

체의 배양시 생쥐난자의 성숙과 생존에 미치는 Selenium의 영향

최은진 · 홍순갑 · 김해권¹ · 윤용달² · 이준영[†]

충북대학교 생명과학부, ¹서울여자대학교 생명공학과, ²한양대학교 생명과학과

Effect of Selenium on Oocyte Maturation and Viability *in vitro* in Mouse

Eun-Jin Choi, Soon-Gab Hong, Hae-Kwon Kim¹, Yong-Dal Yoon² and Joon-Yeong Lee[†]

Department of Life Science, Chungbuk National University, ChoengJu 361-763, Korea

¹Department of Biotechnology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

²Department of Life Science, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT : The present experiment was performed to confirm the effects of selenium on maturation and viability of mouse oocyte. Maturation of oocytes was observed by microscope, Germinal vesicle breakdown(GVBD) and polar body formation(PB) were confirmed at 2.5, 13 hours after *in vitro* culture. Viability of oocytes was observed by microscope. Normal and abnormal oocytes were distinguished by morphological change *in vitro* culture for 72 hours. Glutathione(GSH) content of collected oocytes from individual stage also was measured by glutathione assay using spectrophotometer. The results obtained were as follows; The low concentration of selenium(0.005 μ g/mL~0.5 μ g/mL) increased the maturation rate of germinal vesicle(GV) oocytes to GVBD and PB oocytes. The high concentration of selenium(5 μ g/mL) decreased the maturation rate. The low concentration of selenium increased the viability rate of PB oocytes. The high concentration of selenium did not affect the viability rate. The low concentration of selenium increased the GSH content in PB oocytes. The high concentration of selenium decreased GSH content. GSH content in PB oocyte was much higher than that in GVBD oocyte. The results indicate that the low concentration of selenium increases the maturation rate by helping quality elevation of oocyte and minimizing damages of oxidative stress generated from metabolism process. The low concentration of selenium also increases the viability rate by increasing GSH content.

Key words : Mouse oocyte, Maturation, Viability, Selenium, Glutathione.

요약 : 본 실험은 생쥐 난자의 성숙과 생존에 미치는 selenium의 영향을 알아보기 위하여 수행하였다. 난자의 성숙은 현미경을 통해 관찰하였으며, 핵막 붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)와 극체 형성(polar body formation, PB)은 체외 배양 시작 후 각각 2.5, 13시간에 확인하였다. 난자의 생존은 72 시간동안 체외 배양하면서 형태학적 차이로 정상 난자와 비정상 난자를 판별하였다. 또한 각 단계별로 수집된 난자의 glutathione(GSH) 함량은 spectrophotometer를 사용하여 glutathione assay로 측정하였다. 결과는 다음과 같다; 저농도의 selenium(0.005 μ g/mL~ 0.5 μ g/mL)은 핵막 붕괴율과 극체 형성률을 증가시켰지만, 고농도의 selenium(5 μ g/mL)은 감소시켰다. 저농도의 selenium은 극체 형성 시기 난자의 생존율을 증가시켰지만, 고농도의 selenium은 대조군과 별 차이가 없었다. 저농도의 selenium은 난자내 GSH 함량을 높게 유지시켰지만, 고농도의 selenium은 GSH 함량을 감소시켰다. 또한 극체 형성 시기 난자내 GSH 함량은 핵막 붕괴 시기 난자에 비해 높았다. 본 실험으로 볼 때, 저농도의 selenium은 대사과정에서 발생하는 oxidative stress에 의한 손상을 감소시킴으로써 난자의 질적 향상을 도우며, 성숙률을 증가시키는 것으로 사료된다. 또한 저농도의 selenium은 난자내 GSH 함량을 증가시켜 극체 형성 난자의 생존율을 증가시키는 것으로 사료된다.

서론

산화적 스트레스(oxidative stress)는 체외 배양시 포유류

이 논문은 2006년 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

[†] 교신저자: 충북 청주시 흥덕구 개신동 산48, 충북대학교 자연과학대학 생명과학부. (우) 361-763, (전) 043-261-2294, E-mail: leejy@chungbuk.ac.kr

난자의 성숙, 난소의 스테로이드 합성, 황체 형성(Sabatini *et al.*, 1999; Behrman *et al.*, 2001)과 초기 배아 발생(Bladier *et al.*, 1997)을 저해하는 주된 요인 중의 하나라고 보고되었다. 대부분의 세포에는 glutathione(GSH), thioredoxin, catalase, superoxide dismutase 등과 같은 thiol compound가 존재하여 H₂O₂, lipid hydroperoxide의 농도를 감소시킴으로써 oxidative stress로부터 세포를 보호한다고 보고되었다(Thannickal and Fanburg, 2000).

Selenium은 항산화제로 작용하며, 암세포의 성장을 억제하고 암 발생을 예방하는 항암 효과가 있기 때문에 암 연구에도 유용하게 이용된다고 보고되었다(Wilson *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1996). 음식물로부터 흡수되는 selenium은 selenocystein으로 전환되어(Bock *et al.*, 1991; Stadtman, 1996) 단백질 성분을 구성하게 되며, selenocystein이 함유된 단백질을 통칭 selenoprotein이라 한다. Selenoprotein은 생물체의 대사과정에서 다양한 역할을 하는데, 그중 일부는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 증가와 세포내 thiol compound의 감소로 인해 발생하는 oxidative stress에 대해 효과적으로 반응하는 항산화 방어 기작(antioxidant defense mechanism)에 관여하는 것으로 보고되었다(Bjornstedt *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1992). Cytosolic glutathione peroxidase는 4개의 glutathione peroxidase 가운데 가장 먼저 확인된 selenoprotein(Flohe *et al.*, 1973)으로 세포내 과산화 수소(H₂O₂), free fatty acid hydroperoxide, phospholipid hydroperoxide를 감소시킴으로써 세포를 보호한다고 보고되었다(Brigelius-Flohe and Flohe, 2003). Selenoprotein의 중요성은 sectRNA^{sec} gene의 knock-out mouse 모델을 통해 selenoprotein 결핍이 초기 배아 발생에 치명적인 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Bosl *et al.*, 1997). 또한 selenium은 glutathione peroxidase 합성촉진제로 작용하며(Ozolins *et al.*, 1996) 체외 배양환경의 개선을 통해 난포의 생존을 유지하는 효과를 나타내었다(Roy and Treacy, 1993; Silva *et al.*, 2004).

