

## 소 미성숙 난포란의 체외성숙시 $\beta$ -Mercaptoethanol의 첨가가 체외성숙, 체외수정 및 Glutathione 수준에 미치는 영향

오신애<sup>1</sup> · 김창근<sup>1,2</sup> · 정영채<sup>1</sup> · 방명걸<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 산업과학대학 동물자원과학과, <sup>2</sup>중앙대학교 생명환경연구원

### Effect of $\beta$ -Mercaptoethanol Supplement during *In Vitro* Maturation on IVM, IVF and Glutathione Level in Bovine Oocytes

Shin-Ae Oh<sup>1</sup>, Chang-Keun Kim<sup>1,2</sup>, Yung-Chai Chung<sup>1</sup> and Myung-Geol Pang<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science & Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University

<sup>2</sup>BET Research Institute, Chung-Ang University

**ABSTRACT** : Experiments were conducted to determine the effects of beta-mercaptoethanol( $\beta$ -ME) supplements to the maturation medium on *in vitro* fertilization(IVF) and intracellular glutathione(GSH) concentration. Bovine cumulus-intact oocytes were matured in TCM-199 medium containing FBS, hormonal supplements, and  $\beta$ -ME(0, 25 and 50  $\mu$ M) for 12h and 24 h. After culture, cumulus-free matured oocytes were co-incubated with frozen-thawed spermatozoa for 24h. Maturation rate increased( $p<0.05$ ) in  $\beta$ -ME treatment group, but no significant differences among treatment groups. Also, increases( $p<0.05$ ) in intracellular GSH concentration before and after fertilization were observed in 50  $\mu$ M  $\beta$ -ME supplements to the maturation medium. Male pronuclear formations after IVF was increased( $p<0.05$ ) in  $\beta$ -ME treatment group, but no significant difference among treatment groups. In conclusion, supplementing  $\beta$ -ME into the maturation medium increased maturation rates, fertilization rates, and intracellular GSH concentrations.

**Key words** :  $\beta$ -Mercaptoethanol, Glutathione, IVM, IVF, Bovine oocyte.

**요약** : 본 연구는 소의 미성숙 난포란의 체외성숙시  $\beta$ -mercaptoethanol( $\beta$ -ME)의 첨가가 체외성숙, 체외수정 후 응성전핵의 형성 및 세포질 내의 GSH 수준에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 체외성숙시 25  $\mu$ M과 50  $\mu$ M의  $\beta$ -ME를 첨가한 경우 대조구에 비하여 성숙율이 증가하는 것으로 나타났으며( $p<0.05$ ), 모든 실험구에 있어서 12시간 체외성숙보다 24시간 체외성숙에서 높은 성숙율을 나타냈다( $p<0.05$ ). 체외수정 후 응성전핵 형성에 있어서는 25  $\mu$ M와 50  $\mu$ M 농도의  $\beta$ -ME 첨가구에서 대조구에 비하여 높게 나타났으나( $p<0.05$ ), 25  $\mu$ M과 50  $\mu$ M 농도구와의 유의적인 차이는 없었다. GSH의 수준은 체외성숙 후 50  $\mu$ M의  $\beta$ -ME 첨가구가 다른 처리구에 비교하여 높게 나타났으며( $p<0.05$ ), 체외수정 후 응성전핵이 형성된 다음 세포질 내 GSH 수준 역시 50  $\mu$ M의  $\beta$ -ME 첨가구에서 가장 높은 결과를 나타냈다( $p<0.05$ ).

## 서론

최근 가축에서 번식의 효율성을 증진시키거나 유전자의 미세 주입에 의한 형질전환 동물의 작출 및 복제 동물의 작출과 같은 생명공학적 기법의 개발과 기술 체계를 확립하고자 많은 연구가 수행되고 있다. 이러한 연구를 효율적으로 수행하기 위해서는 우선적으로 다수의 수정란을 확보하는 것이 필수적이다. 이를 해결하는 하나의 수단으로서 도축된

개체의 난소에서 채취된 다수의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙배양, 수정시켜 이용하고자 하는 방법들이 다각적으로 검토되고 있다.

