

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 β -mercaptoethanol의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 Glutathione 수준에 미치는 영향

오신애* · 김창근*** · 정영채* · 장유민*** · 방명걸***

중앙대학교 산업과학대학 동물자원과학과*, 중앙대학교 생명환경연구원**

Effect of β -Mercaptoethanol Supplement during *In Vitro* Maturation on IVM, IVF and Glutathione Level in Porcine Oocytes

Shin-Ae Oh*, Chang-Keun Kim***, Yung-Chai Chung*, Yoo-Min Chang***

and Myung-Geol Pang***

Department of Animal Science & Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University*, and
BET Research Institute, Chung-Ang University**

ABSTRACT

Experiments were conducted to determine the effects of beta-mercaptoethanol (β -ME) supplements to the *in vitro* maturation (IVM) medium on *in vitro* fertilization (IVF) and intracellular glutathione (GSH) concentration. Porcine cumulus-intact oocytes were matured in TCM-199 medium containing porcine follicular fluid, sodium pyruvate, D-glucose, FBS, hormonal supplements, and β -ME (0, 25, 50 and 100 μ M) for 36 to 46h. After culture, cumulus-free matured oocytes were co-incubated with epididymal spermatozoa for 18h. There were no significant differences in the maturation rate among treatment groups. However, increases ($P < 0.05$) in intracellular GSH concentration before and after fertilization were observed in 50 μ M β -ME supplements to the IVM medium. Also, increases ($P < 0.05$) in male pronuclear formation after IVF were observed in same treatment group. In conclusion, supplementing β -ME into the IVM medium increased intracellular GSH concentrations and increased fertilization *in vitro*.

(Key words : β -Mercaptoethanol, Glutathione, IVM, IVF, Porcine oocyte)

I. 서 론

돼지에서 미성숙 난포란을 이용한 체외성숙과 체외수정의 연구는 다른 동물에 비하여 늦게 이루어졌으며 수정란 이식에 의한 산자는 Mattioli 등(1989)에 의해 처음 보고되었다. 돼지 난자의 성숙과정이 타 동물에 비하여 길고 체외수정 시 다정자 침입율이 높고, 융성 전핵 형성율이 낮으며 4세포기의 체외발육

정지현상(*in vitro* cell-block)이 나타나 체외수정란의 효용성을 감소시키고 있다(Jarrell 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992). 이를 해결하는 하나의 수단으로서 도축된 개체의 난소에서 채취된 다수의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙배양, 수정시켜 이용하고자 하는 방법들이 다각적으로 검토되고 있다. 돼지에서도 난포란을 이용한 체외수정란 생산을 위한 연구가 수행되어 왔으며 핵 성숙과 세포질 성숙을

Corresponding author : Myung-Geol Pang, Department of Animal Science & Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansung-Si, Kyunggi-Do 456-756, Korea. Tel: (031)670-4841, Fax: (031)675-9001, E-mail: mgpang@cau.ac.kr

동시에 유기하여 미성숙 난포란의 성숙율과 수정율을 높이고 양질의 수정란을 생산할 수 있는 방법들이 제시되고 있다 (Wang과 Day, 2002; Abeydeera, 2002; Whitake과 Knight, 2004, 장 등, 2004).

세포 내 존재하는 Glutathione(GSH)은 주요한 비 단백질 sulfhydryl 화합물로 세포를 활성산소의 영향으로부터 보호하는 역할을 수행하며(Nasr-Esfahani 등, 1991; Takahashi 등, 1993; Lafleur 등, 1994), 난자 성숙기간 동안 GSH의 합성은 정자 침입 후 응성전핵의 형성을 위해 필요하다고 보고되었다(Perreault 등, 1988; Yoshida 등, 1992; Zuelke 등, 2003). 성숙배양된 돼지 난포란이 수정 후 응성전핵의 형성능력에 유의하게 영향을 주는 물질이 GSH이며 GSH 전구물질은 응성전핵의 형성을 위해 필요한 것으로 보고되어 있다(Yoshida 등, 1992, 1993). 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 GSH의 전구물질인 cysteine 함유물로서 β -ME를 첨가하여 배양하는 것이 체외성숙과 체외수정 후 배발달을 증진시키는 것으로 보고된 바 있다(Yoshida, 1993; Li와 Foote, 1993; Lafleur 등, 1994; Abeydeera 등, 1999). 이것은 돼지 난포란의 성숙과 수정 과정에서 GSH의 역할에 대한 아주 작은 정보일 뿐이며 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙과 체외수정에 미치는 β -ME의 효과에 대하여는 폭넓은 연구가 진행되어야 한다.