세포내 존재하는 항산화제인 glutathione(GSH)은 체외 배양 동안에 포유동물의 난자에서 합성되며(Yoshida *et al.*, 1993; Miyamura *et al.*, 1995; de Matos *et al.*, 2002), 난자 형성, 수정, 초기 배아 발생을 조절하는 것으로 알려져 있다(Zuelke *et al.*, 1997). GSH는 DNA와 단백질 합성, 아미노산 수송(Lafleur *et al.*, 1994) 등 세포 대사 과정에 관련되어 있으며, GSH와 GSH의 산화된 형태인 oxidized glutathione(GSSG)에 의해 세포의 산화 환원의 균형이 이루어지며(Morel and Barouki, 1999), 세포 주기 조절에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Sanchez-Fernandez *et al.*, 1997). 포유류 난자의 체외 배양 동안에 일어나는 세포질 성숙은 GSH 농도와 관련되어 있기 때문에 GSH는 난자의 성숙을 확인하는 indicator로 이용된다고 보고되었다(Furnus *et al.*, 1998; de Matos and Furnus, 2000).

이에 본 연구에서는 항산화제인 selenium이 생쥐 난자의 체외 배양시 난자 성숙과 생존에 미치는 영향을 알아보고자 selenium을 농도별로 처리하여 난자의 성숙율과 생존율 및

성숙난자내 GSH 함량 측정 등의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 미성숙 난자 획득과 배양

본 실험에서는 생후 4~6주된 ICR 계통의 생쥐 암컷을 사용하였다. 생쥐를 경추 파열로 도살 후 복강을 절개하여 분리한 난소를 M2 배양액이 있는 watch glass로 옮겨 해부현미경하에서 예리한 바늘로 난포를 터트려 난자를 채취하였다. 수집된 핵낭(germinal vesicle, GV) 시기의 난자는 mouth-controlled glass pipet을 사용하여 난구세포를 제거하였고, 난자를 M2 배양액으로 3회 세척한 후 사용하였다.

난자의 체외 배양은 M16 배양액을 사용하였다. 배양액 40 μ L를 35mm 플라스틱 배양접시(Falcon)에 넣고 3mL의 mineral oil(Sigma)로 덮은 후, 5%의 CO₂가 혼합된 습기로 포화된 공기를 공급받는 37°C 항온기에서 12시간 이상 방치하여 적정 pH가 유지되도록 한 후 난자의 체외 배양에 사용하였다.

2. 배양액 및 시약 조성

난자의 채취, 세척에 사용한 배양액은 M2 배양액이고, 난자의 체외 배양은 M16 배양액을 사용하였다.

항산화제로는 sodium selenite(Na₂SeO₃, Sigma)를 사용하였으며, 최종 농도가 0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL, 5 μ g/mL이 되도록 M16 배양액으로 희석하여 사용하였다. 난자의 oxidative stress를 유도하기 위해 과산화수소(H₂O₂, Sigma)를 사용하였으며, 최종 농도가 175 μ M이 되도록 M16 배양액으로 희석하여 사용하였다.

모든 배양액은 사용하기 전에 Millipore 여과지(pore size, 0.22 μ m)로 여과하여 멸균하였고, 초자기구 및 수술 기구는 121°C, 15lb에서 20분간 고압 멸균하거나 180°C에서 20분간 건열 멸균하여 사용하였다.

3. 미성숙 난자의 성숙률 측정

핵낭(germinal vesicle, GV) 시기 난자를 각각 기본 배양액(M16 배양액), 또는 selenium(0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL, 5 μ g/mL)이 첨가된 배양액에서 배양하였다. 난구세포가 제거된 난자(denuded oocyte, DO)와 난구세포로 둘러싸인 난자(cumulus cells-enclosed oocyte, CEO)를 각각 기본 배양액, 또는 selenium(0.05 μ g/mL, 5 μ g/mL)이 첨가된 배양액에서 배양하였다.

체외 배양 시작 후 핵막 붕괴(germinal vesicle break-

down, GVBD)는 2.5 시간에, 그리고 극체 형성(polar body formation, PB)은 13 시간에 도립 현미경(Nikon, TMS)으로 관찰하여 측정하였다.

각각의 실험군에 사용한 난자의 수는 61~257개를 사용하였다.

4. 성숙 난자의 생존율 측정

기본 배양액 또는 selenium(0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액에서 성숙된 극체 형성 시기 난자(polar body formation, PB)를 수집하여 각각 기본 배양액 또는 selenium(0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액으로 옮겨 72시간 동안 배양하였다. 체외 배양 직전에 175 μM 의 H_2O_2 가 첨가된 기본배양액으로 옮겨 15분간 5%의 CO_2 가 혼합된 습기 찬 공기를 공급받는 37 $^\circ\text{C}$ 항온기 내에서 배양한 후, M2 배양액으로 3회 세척하여 배양하였다.

체외 배양 후 24, 48, 72시간에 도립 현미경(Nikon, TMS)을 사용하여 난자의 형태 변화를 보고 정상 난자와 비정상 난자로 판별하여 난자의 생존율을 측정하였다.

각각의 실험군에 사용한 난자의 수는 76~123개를 사용하였다.

5. 난자내 Glutathione 함량 측정

핵낭(germinal vesicle, GV) 시기 난자를 각각 기본 배양액, 또는 selenium(0.05 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액에서 배양하였다. 핵막 붕괴(germinal vesicle breakdown, GVBD)는 2.5시간에, 그리고 극체 형성(polar body formation, PB)은 13시간에 확인하여 수집하였다. 기본 배양액 또는 selenium(0.05 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액에서 체외 배양하여 성숙된 극체 형성 시기 난자(polar body formation, PB)를 수집하여, 각각 기본 배양액 또는 selenium(0.05 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액으로 옮겨 72시간 동안 배양하였다. 체외 배양 후 24, 48, 72시간에 난자를 수집하였다.