활성 산소는 산소자유라디칼(oxigenic free radical) 및 그 것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물을 통칭하는 것으로, 이들은 모두 반응성이 높은 특징을 가지고 있다. 자유라디칼은 불안정하므로 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 전자를 잃거나 얻으려 하기 때문에 높은 반응성을 갖게 된다(Halliwel & Guttetuge, 1992). 포유류 수정란의 체외 발달능 정지 현상 역시 난포란의 체외성숙시 산소분압이 난관내의 조건 (2842  $\mu$ M)보다 고분압 (224  $\mu$ M)의 조건에 노출됨으로 인하여 과량의 활성 산소를 발생하며, 이들 유리 산소기들은 oxidative stress를 초래하여 mitochondria의 호흡작용 억제,

\* 이 논문은 2006년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의하여 수행되었습니다.

† 교신저자: Department of Animal Science & Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansong-Si, Kyunggi-Do 456-756, Korea. Tel: 82-31-670-4841, Fax: 82-31-675-9001, E-mail: mgpang@cau.ac.kr

세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA상의 손상을 초래하는 등 난포란의 성숙 및 체외 발달시에 중요한 저해요인으로 작용한다고 보고되었다(Corsby *et al.*, 1988).

세포내 존재하는 항산화제인 Glutathione(GSH)은 주요한 비단백 sulfidryl 화합물로 세포를 활성산소의 영향으로부터 보호하는 역할을 수행하며(Lafleur *et al.*, 1994), 체외배양 동안에 포유동물의 난자에서 합성되며(Yoshida, *et al.*, 1993; Miyamura *et al.*, 1995; de Matos *et al.*, 2002), 난자 성숙기간 동안 GSH의 합성은 정자 침입 후 응성전핵의 형성을 위해 필수적이라고 알려져 있다(Perreault *et al.*, 1988; Zuelke *et al.*, 2003).

활성산소를 제거할 목적으로 기존의 배양체계에 황화합물(thiol-compound)을 첨가 배양하는 연구가 수행되어 왔다. GSH의 전구물질을 배양액에 첨가하면 세포내 GSH의 수준을 높일 수 있으므로 황화합물의 일종인  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME), cystein, cysteamine 등을 첨가하여 배양하는 방법이 연구되었으며(Yoshida *et al.*, 1993; Li & Foote, 1993; Lafleur *et al.*, 1994), 소 수정란의 체외배양시  $\beta$ -ME를 첨가 배양함으로써 높은 응성전핵 형성률 및 배반포 발달율을 보고한 바 있다(Takahashi *et al.*, 1996; 양 *et al.*, 1997).

소의 미성숙 난포란의 체외성숙시 GSH 합성 억제인자인 buthionic sulfoximine을 첨가하여 성숙을 유기시킨 다음 체외수정을 수행하였을 때 GSH의 수준 및 응성전핵 형성률이 유의적으로 감소됨을 보였으며(Miyamura *et al.*, 1995), 반대로 소 미성숙 난포란의 체외성숙시 배양액에 cysteamine 과  $\beta$ -ME를 첨가하여 GSH의 합성이 증가됨을 보고하였다(de Matos *et al.*, 1996). 또한 소 미성숙 난포란의 체외성숙시 난구세포 복합체, 난구세포와의 공배양 또는 monolayer의 존재시 세포질 내의 GSH 수준이 증가되며 난구세포를 제거하였을 때 황화합물의 일종인 cysteine 또는 cysteamine이 첨가된 배양액에서 세포질 내 GSH 수준이 증가됨에 따라 공배양이 없이도 황화합물의 존재로 체외성숙률이 증가됨을 보고된 바 있다(de Matos *et al.*, 1997). 또한 체외성숙 배양액에  $\beta$ -ME, cysteine 그리고 cysteamine을 첨가하여 체외성숙동안 합성된 GSH가 체외수정 후 배아 발달에 유의적인 효과가 보고되었다(de Matos & Furnus, 2000; de Matos *et al.*, 2002). 또한 Mizushima & Fukui(2001)는 체외성숙 배양액에  $\beta$ -ME 첨가하여 metaphase에 도달률이 유의적으로 높음을 보고하였다.