이에 본 연구는 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 β -ME를 배양액에 첨가할 경우 체외성숙율과 체외수정 시 응성전핵의 형성 및 세포질 내 GSH 합성 수준에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취

본 실험에서 사용된 난포란은 도축 직후, 성숙 모돈에서 적출한 난소로부터 채취하였다. 도살 직후 적출한 난소를 2~3시간 이내

에 실험실로 운반한 후, 미성숙 난포란의 채취는 3~5 mm의 난포를 선별하여 난포내의 미성숙 난포란을 흡입, 채취하였다. 채취한 난포액을 100 IU/ml penicillin G가 함유된 TCM-199 배양액 (0.1 g/l L-glutamine, 2.2 g/l sodium bicarbonate, 25mM HEPES buffer)과 희석하여 실체현미경 하에서 난구세포의 부착상태가 전체적으로 치밀하고 균일하게 부착되어 세포질의 상태가 양호한 것을 회수하여 실험에 사용하였다.

2. 난포란의 체외성숙

돼지 미성숙 난포란은 TCM-199 배양액에 100 IU/ml penicillin G, 10% FCS, 0.9 mM sodium pyruvate, 0.35 mM D-glucose 그리고 10% pFF(pig follicular fluid)를 첨가하였다. 호르몬은 각각 FSH(5 IU), estradiol-17 β (10 IU) 그리고 hCG(10 IU)를 첨가하였다. pFF의 제조는 난포란의 채란 시 회수한 난포액을 1500 \times g, 30분, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리한 후 상층액만 취하여 0.2 μ m pore filter를 이용하여 여과시킨 후 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관, 실온에서 용해하여 사용하였다.

돼지 미성숙 난포란의 체외성숙율을 조사하기 위하여 체외성숙 배양액에 각각 0(control), 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M 농도의 β -ME를 첨가하여 25 μ l의 미세소적을 만든 뒤 mineral oil을 피복하고, 각 소적마다 난자를 10~15개씩 옮겨놓은 후 39 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂ 배양기에서 36시간과 46시간 배양하여 체외성숙을 유기시킨 후 제 1 극체의 유무를 확인하여 배양시간에 따른 체외성숙율을 비교하였다.

3. 난포란의 체외수정

체외수정용 기본 배양액으로는 TCM-199 배양액에 0.91 mM sodium pyruvate, 3.05 mM D-glucose, 2.92 mM calcium lactate, 10% FCS를 첨가하고 정자의 수정능획득 유기물질로

2 mM caffeine과 10 IU heparin을 첨가하여 사용하였다. 체외수정을 위한 정자의 준비는 돼지정자는 도축장에서 도살직후 분리해낸 정소상체의 미부를 2~3회 세척한 후 4 °C의 보온병에 보관하여 2시간 이내 실험실로 운반한 다음 정소상체 미부를 다시 생리 식염수로 2~3회 세척하였다. 37 °C 항온실에서 정소상체 미부의 표피를 절개하고 정관에서 멀리 떨어진 정소상체 하단쪽의 세정관을 잘라낸 후 정소상체 미부에 연결된 정관의 선단에 10 ml 주사기에 26-gauge 주사침을 삽입하여 주사기로 공기압력을 가해 농후정액을 채취하였다.

채취된 정액은 정장 내 수정능 억제물질을 제거하기 위해 수정능획득 유기물질이 첨가되지 않은 수정용 배양액으로 5~10배 희석하였으며 정자의 운동성을 검사한 다음, 300 × g에서 10분간 1회 원심분리를 시킨 후 상층액을 제거하였다. 같은 배양액으로 재부유 시킨 다음 300 × g에서 10분간 1회 원심분리하고 같은 방법으로 수정능획득 유기물질이 함유되어 있는 수정액으로 재부유하였다. 죽은 정자와 이물질을 제거하기 위해 140 × g에서 1분간 원심분리 하여 강제 swim-up 시킨 상층액만을 모았다. 이를 다시 300 × g에서 5분간 1회 원심분리한 후 상층액을 제거하고 양호한 활력을 갖는 정자의 농도가 5×10^6 정자/ml가 되게 재부유시켜 25 μ l의 미세소적을 만든 후 mineral oil로 피복하고 0.5~1시간 배양하였다. 배양 후 미세소적당 10~15개의 성숙란을 넣어 39 °C, 100% 습도, 95% air, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 수정시키고 융성전핵의 형성 유무를 확인하여 수정을 확인하였다.