체외 배양되어 각 단계별로 수집된 난자는 glutathione assay(Funahashi *et al.*, 1994)를 통해 난자내 glutathione (GSH) 함량을 측정하였다. 20~30개의 난자를 10% metaphosphoric acid 40 μL 에 첨가한 후 -80 $^\circ\text{C}$ 에서 냉동시켰다. 그리고 난자를 해동시켜 파괴한 후 4,000rpm에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 분리하여 -80 $^\circ\text{C}$ 에서 저장하였다. 10mM의 phosphate buffer(5mM EDTA, pH 7.5) 150 μL , 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 100 μL , reduced

β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) 700 μL , sample 40 μL 를 첨가하고 측정 직전에 GSH reductase 10 μL 를 첨가한 후 spectrophotometer(Hitachi, U3400)로 412nm 파장에서 2분간 측정하였다.

각각의 실험군에 사용한 난자의 수는 67~101개를 사용하였다.

6. 통계 처리

실험은 3회 이상 반복하였으며, 대조군과 실험군의 통계적 유의성은 Student *t*-test로 검정하였다.

결 과

1. Selenium이 난자의 성숙에 미치는 영향

핵낭(germinal vesicle, GV) 시기 난자를 체외 배양하여 핵막 붕괴율(germinal vesicle breakdown, GVBD)과 극체 형성률(polar body formation, PB)을 비교하였다. 핵막 붕괴율은 대조군이 90.5 \pm 1.3%로 나타났으며, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 95.6 \pm 1.4%, 97.6 \pm 1.8%로 나타나 대조군에 비해 높았으며, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 85.4 \pm 1.8%로 나타나 대조군에 비해 낮았다(Table 1). 극체 형성률은 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 72.4 \pm 2.7%, 72.2 \pm 3.5%, 73.9 \pm 3.2%로 나타나 대조군의 65.9 \pm 3.0%에 비해 높았으며, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 53.2 \pm 3.4%로 나타나 대조군에 비해 낮았다(Table 1).

난구세포가 제거된 난자(denuded oocyte, DO)와 난구세포로 둘러싸인 난자(cumulus cells-enclosed oocyte, CEO)를 체외 배양하여 핵막 붕괴율과 극체 형성률을 비교하였다. 난구세포가 제거된 난자(DO)의 핵막 붕괴율은 대조군이 90.3 \pm 1.3%로 나타났으며, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 94.4 \pm 1.7%로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 86.3 \pm 1.7%로 나타나 대조군에 비해 다소 낮았다. 또한 극체 형성률은 대조군이 63.1 \pm 2.4%로 나타났으며, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 70.8 \pm 2.7%로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 52.6 \pm 2.8%로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다(Table 2). 난구세포로 둘러싸인 난자(CEO)의 핵막 붕괴율은

Table 1. Effect of selenium on maturation of mouse oocyte *in vitro*

Conc. of Se ($\mu\text{g/mL}$)	Total No. of oocytes	No. of matured oocytes (%)	
		GVBD	PB
0.0	232	210 (90.5 \pm 1.3)	153 (65.9 \pm 3.0)
0.005	257	241 (93.8 \pm 3.0)	186 (72.4 \pm 2.7)**
0.05	252	241 (95.6 \pm 1.4)**	182 (72.2 \pm 3.5)*
0.5	249	243 (97.6 \pm 1.8)**	184 (73.9 \pm 3.2)**
5	233	199 (85.4 \pm 1.8)**	124 (53.2 \pm 3.4)**

Data are presented as the mean \pm SD and three replications were done.

Abbreviations: Conc, concentration; No, number; Se, selenium; GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body formation.

***Significantly different from the control group(0.0 $\mu\text{g/mL}$), * p <0.05, ** p <0.01.

Table 2. Effect of cumulus cells on maturation of mouse oocyte in selenium-containing medium *in vitro*

Type of oocytes	Conc. of Se ($\mu\text{g/mL}$)	Total No. of oocytes	No. of matured oocytes (%)	
			GVBD	PB
DO	0.0	103	93 (90.3 \pm 1.3)	65 (63.1 \pm 2.4)
	0.05	89	84 (94.4 \pm 1.7)*	63 (70.8 \pm 2.7)*
	5	95	82 (86.3 \pm 1.7)*	50 (52.6 \pm 2.8)**
CEO	0.0	65	60 (92.3 \pm 2.7)	46 (70.8 \pm 0.7)
	0.05	62	60 (96.8 \pm 2.6)	47 (75.8 \pm 1.5)*
	5	61	55 (90.2 \pm 1.7)	35 (57.4 \pm 2.1)**

Data are presented as the mean \pm SD and three replications were done.

Abbreviations: Conc, concentration; No, number; Se, selenium; DO, denuded oocyte; CEO, cumulus cells-enclosed oocyte; GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body formation, ***Significantly different from the control group(0.0 $\mu\text{g/mL}$), * p <0.05, ** p <0.01.

대조군이 92.3 \pm 2.7%로 나타났으며, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 각각 첨가된 실험군은 각각 96.8 \pm 2.6%, 90.2 \pm 1.7%로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었다. 극체 형성은 대조군이 70.8 \pm 0.7%로 나타났으며, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 75.8 \pm 1.5%로 나타나 대조군에 비해 유의하게 높았으며(p <0.05), 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 57.4 \pm 2.1%로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다(p <0.01)(Table 2).