즉,  $\beta$ -ME는 GSH의 전구물질로서 세포내의 GSH의 합성을 증가시킴으로서 세포 및 배아 발달의 향상과 세포발달 중지 현상을 극복할 수 있으며(Takahashi *et al.*, 1993),  $\beta$

-ME는 배양액의 산화반응에 의한 세포의 손상을 보호할 뿐만 아니라 amino acid의 이동과 DNA의 합성을 촉진하는 역할을 수행한다(Lafleur *et al.*, 1994).

따라서, 본 연구는 소의 미성숙 난포란의 체외성숙시 배양액에 GSH 합성 전구물질인  $\beta$ -ME의 첨가가 미성숙 난포란의 체외성숙율과 체외수정시 응성전핵의 형성 및 세포질 내 GSH 합성 수준에 미치는 영향을 조사하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취

본 실험에서 사용된 난포란은 도축 직후 적출한 난소로부터 채취하였다. 도살 직후 적출한 난소를 1~2시간 이내에 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, 25 mM HEPES buffer)과 희석하여 실체현미경 하에서 난구세포의 부착상태가 전체적으로 치밀하고 균일하게 부착되어 세포질의 상태가 양호한 것을 회수하여 실험에 사용하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙

미성숙 난포란은 TCM-199 배양액에 100 IU/mL penicillin G와 10% FCS를 첨가하고, FSH(5 IU), estradiol-17 $\beta$ (5 IU) 그리고 hCG(5 IU)를 첨가하였다.

미성숙 난포란의 체외성숙율을 조사하기 위하여 체외성숙 배양액에 각각 0(control), 25  $\mu$ M 그리고 50  $\mu$ M 농도의  $\beta$ -ME를 첨가하여 25  $\mu$ L의 미세소적을 만든 뒤 mineral oil을 피복하고, 각 소적마다 난자를 10~15개씩 옮겨놓은 후 39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 12시간과 24시간 배양하여 체외성숙을 유기시킨 후 제 1 극체의 유무를 확인하여 배양시간에 따른 체외성숙율을 비교하였다.

### 3. 체외수정 및 응성전핵의 형성

2개의 한우 동결정액 straw(0.5 mL)를 37 $^{\circ}$ C의 물에서 용해시킨 후 5 mM의 caffein이 함유되어 있는 BO 액으로 300g $\times$ , 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 다시 BO 액으로 재부유하여 2회 세척한다. 5 mM caffein과 0.05% heparin이 함유된 BO액으로 140G $\times$ , 1분간 원심분리하여 강제 swim up을 통해 상층액만을 취하여 활력이 좋은 정자만을 회수하였다. 회수된 정자를 다시 300g $\times$ , 5분간 1회 원심분리하여

상층액을 제거한 다음 같은 배양액으로 희석하여 정자농도가  $2.5 \times 10^6$  개/mL가 되도록 조정하였다. 30 mm 배양접시에 25  $\mu$ L의 미세소적을 만들어 mineral oil로 피복한 다음 각 소적당 성숙란을 10~15개씩 넣고 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 18시간동안 수정하였다.

#### 4. 웅성전핵 형성의 관찰

체외수정 후 정자를 제거한 다음 0.25% protease에 수정란을 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4분간 배양하여 투명대를 제거한 다음 0.4% BSA가 첨가된 PBS로 2~3회 세척하였다. 그 후 acetic alcohol(ethanol:acetic acid=3:1)에 5분간 침지시켜 세포질과 핵을 고정한 다음 acetic orcein으로 염색하여 전핵의 유무를 관찰하였다.

#### 5. 세포질 내 GSH 농도 측정

1 mL eppendorf tube에 30  $\mu$ L의 25% HPO<sub>3</sub> 용액을 넣고 10~30개의 난자를 넣은 후 70  $\mu$ L의 sodium phosphate-EDTA buffer를 넣어 냉동과 용해를 10회 정도 반복하여 난자를 터뜨린 다음 10,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 균질화시켰다. GSH 농도 측정을 위해서 plate에 시료 10  $\mu$ L를 넣고 sodium phosphate-EDTA buffer로 48배 희석한 다음 OPT(o-phthaldehyde) solution을 10  $\mu$ L 넣어 시료 내 GSH와 반응할 수 있도록 37°C에서 15분간 진탕배양하였다.