4. 융성전핵 형성의 관찰

체외성숙/수정 후 난구세포와 정자를 제거한 후 acetic alcohol(ethanol : acetic acid = 3 : 1, v/v)에 침지시켜 24시간 이상 고정한 다음 acetic orcein으로 염색하여 전핵의 유무를 관

찰하였다.

5. 세포질 내 GSH 농도 측정

1 ml eppendorf tube에 30 μ l의 25% HPO₃ 용액을 넣고 10~30개의 난자를 넣은 후 70 μ l의 sodium phosphate-EDTA buffer를 넣어 냉동과 용해를 10회 정도 반복하여 난자를 터뜨린 다음 10,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균질화시켰다. GSH 농도 측정을 위해서 plate에 시료 10 μ l를 넣고 sodium phosphate-EDTA buffer로 48배 희석한 다음 OPT(*o*-phthaldehyde) solution을 10 μ l 넣어 시료 내 GSH와 반응할 수 있도록 37 °C에서 15분간 진탕배양 하였다.

시료 내 GSH의 반응시간이 지나면 형광흡광도분석기(floroskan, USA)을 excitation 350nm, emission 420nm에서 GSH의 농도를 측정하였다.

6. 통계처리방법

본 실험의 결과는 SAS를 이용하여 GLM (Generalized Linear Model)의 원리를 이용해 분석하였고, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test로 실시하였으며 P < 0.05일 경우 유의성을 인정하였다.

III. 결과 및 고찰

본 연구는 돼지의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙시킬 때 체외성숙배양액에 항산화물질로서 GSH 전구체이며 황화합물의 일종인 β -ME를 첨가 배양에 이용하여 체외성숙율과 수정율을 비교 검토하였으며, 체외수정 후 수정란 내 GSH의 농도를 측정하여 항산화 효과로서의 β -ME가 세포질에 미치는 영향을 검토하였다.

돼지 미성숙 난포란에서 체외성숙 시 25, 50, 100 μ M의 β -ME를 첨가하여 36시간 및 46시간 동안 5% CO₂ 농도에서 배양시켜 성숙을 유기하여 얻은 성적표 1에 요약하였다. 돼지 난포란의 성숙배양액에 25 μ M 농도

Table 1. *In vitro* maturation rates of porcine oocytes treated with various concentrations of β -mercaptoethanol (β -ME).

Concentration of β -ME (μ M)	Time of <i>in vitro</i> maturation					
	36 h			46 h		
	Cultured	No. of oocytes		Cultured	No. of oocytes	
		Matured (% , mean \pm S.E.)			Matured (% , mean \pm S.E.)	
0	360	273	(75.4 \pm 1.7) ^{ab}	315	243	(77.8 \pm 2.0) ^{ab}
25	360	287	(81.0 \pm 2.7) ^a	315	259	(82.5 \pm 1.8) ^a
50	380	283	(78.2 \pm 1.9) ^a	305	247	(81.5 \pm 1.9) ^a
100	340	231	(68.4 \pm 1.4) ^b	305	219	(77.7 \pm 5.8) ^b

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

β -ME 첨가한 실험구가 36시간(81.0%), 46시간(82.5%) 배양구 모두 다른 실험구 (0 μ M, 75.4%와 77.8%; 50 μ M, 78.2%와 81.5%; 100 μ M, 68.4%와 77.7%)보다 높은 성적을 얻었으나 유의적으로 인정되지는 않았다. 또한 100 μ M 농도 β -ME 첨가한 실험구가 25 μ M와 50 μ M 농도 β -ME 첨가한 실험구에 비하여 유의적으로 낮은 성숙율을 나타냄으로 ($P < 0.05$), 과도한 황화합물의 첨가 시 오히려 역효과가 나타남을 알 수 있었다. 미성숙 난포란의 체외성숙에 β -ME를 첨가한 보고서에서 한 등(1998)은 TCM-199액에 10 μ M β -ME 첨가에서 배양 시 높은 난핵포 붕괴를 보고하였고, 양 등(1997)은 CR1a에 50 μ M β -ME 첨가에서 유의적으로 높은 상실배 및 배반포 발달의 결과를 보고하였다. 본 연구결과와 이들의 결과에서 β -ME는 배양 중에 GSH의 합성 전구물질인 cysteine의 양을 증가시키고(de Matos 등, 1996; Kito와 Bavister 등, 1997; Sawai 등, 1997) 증가된 GSH가 세포질 내 축적되어 있다가 체외성숙 시 핵성숙을 촉진하여(한 등, 1998; Whitake과 Knight, 2004) 높은 체외성숙을 유지하는 것으로 사료된다(de Matos 등, 1995, 1996; Abeydeera 등, 1998). 또한 체외수정 시 응성전핵 형성을 증가시키고(Yoshida 등, 1993; 양 등, 1997) oxidative stress로부터 수정란을 보호하여 (Halliwell와