2. Selenium이 성숙 난자의 생존에 미치는 영향

1) 기본 배양액에서 성숙된 난자의 생존율

기본 배양액에서 성숙된 극체 형성 시기 난자(PB)를 수집

하여 selenium이 첨가된 배양액으로 옮겨 72 시간 동안 배양하면서 생존율을 측정하여 비교하였다. 체외 배양 후 24 시간에 극체 형성 시기 난자의 생존율은 대조군이 97.6 \pm 2.1%로 나타났으며, 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 97.7 \pm 1.9%, 97.6 \pm 2.0%, 98.9 \pm 1.7%, 97.7 \pm 3.4%로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었다. 체외 배양 후 48시간에 난자의 생존율은 대조군이 85.7 \pm 1.4%로 나타났으며, 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 93.0 \pm 2.8%, 92.9 \pm 0.5%, 89.1 \pm 1.1%로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 81.6 \pm 3.0%로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었다. 체외 배양 후 72 시간에 난자의 생존율은 대조군이 56.0 \pm 0.7%로 나타

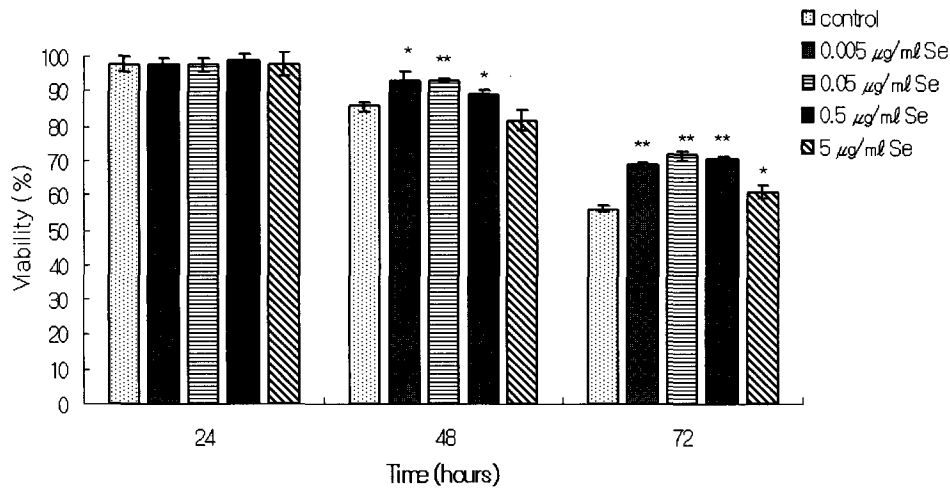


Fig. 1. Effect of selenium on viability of mouse oocyte *in vitro* matured in basic medium. Matured polar body oocytes were cultured in selenium-containing medium for 72 hours. Values represent the mean \pm SD. Number of oocytes examined: control, 84; 0.005 μ g/mL Se, 86; 0.05 μ g/mL Se, 84; 0.5 μ g/mL Se, 92; 5 μ g/mL Se, 87. Abbreviation: Se, selenium, ***Significantly different from the control group(0.0 μ g/ mL), * p <0.05, ** p <0.01.

났으며, 0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 68.6 \pm 0.7%, 71.4 \pm 1.5%, 70.7 \pm 0.3%로 나타나 대조군에 비해 유의하게 높았다(p <0.01). 5 μ g/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 60.9 \pm 2.1%로 나타나 대조군에 비해 유의하게 높았다(p <0.05)(Fig. 1).

2) 기본 배양액에서 성숙된 난자의 H₂O₂ 처리에 따른 생존율

기본 배양액에서 성숙된 극체 형성 시기 난자(PB)를 수집하여 175 μ M의 H₂O₂로 처리한 후, selenium이 첨가된 배양액으로 옮겨 72 시간 동안 배양하면서 생존율을 측정하여 비교하였다. 체외 배양 후 24 시간에 극체 형성 시기 난자의 생존율은 대조군이 80.0 \pm 0.7%로 나타났으며, 0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 78.9 \pm 3.3%, 79.1 \pm 0.6%, 81.6 \pm 1.0%로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었으며, 5 μ g/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 65.8 \pm 2.6%로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다(p <0.01). 체외 배양 후 48 시간에 난자의 생존율은 대조군이 62.2 \pm 1.0%로 나타났으며, 0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 68.4 \pm 3.5%, 69.8 \pm 4.0%, 73.5 \pm 1.8%로 나타나 대조군에 비해 높았으며, 5 μ g/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 55.3 \pm 3.3%로 나타나 대조군에 비해 다소

낮았다. 체외 배양 후 72시간에 난자의 생존율은 대조군이 37.8 \pm 3.1%로 나타났으며, 0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 49.5 \pm 2.4%, 55.8 \pm 0.7%, 60.2 \pm 2.5%로 나타나 대조군에 비해 현저히 높았으며(p <0.05), 5 μ g/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 30.3 \pm 2.8%로 나타나 대조군에 비해 다소 낮았다(p <0.01)(Fig. 2).

3) Selenium이 첨가된 배양액에서 성숙된 난자의 H₂O₂ 처리에 따른 생존율

Selenium이 첨가된 배양액에서 성숙된 극체 형성 시기 난자(PB)를 수집하여 175 μ M의 H₂O₂로 처리한 후, 기본 배양액으로 옮겨 72시간 동안 배양하면서 생존율을 측정하여 비교하였다. 체외 배양 후 24시간에 극체 형성 시기 난자의 생존율은 대조군이 78.6 \pm 2.6%로 나타났으며, 0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 82.9 \pm 2.2%, 85.9 \pm 2.0%, 83.8 \pm 2.5%로 나타나 대조군에 비해 높았으며(p <0.05, p <0.01, p <0.05), 5 μ g/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 71.0 \pm 3.2%로 나타나 대조군에 비해 다소 낮았다(p <0.05). 체외 배양 후 48 시간에 난자의 생존율은 대조군이 65.8 \pm 1.7%로 나타났으며, 0.005 μ g/mL, 0.05 μ g/mL, 0.5 μ g/mL의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 74.0 \pm 2.8%, 77.8 \pm 2.1%, 74.3 \pm 3.5%로 나타나 대조군에 비해 현저히 높았으며(p <0.01), 5 μ g/mL의