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

#### 6. 통계분석

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

## 결 과

### 1. $\beta$ -ME가 체외성숙율에 미치는 영향

체외성숙 배양액에 항산화물질로서 GSH 전구체이며 황화합물의 일종인  $\beta$ -ME를 첨가하여 배양에 이용함으로써 체외성숙율에 미치는 영향을 알아보았다.

소 미성숙 난포란에서 체외성숙 시 0(control), 25 그리고 50  $\mu$ M 농도의  $\beta$ -ME를 첨가하여 배양하였으며, 12시간 및 24시간 동안 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 농도에서 배양시켜 성숙을 유지하여 얻은 성적을 Table 1에 요약하였다. 12시간 체외성숙 배양시 25  $\mu$ M과 50  $\mu$ M 농도의  $\beta$ -ME 첨가구에서  $78.1 \pm 2.7\%$ 와  $75.5 \pm 3.2\%$ 로서 대조구의  $65.8 \pm 3.2\%$ 보다 현저히 높았으나, 25  $\mu$ M과 50  $\mu$ M 농도구 사이의 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 24시간 체외성숙 유기의 경우에도 25  $\mu$ M과 50  $\mu$ M의 두 농도의 실험구에서  $88.7 \pm 3.2\%$ 와  $82.6 \pm 2.7\%$ 로 역시 대조구의  $74.2 \pm 1.7\%$ 보다 유의적으로 높았으나 ( $p < 0.05$ ), 역시 두 농도구 사이의 유의차는 인정되지 않았다. 각  $\beta$ -ME의 농도별 처리구간에서 12시간보다 24시간 동안 체외성숙 유기시 체외성숙율이 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 이 결과로 보아 소의 미성숙 난포란의 체외성숙 유기시  $\beta$ -ME의 첨가가 체외성숙 유기시간의 단축에는 효과가 없음을 알 수 있었다.

### 2. 체외성숙 배양동안 첨가된 $\beta$ -ME가 웅성전핵 형성에 미치는 영향

$\beta$ -ME를 첨가하여 체외성숙을 유지시킨 소 난포란의 체외수정 결과는 Table 2와 같다. 체외수정 후 웅성전핵 형성은 체외성숙 배양 12시간과 24시간 모두 25  $\mu$ M  $\beta$ -ME 농도에서  $82.6 \pm 0.2\%$ 와  $84.8 \pm 2.0\%$ 로 대조구  $76.8 \pm 3.2\%$ 와  $72.9 \pm 1.9\%$ 에 비해 유의적으로 높았으나( $p < 0.05$ ), 50  $\mu$ M  $\beta$ -ME 농도의 결과  $81.1 \pm 1.4\%$ 와  $81.4 \pm 1.8\%$ 와는 유의적 차이가 인정되지 않았다. 또한 12시간과 24시간 배양 결과, 모

**Table 1. *In vitro* maturation of bovine oocytes treated with various concentrations and incubation time of  $\beta$ -mercaptoethanol( $\beta$ -ME)**

Concentration of $\beta$ -ME( $\mu$ M)	Maturation for 12 h			Maturation for 24 h		
	No. of oocytes			No. of oocytes		
	Culture	Matured	(%, mean $\pm$ S.E)	Culture	Matured	(%, mean $\pm$ S.E)
0(control)	155	102	(65.8 $\pm$ 3.2) <sup>a,c</sup>	155	115	(74.2 $\pm$ 1.7) <sup>a,d</sup>
25	155	121	(78.1 $\pm$ 2.7) <sup>b,c</sup>	155	136	(87.7 $\pm$ 3.2) <sup>b,d</sup>
50	155	117	(75.5 $\pm$ 3.2) <sup>b,c</sup>	155	128	(82.6 $\pm$ 2.7) <sup>b,d</sup>

<sup>a,b</sup> Values with different subscripts in same column differ( $p < 0.05$ ).

<sup>c,d</sup> Values with different subscripts in same width differ( $p < 0.05$ )

**Table 2. Effect of  $\beta$ -ME concentration during IVM on PN formation after IVF**

Concentration of $\beta$ -ME( $\mu$ M)	Maturation for 12 h		Maturation for 24 h	
	No. of oocytes For IVF	PN formation rate (% , mean $\pm$ S.E)	No. of oocytes For IVF	PN formation rate (% , mean $\pm$ S.E)
0(control)	102	76.8 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	115	72.9 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
25	121	82.6 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	136	84.8 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
50	117	81.1 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	128	81.4 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>

PN: Pronucleus

<sup>a,b</sup> Values with different subscripts in same column differ( $p$ <0.05).