Gutteridge, 1992) 초기배 발달을 촉진하는 것으로 사료된다(Caamano 등, 1996).

표 2는 돼지 난포란의 체외성숙 시 첨가한 β -ME의 농도에 따른 체외수정 성적을 얻은 실험 결과로 돼지 난포란의 성숙배양액에 50 μ M농도 β -ME를 첨가한 실험구로 36시간(84.1%)와 46시간(84.2%)동안 성숙시킨 실험구에서 전핵 형성율이 가장 높게 나타났다($P < 0.05$). Abeydeera 등 (1998)이 β -ME를 25 μ M 농도 처리에서 가장 높은 전핵 형성율을 보고한 것과는 다소 차이가 있었으나 100 μ M 농도 처리에서는 본 실험의 결과와 같이 무첨가구인 대조구보다 더 낮은 전핵 형성율을 보였다. 또한 36시간과 46시간 동안의 체외성숙 후 체외수정에서 전핵 형성율에 있어서 46시간이 25 μ M와 50 μ M 농도에서 대조구보다 유의적으로 높은 결과를 보였다($P < 0.05$). Caamano 등 (1996)은 체외수정 후 100 μ M 농도의 β -ME의 첨가로 높은 상실배와 배반포기까지의 발달을 얻었다고 하였으며, de Matos 등(1995)과 Yoshida(1993)는 미성숙 난포란의 체외성숙 시 cysteamine의 첨가에서 체외수정 후 배발달율이 높다고 보고하였다. 본 연구결과에서는 β -ME가 체외수정 시 응성전핵 형성에 중요한 영향을 주는 것으로 사료된다(Abeydeera 등, 1998). 그러나 첨가 조건에 따라 차이가 있었기 때문에 최적 첨가방법을 찾기 위해서

Table 2. Effect of β -mercaptoethanol (β -ME) supplement during IVM on IVF in porcine oocytes.

Concentration of β -ME (μ M)	Time of <i>in vitro</i> maturation					
	36h			46h		
	No. of oocytes			No. of oocytes		
	Cultured	With male PN* (% mean \pm S.E.)		Cultured	With male PN* (% mean \pm S.E.)	
0	273	173 (63.4 \pm 1.2) ^c		243	174 (71.8 \pm 1.2) ^c	
25	287	227 (79.1 \pm 1.3) ^b		259	214 (82.7 \pm 1.2) ^b	
50	293	246 (84.1 \pm 0.7) ^a		247	208 (84.2 \pm 0.9) ^a	
100	231	147 (64.0 \pm 0.6) ^c		219	142 (65.1 \pm 0.7) ^d	

* PN : Pronucleus

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

는 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

돼지의 난포란에서 β -ME 농도별 난자의 GSH 수준을 표 3에 요약하였다. 난자의 체외성숙 이후에는 36시간, 46시간 처리에서 모두 50 μ M 농도에서 GSH 농도가 가장 높았으며($P < 0.05$), 체외성숙이 되지 않은 난자에 있어서는 25 μ M 농도와 50 μ M 농도에서 높은 수준을 나타내었으나 두 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 체외수정된 난자에서도 36시간 46시간 처리구 모두 50 μ M 농도에서 유의적으로 높았다($P < 0.05$). β -ME의 첨가가 세포질 내의 GSH의 합성을 높이고 체외성숙을 과 체외수정에 영향을 주고 있음을 알 수 있다 (de Matos 등, 1995, 1997; Gardiner 등, 1995;