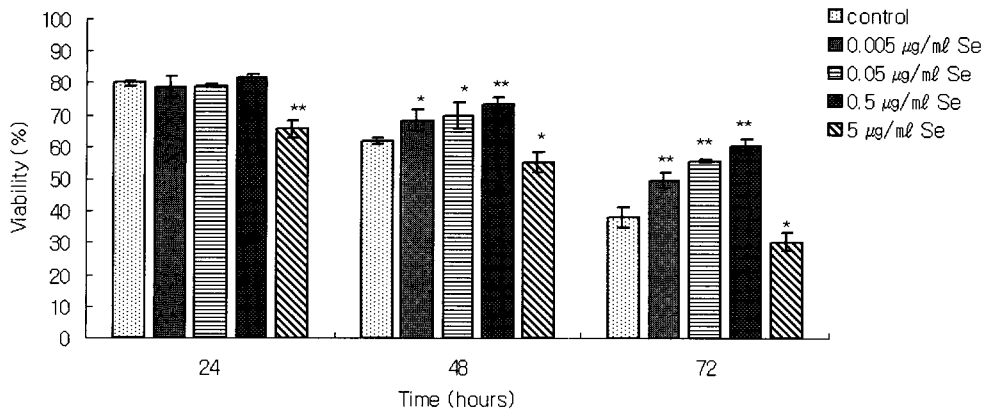


Fig. 2. Effect of selenium on viability of mouse oocyte *in vitro* matured in basic medium. Matured polar body oocytes were treated with 175 µM H₂O₂ for 15 min and cultured in selenium-containing medium for 72 hours. Values represent the mean±SD. Number of oocytes examined: control, 90; 0.005 µg/mL Se, 95; 0.05 µg/mL Se, 86; 0.5 µg/mL Se, 98; 5 µg/mL Se, 76. Abbreviation: Se, selenium, **Significantly different from the control group(0.0 µg/mL), *p<0.05, **p<0.01.

selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 53.8±2.4%로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다(p<0.01). 체외 배양 후 72시간에 난자의 생존율은 대조군이 43.6±2.6%로 나타났으며, 0.005 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.5 µg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 58.5±3.1%, 62.6±1.3%, 61.0±2.0%로 나타나 대조군에 비해 현저히 높았으며, 5 µg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 40.9±2.9%로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

3. Selenium이 난자내 Glutathione 함량에 미치는 영향

1) 난자 성숙에 따른 난자내 Glutathione 함량

핵낭(GV) 시기 난자를 체외 배양하여 핵막 붕괴 시기 난자(GVBD)와 극체 형성 시기 난자(PB)의 glutathione(GSH) 함량을 비교하였다. 핵막 붕괴 시기 난자의 GSH 함량은 대조군이 1.41±0.14 pmol로 나타났으며, 0.05 µg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 1.42±0.04 pmol로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었으며, 5 µg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 1.20±0.08 pmol로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다(p<0.01) (Fig. 4). 극체 형성 시기 난자의 GSH 함량은 대조군이 3.00±0.06 pmol로 나타났으며, 0.05 µg/mL의 selenium이 첨가

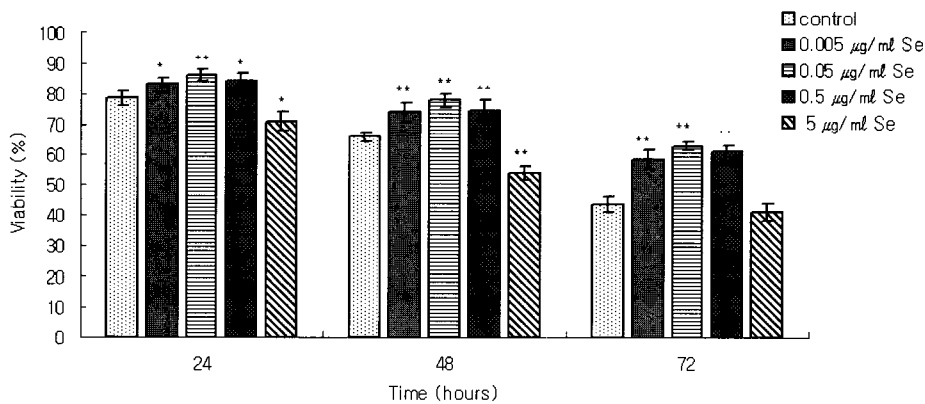


Fig. 3. Effect of selenium on viability of mouse oocyte *in vitro* matured in selenium-containing medium. Matured polar body oocytes were treated with 175 µM H₂O₂ for 15 min and cultured in basic medium for 72 hours. Values represent the mean±SD. Number of oocytes examined: control, 117; 0.005 µg/mL Se, 123; 0.05 µg/mL Se, 99; 0.5 µg/mL Se, 105; 5 µg/mL Se, 93. Abbreviation: Se, selenium, **Significantly different from the control group(0.0 µg/mL), *p<0.05, **p<0.01.

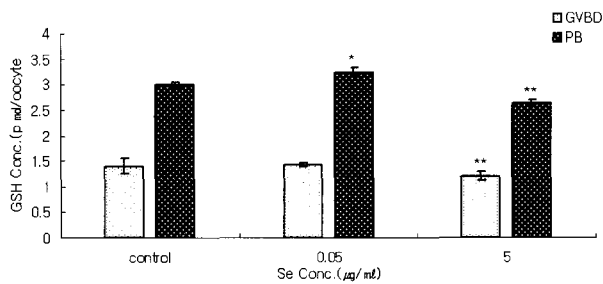


Fig. 4. Effect of selenium on glutathione concentration of mouse oocyte. Values represent the mean±SD. Number of oocytes examined: GVBD- control, 101; 0.05 μg/mL Se, 87; 5 μg/mL Se, 84. PB- control, 101; 0.05 μg/mL Se, 95; 5 μg/mL Se, 85. Abbreviations: Conc, concentration; Se, selenium; GSH, glutathione; GVBD, germinal vesicle breakdown; PB, polar body formation, ***Significantly different from the control group(0.0 μg/mL), * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

된 배양액에서 배양된 실험군은 3.24 ± 0.09 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며($p<0.05$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.64 ± 0.06 pmol로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다($p<0.01$)(Fig. 4).