든 실험구에서 큰 차이를 나타나지 않음을 알 수 있었다.

### 3. $\beta$ -ME의 첨가가 세포질 내 GSH 수준에 미치는 영향

Table 3은 소의 난포란에서  $\beta$ -ME 농도별 난자의 GSH 수준을 측정된 결과이다.  $\beta$ -ME의 처리 농도가 높을수록 세포질 내 GSH의 수준이 높아짐을 나타내고 있음을 알 수 있다. 12시간 배양시 50  $\mu$ M 농도에서 성숙난자와 수정란의 세포질 내 GSH 수준은 26.6 $\pm$ 0.5 pmol과 23.4 $\pm$ 0.4 pmol로 25  $\mu$ M 농도의 21.8 $\pm$ 0.4 pmol과 16.6 $\pm$ 0.3 pmol, 그리고 대조구의 13.2 $\pm$ 0.3과 11.7 $\pm$ 0.3 pmol보다 유의적으로 높았다( $p$ <0.05). 24시간 배양 결과 역시 50  $\mu$ M 농도에서 28.0 $\pm$ 0.1 pmol과 25.1 $\pm$ 0.3 pmol로 25  $\mu$ M의 21.8 $\pm$ 0.2 pmol과 17.2 $\pm$ 0.8 pmol 그리고 대조구의 13.3 $\pm$ 0.2 pmol과 12.2 $\pm$ 0.1 pmol보다 유의적으로 높았다( $p$ <0.05). 그러나 성숙이 되지 않은 난자의 세포질 내 GSH의 수준에 있어서는 25  $\mu$ M과 50  $\mu$ M 농도에서 대조구보다 유의적으로 높은 결과를 나타냈으나( $p$ <0.05), 두 농도구 사이의 차이는 인정되지 않았다.

## 고 찰

$\beta$ -ME는 정상적인 대사과정에서 발생하는 유해한 활성산소로부터 세포를 보호하는 항산화제의 일종이며, amino acid의 이동과 DNA의 합성을 촉진하는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Lafleur *et al.*, 1994). 본 실험에서 소의 미성숙

난포란의 체외성숙 배양액에  $\beta$ -ME를 농도별로 처리하여 난자의 성숙율을 확인한 결과  $\beta$ -ME가 첨가된 배양액에서 배양된 실험군이 대조구에 비해 유의하게 높았다. 또한 성숙 배양 시간에 있어 12시간 배양구보다 24시간 배양구에서 유의적으로 높은 결과를 보여  $\beta$ -ME가 배양시간의 단축에는 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 그러나  $\beta$ -ME의 처리 농도에 있어 소의 미성숙난자의 체외성숙 유기시 배양액에 1 nM 농도의  $\beta$ -ME를 첨가하여 metaphase의 도달율이 보고되거나(Mizushima & Fukui, 2001), TCM-199액에 10  $\mu$ M  $\beta$ -ME 첨가에서 배양 시 높은 난핵포 붕괴를 보고되었고(한 등, 1998), CR1aa에 50  $\mu$ M의  $\beta$ -ME 첨가에서 유의적으로 높은 상실배 및 배반포 발달의 결과를 보고한 바와 같이(양 등, 1997), 본 실험에서  $\beta$ -ME를 첨가한 배양액에서 대조구에 비해 성숙율이 유의하게 높게 나타났다. 이는  $\beta$ -ME가 배양 중에 GSH의 합성 전구물질인 cysteine의 양을 증가시키고(de Matos *et al.*, 1996; Kito & Bavister, 1997; Sawai *et al.*, 1997) 증가된 GSH가 세포질 내 축적되어 있다가 체외성숙 시 핵성숙을 촉진하여(한 등, 1998; Whitake & Knight, 2004) 높은 체외성숙을 유기하는 것으로 사료된다(de Matos *et al.*, 1995, 1996; Abeydeera *et al.*, 1998). 그러나 적정농도의  $\beta$ -ME는 GSH의 합성을 위한 중요한 요소이지만 고농도의  $\beta$ -ME는 세포내 산화 환원의 균형을 깨뜨려 세포 사멸을 유도하는 독성작용을 하는 것으로 알려져 있다(Kitagawa *et al.*, 2004). 본 실험의 결과에서 볼 때 저농도의