Abeydeera 등, 1999; Whitake과 Knight, 2004). 그러나 Abeydeera 등(1998)이 체외성숙 시 25 μ M 처리에서 가장 높다고 보고한 결과는 본 실험과는 다소 차이가 있었다. 또한 체외성숙 난자보다 체외수정 난자에서 세포질 내 GSH 농도가 낮았다. 이 결과는 체외성숙 기간 동안 세포질 내에서 합성된 GSH가 세포질 내에 축적되어 있었다가 체외수정으로 GSH가 소모된 것으로 사료되며 Yoshida 등(1993)도 체외성숙 후의 GSH 수준이 체외수정 후 급격히 감소함을 보고하였다. 본 논문에서 성적은 제시되어 있지 않지만 일부 난자를 체외성숙 후 체외수정에 공시하지 않고 46시간 더 배양한 후 난세포질 내의 GSH 수준을 측정 하였을 때 체외수정 난자와는 달리 GSH의 감소가 없었다. 이러한

Table 3. GSH concentration (pmol) in porcine oocytes after *in vitro* maturation or *in vitro* fertilization.

Concentration of β -ME (μ M)	GSH in oocytes (36h IVM)			GSH in oocytes (46h IVM)		
	Unmatured (pmol, mean \pm S.E)	Matured (pmol, mean \pm S.E)	Fertilized (pmol, mean \pm S.E)	Unmatured (pmol, mean \pm S.E)	Matured (pmol, mean \pm S.E)	Fertilized (pmol, mean \pm S.E)
0	4.8 \pm 0.3 ^c	13.4 \pm 0.6 ^c	13.5 \pm 1.5 ^c	4.8 \pm 0.4 ^d	13.2 \pm 1.0 ^d	14.2 \pm 0.3 ^d
25	16.1 \pm 0.6 ^a	18.7 \pm 0.2 ^b	15.9 \pm 0.2 ^b	19.0 \pm 0.1 ^b	21.8 \pm 0.5 ^b	18.5 \pm 0.2 ^b
50	15.1 \pm 0.6 ^a	25.4 \pm 1.4 ^a	19.7 \pm 0.2 ^a	20.9 \pm 0.4 ^a	28.1 \pm 0.1 ^a	20.1 \pm 0.1 ^a
100	9.3 \pm 0.1 ^b	13.8 \pm 0.1 ^c	13.0 \pm 0.2 ^c	11.2 \pm 0.3 ^c	18.1 \pm 0.1 ^c	16.2 \pm 0.1 ^c

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

현상은 체외성숙 시 합성된 GSH 농도가 체외 수정에 의해 감소됨을 보여주었으며 한편 미수정 난자에서 감소가 없었던 것은 지속적인 GSH 합성이 일어난데 기인된 것으로 사료된다. 이 결과에서 체외성숙 시 합성된 세포질 내의 GSH 농도가 세포질 내에 축적되어 있다가 체외 수정 후 감소된 것으로 보여진다(Gruppen 등, 1995; Corsby 등, 1998). de Matos 등(1995)은 소 미성숙 난포란의 체외성숙 시 cysteamine을 첨가할 경우 무첨가구 보다 GSH 농도가 2배 이상으로 높다고 보고하였다. 또한 체외수정 후 세포질 내 GSH 합성수준을 보면 수정란의 경우 12~24시간 동안 체외성숙을 시킨 수정란에서 모두 체외성숙 난자보다 GSH 수준이 낮았다.

이상의 결과를 종합하여 보면 미성숙 난포란의 체외성숙 시 β -ME의 첨가가 세포질 내 GSH의 합성을 촉진시켜 체외성숙율과 수정율을 높이는 작용을 하는 것이 간접적으로 증명되었다.

IV. 요약

본 연구는 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙 시 β -mercaptoethanol(ME)의 첨가가 체외성숙, 체외수정 후 응성전핵의 형성 및 세포질 내의 glutathione의 수준에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다. 체외성숙 시 25 μ M의 β -ME를 첨가한 경우 다른 처리구에 비하여 성숙율이 약간 증가하는 것으로 나타났으며 36시간 체외성숙(81.0%) 보다 46시간 체외성숙(82.5%)에서 높은 성숙율을 나타냈다. 체외수정후 응성전핵 형성에 있어서는 50 μ M의 β -ME 첨가구에서 가장 높게 나타났으며($P < 0.05$), 36시간 체외성숙(84.1%) 보다 46시간 체외성숙(84.2%)에서는 유의적 차이가 나지 않았다. Glutathione의 수준은 체외성숙 후 50 μ M의 β -ME 첨가구가 다른 처리구에 비교하여 높게 나타났으며($P < 0.05$), 36시간(25.4 pmol)보다 46시간(28.1 pmol)에서 높은 결과를 보였다. 체외수정 후 응성전핵이 형성된 다음

세포질 내 glutathione의 수준 역시 50 μ M의 β -ME 첨가구에서 가장 높은 결과를 나타냈으며, 36시간 체외성숙(19.7 mol)보다 46시간 체외성숙(20.1 pmol)에서 유의적으로 높은 결과를 나타냈다($P < 0.05$).