2) 기본 배양액에서 성숙된 난자내 Glutathione 함량 변화

기본 배양액에서 성숙된 극체 형성 시기 난자(PB)를 수집하여 selenium이 첨가된 배양액으로 옮겨 72시간 동안 배양하면서 GSH 함량을 비교하였다. 체외 배양 0시간에 극체 형성 시기 난자의 GSH 함량은 대조군이 3.08 ± 0.26 pmol로 나타났으며, 0.05 μg/mL, 5 μg/mL의 selenium이 각각 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 각각 3.07 ± 0.23 pmol, 3.05 ± 0.22 pmol로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었다. 체외 배양 후 24시간에 난자의 GSH 함량은 대조군이 2.71 ± 0.25 pmol로 나타났으며 0.05 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.84 ± 0.17 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며($p<0.05$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.50 ± 0.24 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 낮았다($p<0.05$). 체외 배양 후 48시간에 난자의 GSH 함량은 대조군이 2.36 ± 0.06 pmol로 나타났으며, 0.05 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군 2.40 ± 0.12 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며($p<0.05$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 1.91 ± 0.14 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 낮았다($p<0.05$). 체외 배양 후 72시간에 난자의 GSH 함량은

대조군이 1.66 ± 0.17 pmol로 나타났으며, 0.05 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.00 ± 0.23 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며($p<0.05$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 1.32 ± 0.25 pmol로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다($p<0.01$)(Fig. 5).

3) Selenium이 첨가된 배양액에서 성숙된 난자내 Glutathione 함량 변화

Selenium이 첨가된 배양액에서 성숙된 극체 형성 시기 난자(PB)를 수집하여 기본 배양액으로 옮겨 72시간 동안 배양하면서 GSH 함량을 비교하였다. 체외 배양 0시간에 극체 형성 시기 난자의 GSH 함량은 대조군이 3.03 ± 0.05 pmol로 나타났으며, 0.05 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 3.21 ± 0.18 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 높았으며($p<0.05$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.72 ± 0.19 pmol로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다($p<0.01$). 체외 배양 후 24시간에 난자의 GSH 함량은 대조군이 2.74 ± 0.28 pmol로 나타났으며, 0.05 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 3.13 ± 0.12 pmol로 나타나 대조군에 비해 현저히 높았으며($p<0.01$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.57 ± 0.09 pmol로 나타나 대조군에 비해 다소 낮았다($p<0.05$). 체외 배양 후 48시간에 난자의 GSH 함량은 대조군이 2.33 ± 0.07 pmol로 나타났으며, 0.05 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.70 ± 0.19 pmol로 나타나 대조군에 비해 높았으며($p<0.01$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 1.99 ± 0.12 pmol로 나타나 대조군에 비해 현저히 낮았다($p<0.01$). 체외 배양 후 72시간에 난자의 GSH 함량은 대조군이 1.74 ± 0.12 pmol로 나타났으며, 0.05 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 2.32 ± 0.25 pmol로 나타나 대조군에 비해 현저히 높았으며($p<0.01$), 5 μg/mL의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 1.63 ± 0.17 pmol로 나타나 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 6).

고 찰

Selenium은 정상적인 대사 과정에서 발생하는 유해한 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)로부터 세포를 보호하는 항산화 효소의 구성 성분이며(Bjornstedt *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1992), 혈청이 없는 배양액에서 세포의

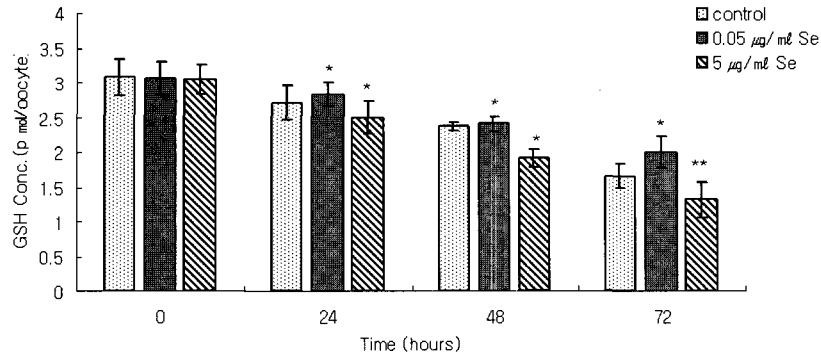


Fig. 5. Effect of selenium on glutathione concentration of mouse oocyte *in vitro* matured in basic medium. Matured polar body oocytes were cultured in selenium-containing medium for 72 hours. Values represent the mean±SD. Number of oocytes examined: 0 hours- control, 91; 0.05 µg/mL Se, 93; 5 µg/mL Se, 68. 24 hours- control, 90; 0.05 µg/mL Se, 72; 5 µg/mL Se, 73. 48 hours-control, 76; 0.05 µg/mL Se, 91; 5 µg/mL Se, 79. 72 hours- control, 71; 0.05 µg/mL Se, 73; 5 µg/mL Se, 74. Abbreviations: Conc, concentration; Se, selenium; GSH, glutathione; PB, polar body formation, *Significantly different from the control group (0.0 µg/mL), $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

