate was higher in NCSU-23(22.9%) than those of others(0~0.6%, $P<0.05$). In Experiment 3, parthenogenetic embryos were cultured for 6 days in NCSU-23 with different osmolarity(300, 280 and 256 mOsmols) adjusted by NaCl. There were no differences in development rates to the blastocyst stage(11.0~14.4%) among groups. In Experiment 4, activated oocytes were cultured for 2 days in NCSU-23 with 300, 280 and 256 mOsmols and then transferred to increased or decreased osmotic condition. Blastocyst formation rate was higher in a group which was transferred from the higher osmotic condition to the lower osmotic condition(21.0%) than a contrary group(11.8 %, $P<0.05$). This result shows that the culture medium and the osmolarity of the culture medium affect the development of porcine parthenogenetic embryos, and the change of osmolarity from the higher condition to the lower condition at a certain developmental stage can enhance the development of porcine parthenogenetic embryos.

(Key words: Parthenogenetic embryos, *In vitro* culture, Osmolality, Porcine)

인용문헌

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN (1998): Presence of β -mercaptoethanol 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.
2. Beckmann LS, Day BN (1993): Effect of media NaCl concentration and osmolarity on culture of the early stage porcine embryo and viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 39:611-622.
3. Dumoulin JC, Menheere PP, Evers JL, Kleukers AP, Pieters MH (1991): The effects of endotoxins on gametes and pre implantation embryos cultured *in vitro*. *Hum Reprod* 6:730-734.
4. Duque P, Hidalgo CO, Gomez E, Pintado B, Facal N, Diez C (2003): Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development. *Reproduction, Nutrition, Development* 43:487-496.
5. Funahashi H, Stumpf TT, Terlouw SL, Cantley TC, Rieke A, Day BN (1994a): Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 41:1425-1433.
6. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994b): Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 51(4):633-639.
7. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994c): *In vitro* development of *in vitro*-matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 50:1072-1077.
8. Funahashi H, Kim NH, Stumpf TT, Cantley TC, Day BN (1996): Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 54:1412-1419.
9. Hao YH, Lai LX, Mao J, Im GS, Bonk A, Prather RS (2003): Apoptosis and *in vitro* development of preimplantation porcine embryos derived *in vitro* or by nuclear transfer. *Biol Reprod* 69:501-507.
10. Ho Y, Doherty AS, Schultz RM (1994): Mouse preimplantation embryo development *in vitro*: Effect of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. *Mol Reprod Dev* 38:131-141.
11. Jurisicova A, Varmusa, S Casper SF (1996): Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 2:93-98.
12. Koobs DH (1972): Phosphate mediation of Crabtree and Pasteur effects. *Science* 178:127-133.
13. Leese HJ (1990): The energy metabolism of the preimplantation embryo. In: Susan Heyner and Lynn M. Wiley(ed.) *Early embryo development and paracrine relationships*. Proceedings of a UCLA Symposia Colloquium 177:67-78.
14. Li J, Foote RH (1996): Differential sensitivity of one-cell and two-cell embryos to sodium chloride and total osmolarity during culture into blastocysts.

- J Reprod Fertil 108:307-312.
15. Lim JM, Kim JH, Okuda K, Niwa K (1994): The importance of NaCl concentration in a chemically defined medium for the development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology 421-432.
 16. Liu Z, Foote RH (1995): Effect of inositol and glycine with increasing sodium chloride and constant osmolarity on development of rabbit embryos. Assist Reprod Genet 12:141-146.
 17. Liu Z, Foote RH (1996): Sodium chloride, osmolyte, osmolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization(IVF), cultured in simple serum-free media. J Assist Reprod Genet 13:562-568.
 18. Lowittes JA, Biggers JD (1991): Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. Biol Reprod 45: 245-251.
 19. Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K, Niwa K (1994): Development of rat one-cell embryo in a chemically defined medium : effects of glucose, phosphate and osmolarity. J Reprod Fertil 100:21-26.
 20. Miyoshi K, Abeydeera LR, Okuda K, Niwa K (1995): Effects of osmolarity and amino acid in a chemically defined medium on the development of rat one-cell embryos. J Reprod Fertil 103:27-32.
 21. Mckiernan SH, Bavister BD (1990): Environmental varriables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. Biol Reprod 43:404-413.
 22. Nguyen VT, Kure-bayashi S, Harayama T, Miyake M (2003): Stage-specific effects of the osmolarity of a culture medium on the development of parthenogenetic diploids in the pig. Theriogenology 59:719-734.
 23. Niwa K (1993): Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. J Reprod Fertil Suppl 48:49-59.
 24. Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN (1997): Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. J Reprod Fertil 111:101-108.
 25. Yoshida M (1993): Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. Mol Reprod Dev 35:76-81.
- (접수일자: 2005. 7. 26. / 채택일자: 2005. 8. 16.)