V. 사 사

이 논문은 2004년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

VI. 인용 문헌

1. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Prather, R. S. and Day, B. N. 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* 50:747-56.
2. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Prather, R. S. and Day, B. N. 1999. Glutathione content and embryo development after *in vitro* fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote* 7:203-10.
3. Abeydeera, L. R. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology* 57:256-73.
4. Caamano, J. N., Ryoo, Z. Y., Thomas, J. A. and Youngs, C. R. 1996. β -mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro* matured / *in vitro* fertilized embryos. *Biol. Reprod.* 55:1179-84.
5. Corsby, I. M., Gandolfi, F. and Moor, R. M. 1998. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 82:769-75.
6. de Matos, D. G., Furnus, C. C., Moses, D. F. and Baldassarre, H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 42:432-6.
7. de Matos, D. G., Furnus, C. C., Moses, D. F., Martinez, A. G. and Matkovic, M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45:451-7.

8. de Matos, D. G., Furnus, C. C. and Moses, D. F. 1997. Gluta-taurine synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 57:1420-5.
9. Gardiner, C. S. and Donale, D. J. 1995. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 318, 1:30-6.
10. Grupen C. G., Nagashima, H. and Nottle, M. B. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 53:173-8.
11. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1992. Free radicals in biology and medicine. Clarendin Press Oxford.
12. Jarrell, V. L., Day, B. N. and Prather, R. S. 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 synthesis. *Biol. Reprod.* 44:62-8.
13. Kito, S. and Bavister, B. D. 1997. Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotropin, amino acid and cysteamine. *J. Reprod. Fertil.* 110:35-46.
14. Lafleur, M. V., Hoorweg, J. J., Joenje, H., Westmijze, E. J. and Retel, J. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic. Res.* 21:9-17.
15. Li, J. and Foote, R. H. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. *J. Reprod. Fertil.* 98:163-7.
16. Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeuti, G. and Seren, E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology.* 31:1201-8.
17. Nasr-Esfahani, M. H and Johns, M. H. 1991. Origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. *Development* 113:551-60.
18. Perreault, S. D., Barbee, R. R., Elstein, K. H., Zucker, R. M. and Keefer, C. L. 1988. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed *in vivo* by sperm microinjection and *in vitro* by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 39:157-67.
19. Sawai, K., Funahashi, H. and Niwa, K. 1997. Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biol. Reprod.* 57:1-6.
20. Schoenbeck, R. A., Peters, M. S., Rickords, L. F., Stumpf, T. T. and Prather, R. S. 1992. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryo. *Biol. Reprod.* 47:1118-25.
21. Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N. and Okano, A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49:228-32.
22. Wang, W. H. and Day, B. N. 2002. Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. *Zygote* 10:109-15.
23. Whitake, B. D. and Knight, J. W. 2004. Exogenous γ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and viability parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 62:311-22.
24. Yoshida, M., Ishizaki Y., Kawagishi H., Bamba, K. and Kojima, Y. 1992. Effect of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J. Biol. Reprod.* 95:481-8.
25. Yoshida, M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 35:76-81.
26. Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M. and Pursel, V. G. 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.
27. Zuelke, K. A., Jeffay, S. C., Zucker, R. M. and Perreault, S. D. 2003. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 64:106-12.
28. 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 농도변화에 미치는 영향. 한국가축번식학회지. 21:345-53.
29. 장현용, 오진영, 김종택, 박춘근, 정희태, 김정익, 이학교, 최강덕, 양부근. 2004. 돼지 체외수정란의 체외발육에 있어 항산화제의 효과. 한국동물번식학회지. 28:77-82.
30. 한만희, 박명권, 박창식, 서길용, 이규승, 1998. β -mercaptoethanol 및 cysteine이 돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향. 한국가축번식학회지. 22:376-83.
- (접수일자 : 2005. 3. 17. / 채택일자 : 2005. 5. 6.)