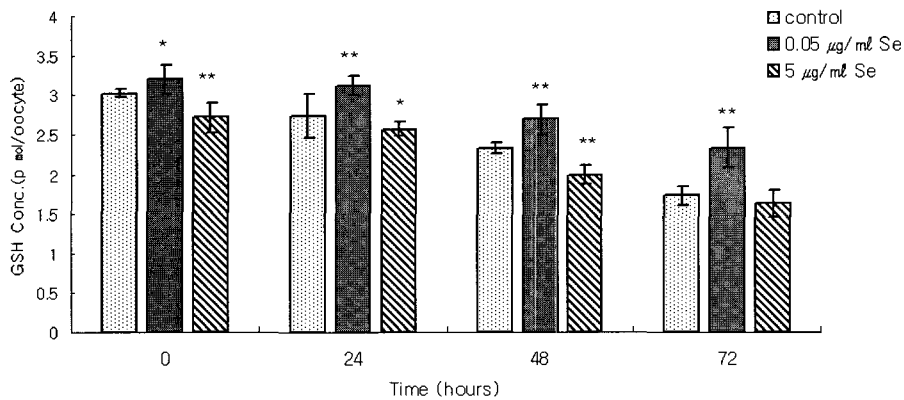


Fig. 6. Effect of selenium on glutathione concentration of mouse oocyte *in vitro* matured in selenium-containing medium. Matured polar body oocytes were cultured in basic medium for 72 hours. Values represent the mean±SD. Number of oocytes examined: 0 hours-control, 96; 0.05 µg/mL Se, 95; 5 µg/mL Se, 67. 24 hours-control, 87; 0.05 µg/mL Se, 93; 5 µg/mL Se, 72. 48 hours-control, 71; 0.05 µg/mL Se, 82; 5 µg/mL Se, 79. 72 hours-control, 74; 0.05 µg/mL Se, 95; 5 µg/mL Se, 96. Abbreviations: Conc, concentration; Se, selenium; GSH, glutathione; PB, polar body formation, ***Significantly different from the control group (0.0 µg/mL), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

체의 배양시 필수적이라고 보고되었다(McKeehan *et al.*, 1976).

본 실험에서 생쥐 난자에 selenium을 농도별로 처리하여 난자의 성숙률을 확인한 결과, 핵막 붕괴율(GVBD)과 극체 형성률(PB)은 저농도의 selenium(0.005 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.5 µg/mL)이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군이 대조군에 비해 유의하게 높았으며, 고농도의 selenium(5 µg/mL)이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군은 대조군에 비해 낮았다(Table 1). 또한 난구세포로 둘러싸인 난자(CEO)와 난구세포가 제거된 난자(DO)의 핵막 붕괴율은 대조군과 실험군간의 유의한 차이가 없었지만, 극체 형성률은 난구세포로 둘러

싸인 난자(CEO)의 실험군이 다소 높았다(Table 2). Selenium은 세포 대사 동안에 생성되어 산화적 스트레스를 야기하는 활성 산소종의 free radical scavenger로 작용하며 배양 환경의 개선을 일으키고(Roy and Treacy, 1993), 난포의 체외 배양시 난포의 생존을 개선시킨다(Silva *et al.*, 2004)라는 보고를 볼 때, 본 실험에서 저농도 selenium이 첨가된 배양액에서 난자의 성숙율이 대조군에 비해 유의하게 높게 나타나는 것은 selenium에 의한 항산화제 기능과 이것으로 인한 배양 환경의 개선이 이루어진 결과로 생각된다.

본 실험에서 생쥐 난자에 selenium을 농도별로 처리하여 극체 형성 시기 난자(PB)의 생존율을 확인한 결과, 저농도의

selenium(0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군의 생존율이 대조군에 비해 높았으며, 고농도의 selenium(5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군의 생존율은 대조군과 유의한 차이가 없거나 다소 낮았다(Fig. 1~3). Selenium은 세포 종류에 따라 배양 농도가 다르며(Bjorkhem-Bergman *et al.*, 2002), 농도에 따라 영향을 받는 것으로 보고되었다(Garberg *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1992). 적정 농도의 selenium은 selenoprotein의 발현을 유도하는데 필수적이지만 고농도의 selenium은 세포 내 산화 환원 균형을 깨뜨림으로써 DNA fragmentation과 세포의 죽음을 유도하는 독성 작용을 일으킨다고 보고되었다(Garberg *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1992). 본 실험 결과로 볼 때 저농도의 selenium(0.005 $\mu\text{g/mL}$ ~0.5 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액은 난자내 selenoprotein의 활성을 유도하며, 체외 배양시 발생하는 oxidative stress로부터 난자를 보호함으로써 생존율을 증가시키는 것으로 생각된다. 과산화수소(H_2O_2)는 사람의 정자에 가장 유독한 활성 산소종으로 알려져 있으며(Griveau *et al.*, 1995), 배아의 apoptosis를 일으키는 것으로 보고되었다(Yang *et al.*, 1998). 포유류 세포는 150~300 μM 의 H_2O_2 를 처리하면 세포 분열이 억제되고, 1 mM 이상의 H_2O_2 를 처리하면 성장이 지연되거나 단백질 합성이 억제되어 apoptosis와 necrosis가 유도되는 것으로 보고되었다(Wiese *et al.*, 1995). 본 실험에서도 175 μM 의 H_2O_2 는 생쥐 난자의 생존을 저해하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2, 3).

본 실험에서 생쥐 난자에 selenium을 농도별로 처리하여 난자내 glutathione(GSH) 함량 변화를 확인한 결과, 핵막 붕괴(GVBD)와 극체 형성 시기(PB) 난자내 GSH 함량은 고농도(5 $\mu\text{g/mL}$)의 selenium이 첨가된 배양액에서 배양된 실험군이 대조군에 비해 현저히 낮았다(Fig. 4). 그리고 극체 형성 시기 난자내 GSH 함량은 핵막 붕괴 시기 난자에 비해 두 배 이상 높았다(Fig. 4). 햄스터 난자내 GSH 함량은 미성숙 난자보다 성숙 난자에서 더 높으며(Perreault *et al.*, 1988), GSH 함량은 미성숙 난자 시기에 1.0 pmol/oocyte에서 제 2차 감수분열 중기에는 2.0 pmol/oocyte까지 증가한다고 보고되었다(Zuelke *et al.*, 2003). 돼지의 난자내 GSH는 체외 성숙 과정 동안 증가하여 제 2차 감수분열 중기(MII)에 최고로 이른다고 보고되었는데(Yoshida *et al.*, 1993), 본 실험에서도 생쥐 난자의 성숙 과정 동안 GSH의 함량이 급격히 증가하는 것을 알 수 있었다. 체외 배양 과정 동안 극체 형성 시기 난자의 GSH 함량 변화는 selenium의 농도와 처리시기에 따라 다르게 나타났으며, 시간이 경과함에 따라 감소하는