**Table 3. GSH concentration (pmol) in bovine oocytes after IVM or IVF**

Concentration of $\beta$ -ME( $\mu$ M)	GSH in oocytes for 12 h IVM			GSH in oocytes for 24 h IVM		
	Unmatured	Matured	Fertilized	Unmatured	Matured	Fertilized
0(control)	5.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	13.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	11.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	13.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	12.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
25	18.8 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	21.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	16.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	17.6 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	21.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	17.2 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
50	19.5 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	26.6 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>	23.4 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	19.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	28.0 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	25.1 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup> Values with different subscripts in same column differ( $p$ <0.05).

$\beta$ -ME가 첨가된 배양액은 난자내 GSH의 합성을 증가시키고, 체외배양시 발생하는 oxidative stress로부터 난자를 보호하여 체외성숙율을 증가시키지만 시간의 단축에는 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

본 실험에서 체외성숙 배양액에  $\beta$ -ME를 첨가하여 체외성숙이 유기된 난자를 체외수정에 이용하여 응성전핵 형성을 확인한 결과,  $\beta$ -ME를 첨가하여 배양한 경우 대조구에 비하여 유의적으로 높은 결과를 나타냈다. 그러나 25  $\mu$ M 농도가 50  $\mu$ M 농도보다는 다소 높은 응성전핵 형성을 보였으나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 미성숙 난포란의 체외수정시  $\beta$ -ME 처리에서 높은 전핵 형성을 보고하였고 (Abeydeera *et al.*, 1998), cysteamine의 첨가에서 체외수정 후 배발달율이 높다고 보고되었으며(de Matos *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1993), 체외수정에 있어 GSH는 세포질의 생물학적 다양한 반응을 일으키는 물질중의 하나로서 배양액에  $\beta$ -ME의 첨가는 세포내의 GSH 농도를 증가시켜 체외수정율을 높이고 배발달율을 향상시킨다고 하였다(Takahashi *et al.*, 1993). 또한 세포질 내 GSH의 농도는 체외성숙 배양기간동안에 증가하며,  $\beta$ -ME는 GSH의 합성을 촉진시킨다(Lim 등, 1996). 소의 미성숙난포란의 체외성숙 유기시 항산화제 역할을 수행하는 다양한 chemical을 배양액에 첨가하여 높은 체외수정율을 보고하였으며(Pinyopummintr & Bavister(1991), 체외성숙 배양액에 GSH 전구물질인 cysteine을 첨가하여 높은 수정율과 배아 발달이 보고된 바 있다 (Ali *et al.*, 2003). 이러한 결과들을 볼 때, 체외성숙 기간 동안 배양액에 첨가된  $\beta$ -ME가 세포질 내 GSH 합성을 촉진시켜 GSH의 수준을 증가시키며, 체외수정 후 응성전핵 형성에 도움을 주는 것으로 사료된다. 그러나 본 실험에서는 배아 발달의 결과를 가지지 못했으므로 지속적인 연구를 수행하여  $\beta$ -ME의 첨가가 배아 발달에 미치는 영향에 대해 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서 소의 미성숙 난포란에  $\beta$ -ME를 농도별로 처리하여 체외성숙을 유기시킨 후 체외수정을 실시하여 각 단계별 난자내 GSH 수준을 측정된 결과, 성숙된 50  $\mu$ M 농도의  $\beta$ -ME 첨가구에서 가장 높은 GSH 수준을 나타냈다. 특히 체외성숙된 난자와 체외수정 후의 난자의 세포질 내 GSH는 다른 실험구해 비해 유의적으로 높았다. 또한 12시간과 24시간 동안 체외성숙을 유기시킨 난자의 세포질 내 GSH의 수준에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 체외성숙 직후의 세포질 내 GSH의 수준과 체외수정 후 세포질 내 GSH 수준을 비교하였을 때, 체외성숙 후보다 수정 후에 GSH의 수준이 다소 낮아짐을 알 수 있었다. 이와 같은 결과