경향을 나타냈다. 저농도의 selenium(0.05 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 배양액에서 성숙, 또는 배양된 실험군은 대조군에 비해 GSH 함량이 높았으며 감소폭도 작았다(Fig. 5, 6). 또한 selenium이 첨가된 배양액에서 성숙된 실험군이 기본 배양액에서 성숙된 실험군에 비해 GSH 함량의 감소폭이 작았다(Fig. 5, 6). Zuelke 등(2003)은 GSH가 포유류 난자의 발생 능력과 생존을 확인하는 중요한 요인으로 판단할 수 있다고 보고하였는데, 본 실험 결과로 볼 때 저농도의 selenium (0.05 $\mu\text{g/mL}$)은 난자내 GSH 함량을 증가시켜 난자의 생존력 증가에 관여한 것으로 생각되며, 배양 시간이 경과함에 따라 난자내 GSH 함량이 감소하는 것은 난자의 폐쇄 및 퇴화과정과 체외 배양시 발생하는 oxidative stress가 GSH 함량에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과로 볼 때 저농도의 selenium(0.005 $\mu\text{g/mL}$ ~0.5 $\mu\text{g/mL}$)은 생쥐 난자의 체외 배양시 난자의 질적 향상을 도우며, 대사 과정에서 발생하는 oxidative stress에 의한 손상을 감소시킴으로써 성숙률을 증가시키는 것으로 사료된다. 또한 저농도의 selenium(0.005 $\mu\text{g/mL}$ ~0.5 $\mu\text{g/mL}$)은 난자내 GSH 함량에도 영향을 미쳐 생존율을 증가시키는 것으로 사료된다. 그러나 고농도의 selenium(5 $\mu\text{g/mL}$)은 난자의 생존률에 별다른 영향을 미치지 않는 점 등 예외적인 결과도 있었으므로, selenium의 영향에 관하여 난자의 성숙 시기별과 농도별로 더 자세한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

인용문헌

- Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S (2001) Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 8:S40-42.
- Bjorkhem-Bergman L, Jonsson K, Eriksson LC, Olsson JM, Lehmann S, Paul C (2002) Drug-resistant human lung cancer cells are more sensitive to selenium cytotoxicity. Effects on thioredoxin reductase and glutathione reductase. *Biochem Pharmacol* 63:1875-1884.
- Bjornstedt M, Kumar S, Holmgren A (1992) Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 267:8030-8034.
- Bladier C, Wolvetang EJP, Hutchinson JB, Hann de, Kola I (1997) Response of a primary human fibroblast cell line to H_2O_2 : senescence-like growth arrest or apoptosis?

- Cell Growth Differ 8:589-598.
- Bock A, Forchhammer K, Heider J, Baron C (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. Trends Biochem Sci 16:463-467.
- Bosl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM (1997) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene(Trsp). Proc Natl Acad Sci USA 94:5531-5534.
- Brigelius-Flohe R, Flohe L (2003) Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? Biofactors 17:93-102.
- Clark LC, Combs Jr GF, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. J Am Med Assoc 276:1957-1963.
- de Matos DG, Furnus CC (2000) The importance of having high glutathione(GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: Effect of β - mercaptoethanol, cystein and cystin. Theriogenology 53:761-771.
- de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini, Thompson JG (2002) Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. Theriogenology 57:1443-1451.
- Flohe L, Gunzler WA, Schock HH (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett 32:132-134.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994) Use of low-salt culture medium with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. Biol Reprod 51:633-639.
- Furnus CC, de Matos DG, Moses DF (1998) Cumulus expansions during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Relationship level and its role on subsequent embryo development. Mol Reprod Dev 51:76-83.
- Garberg P, Stahl A, Warholm M, Hogberg J (1988) Studies of the role of DNA fragmentation in selenium toxicity. Biochem Pharmacol 37:3401-3406.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Lannou DLe(1995) Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. J Reprod Fertil 103:17-26.
- Kumar S, Bjornstedt M, Holmgren A (1992) Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large nonstoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. Eur J Biochem 207:435-439.
- Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ, Retel J (1994) The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. Free Radical Res 21:9-17.
- McKeehan WL, Hamilton WG, Ham RG (1976) Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U.S.A 73:2023-2027.
- Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M (1995) Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. Theriogenology 43(Issue 1):282.
- Morel Y, Barouki R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. Biochemical Journal 342:481-496.
- Ozolins TR, Siksay DL, Wells PG (1996) Modulation of embryonic glutathione peroxide activity and phenytoin teratogenicity by dietary deprivation of selenium in D-1 mice. J Pharmacol Exp Therap 277:943-953.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VI (1988) Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. Dev Biol 125:181-186.
- Roy SK, Treacy BJ (1993) The isolation and long-term culture of human preantral follicles. Fert Steril 59:783-790.
- Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf AT, Grudzinski JG (1999) Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. Fert Steril 72:1027-1034.
- Sanchez-Fernandez R, Fricker MM, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inze D, May MJ (1997) Cell proliferation and hair tip growth in the Arabidopsis root are under mechanistically different forms

- of redox control. Proc Natl Acad Sci U.S.A 94:2745-2750.
- Silva JRV, van den Hura R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lodo RNB, Figueiredo JR (2004) Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. Anim Reprod Sci 81:273-286.
- Stadtman TC (1996) Selenocysteine. Annu Rev Biochem 65:83-100.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279:1005-1028.
- Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA (1995) Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. Arch Biochem Biophys 318:231-240.
- Wilson AC, Thompson HJ, Schedin PJ, Gibson NW, Ganther HE (1992) Effect of methylated forms of selenium on cell viability and the induction of DNA strand breakage. Biochem Pharmacol 43:1137-1141.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998) Detection of reactive oxygen species(ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Hum Reprod 13:998-1002.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG (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.
- Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD (1997) Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. Biol Reprod 57:1413-1420.
- Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD (2003) Glutathione(GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. Mol Reprod Dev 64:106-112.