는 소의 미성숙 난포란의 체외성숙시 항산화 물질로서 황화합물을 첨가하였을 때 체외성숙 후 세포질 내 GSH 수준이 증가하였음을 보고한 바와 일치한다(Oyamada & Fukui, 2004). 이러한 결과로  $\beta$ -ME의 첨가가 세포질 내의 GSH의 합성을 높이고 체외성숙율과 체외수정에 영향을 주고 있음을 알 수 있다(de Matos *et al.*, 1995, 1997; Gardiner & Donale, 1995; Abeydeera *et al.*, 1999; Whitake & Knight, 2004). 또한 체외성숙이 유기된 난자의 세포질 내 GSH 수준에 비하여 체외수정 후 세포질 내 GSH의 수준이 감소하는 결과는 체외성숙 동안 합성된 세포질 내의 GSH의 농도가 세포질 내에 축적되어 있다가 체외수정시 소모되어 감소된 것으로 사료되며, 체외성숙 후의 GSH 수준이 체외수정 후 급격히 감소함을 보고한 결과와 일치하였다(Yoshida *et al.*, 1993). 이는 미성숙 난자가 성숙과 수정과정 동안 일정수준의 세포질 내 GSH를 요구하고 있음을 시사한다. 배아발달까지 동안 높은 세포질 내 GSH 수준이 도움을 준다는 보고가 되고 있다(de Matos *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2003; Oyamada & Fukui, 2004).

이상의 결과를 종합하여 보면 미성숙 난포란의 체외성숙시  $\beta$ -ME의 첨가는 세포질 내 GSH의 합성을 촉진시켜 체외성숙율을 높이고 체외수정 후 응성전핵 형성을 높이는 데 도움을 주는 작용을 하는 것으로 생각되나 최적의 조건을 찾기 위하여 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Abeydeera LR, Wang, WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN (1998) Presence of  $\beta$ -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.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN (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* 7:203-210.
- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA (2003) Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59:939-949.
- Corsby IM, Gandolfi F, Moor RM (1988) Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J Reprod*

- Fertil 82:769-775.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H (1995) Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. Mol Reprod Dev 42:432-436.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M (1996) Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. Mol Reprod Dev 45:451-457.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF (1997) Gluta-taurine synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. Biol Reprod 57:1420-1425.
- de Matos DG, Furnus CC (2000) The importance of having high glutathion (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine and cystine. Theriogenology 52:761-771.
- de Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS (2002) Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: A useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. Mol Reprod Dev 62: 203-209.
- Gardiner CS, Donale DJ (1995) Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. Arch Biochem Biophys 318:30-36.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1992) Free radicals in biology and medicine. Clarendin Press Oxford.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watamabe T (2004) Effect of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species(ROS) and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology 62:1186-1197.
- Kito S, Bavister BD (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.
- Lafleur MV, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ, Retel J (1994) The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. Free Radic Res 21:9-17.
- Li J, Foote RH (1993) Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. J Reprod Fertil 98:163-167.
- Lim JM, Liou SS, Hansel W (1996) Intracytoplasmic glutathion concentration and role of  $\beta$ -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. Theriogenology 46:429-439.
- Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M (1995) Glutathion concentraion during maturation and fertilization in bovine oocytes. Theriogenology 43(Issue 1):282.
- Mizushima S, Fukui Y (2001) Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. Theriogenology 55:1431-1445.
- Oyamada T, Fukui Y (2004) Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. Bio Repro 45:736-742.
- Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL (1988) Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed *in vivo* by sperm microinjection and *in vitro* by flow cytometry. Biol Reprod 39:157-167.
- Pinyopommintr T, Bavister BD (1991) *In vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine oocytes can develop morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture media. Biol Reprod.
- Sawai K, Funahashi H, 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.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A (1993) Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod 49:228-232.
- Takahashi H, Kuwayama M, Hamano S, Takahashi M, Okano A, Kadokawa H, Kariva T, Nagai T (1996) Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos curing long-distance transportation in plastic straw. Theriogenology 46:1009-1015.
- Whitake BD, Knight JW (2004) Exogenous  $\gamma$ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and viability

- parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 62:311-322.
- 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, 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.
- 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.
- 한만희, 박병권, 박창식, 서길웅, 이규승 (1998)  $\beta$ -mercaptoethanol 및 cysteine이 돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 22:376-83.