Pantothenic Acid, Myo-Inositol 및 Folic Acid가 돼지 단위 발생 배아의 체외발육에 미치는 영향

유 진 영[1], 이 은 송[1,2,*]
[1]강원대학교 수의과대학, [2]강원대학교 동물의학종합연구소

Effect of Pantothenic Acid, Myo-Inositol, and Folic Acid on *In Vitro* Development of Parthenogenetic Pig Embryos

Jinyoung You[1] and Eunsong Lee[1,2,*]
[1]*College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*
[2]*Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the effect of vitamin B (pantothenic acid, folic acid, and myo-inositol) that was supplemented to embryo culture medium on *in vitro* development of parthenogenetically activated (PA) pig embryos. Cumulus-oocyte complexes derived from slaughtered ovaries were matured in TCM-199 supplemented with porcine follicular fluid, cysteine, pyruvate, EGF, insulin, and hormones (hCG and eCG) for the first 22 h and then further cultured in hormone-free medium for an additional 22 h. After maturation culture, metaphase II oocytes that extruded 1st polar body were electrically activated and treated with 5.0 μg/ml cytochalasin B for 4 h. Then, PA embryos were cultured for 7 days in a modified NCSU-23 that was supplemented with pantothenic acid, myo-inositol, or folic acid at different concentrations (3~300 μM) according to the experimental design. Myo-inositol added to culture medium did not show any beneficial or inhibitory effects on embryo cleavage and blastocyst formation. However, 300 μM pantothenic acid significantly inhibited blastocyst formation compared to control (no addition) (24% vs. 36%, $p<0.05$). Folic acid (300 μM) significantly ($p<0.05$) increased blastocyst formation (56%) compared to control (41%). Our results demonstrated that *in vitro* development of PA embryos was significantly influenced by vitamin B and addition of 300 μM folic acid to culture medium improved *in vitro* development of pig PA embryos.

(Key words : pantothenic acid, myo-inositol, folic acid, parthenogenesis, pig)

서 론

난자의 체외성숙 및 체외배양 기법은 가축의 번식률 향상과 DNA 도입을 통한 형질전환 동물 또는 체세포 복제동물의 생산 등에 효과적으로 이용될 수 있다. 또한 단위 발생 배아는 줄기세포주 수립을 위한 연구 및 체외수정란 또는 체세포 복제수정란의 배양 체계를 검토하기 위한 모델로서 이용될 수 있다. 현재 많은 연구자들에 의해 여러 동물 종의 난모세포를 이용한 난자의 활성화, 체외수정 또는 체세포 복제 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 돼지 수정란의 체외발육능은 체외성숙 및 배양 환경 등 많은 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Park 등, 2005; Viet Linh 등, 2009; Kim 등, 2010). 현재 체외성숙 유래의 난자를 이용한 체외수정 또는 단위 발생 후 약 20~50%의 배반포 형성률을 보이고 있으나, 이는 체내수정 유래의 배아 발육능에 비해 낮은 실정으로 체외성숙 및 체외배양 체계는 개선되어야 할 부분이 남아 있다. Tao 등(1999)이 돼지 복제수정란의 생산에 관하여 보고한 이후, 현재까지 복제수정란의 발육능을 증진시키기 위한 많은 연구가 수행되어 왔다(Ikeda와 Takahashi, 2001; Hyun 등, 2003; Im 등, 2004). 그러나 체내 수정 유래의 배아 발달에 비해 체외에서 성숙 및 수정된 배아는 낮은 체외발육능을 보임으로 인해(Beckmann과 Day, 1993; Nagashima 등, 1993; Rath 등, 1995) 돼지 체외수정란 이식에 의한 산자 생산 보고는 다른 가축에 비해 적은 실정이다. Wang 등(1997)은 Tissue Culture Medium-199(TCM-199), modified Whitten medium 및 North Carolina State University-23(NCSU-23) 배양액에 동일한 양의

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070301034040) 및 강원대학교 동물의학종합연구소의 지원에 의하여 수행되었음.
* Correspondence : E-mail : eslee@kangwon.ac.kr

cysteine을 첨가하여 돼지 난자를 체외에서 성숙시킨 다음 체외수정 후 NCSU-23 배양액에서 배양한 결과, 배양액의 종류에 따라 배반포 발육률에 차이가 있다고 보고하였다. 이는 체외배양액의 성분이 돼지 수정란의 체외발육에 중요한 영향을 미친다는 것을 간접적으로 시사한다. 돼지 수정란의 체외배양에는 NCSU-23, Porcine Zygote Medium(PZM)-3, PZM-4 및 TCM-199 등이 주로 이용되고 있는데, 배양액에 따라 에너지원, 아미노산, 무기염류 및 단백질 성분 등에 차이를 보인다.

수정란의 체외배양 배지는 각종 성장 인자, 아미노산, 비타민, 미네랄, 에너지원 등 다양한 구성물로 이루어져 있으며, 이들 구성 성분은 돼지 단위 발생 배아의 체외발육에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 1997). 그 중 아미노산이나 비타민 등의 체외배양액 첨가는 동물 종에 따라 다양한 결과를 보이고 있다. 비타민 B에 속하는 pantothenic acid는 coenzyme A의 필수 구성 요소(Hoagland와 Novelli, 1954)로 여러 동물 종에서 에너지 대사에 중요한 역할을 하며(Evans 등, 1951; Yacowitz 등, 1951; Welch와 Couch, 1954; Balloun과 Phillips, 1957), 배반포의 hatching을 촉진한다. Myo-inositol은 C_6 sugar alcohol의 isomer로서 비타민 B의 일종으로 세포의 증식, 분화, 지질 합성, 세포막 구성과 세포 성장에 중요한 역할을 한다(Berridge, 1987; Kane, 1988; Downes, 1989). Chiu와 Tam (1992)은 myo-inositol이 마우스 수정란의 체외발육을 촉진시키는 물질로 사람 혈청에 존재하는 인자일 것이라고 보고하였고, Fahy와 Kane(1993)은 토끼의 난자에서 myo-inositol이 inositol phosphate와 phosphoinositide에 융합된다고 보고하였다. Holm 등(1999)은 sodium citrate와 myo-inositol을 소 난자의 체외배양 배지에 첨가하였을 때 배반포로의 발달이 촉진되었다고 보고하였다. Myo-inositol의 phosphatidylinositol 신호 변환 시스템은 세포 증식을 포함한 다양한 세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다(Berridge와 Irvine, 1989). Inositol을 토끼 수정란의 체외배양액에 첨가하였을 때 수정란의 DNA와 단백질 합성을 돕고 배반포 확장을 증가시키는 것으로 보고되었으며(Fahy와 Kane, 1992), Ham's F-10 medium에 myo-inositol을 2 mM 첨가하여 소 수정란을 배양하였을 때 배반포로의 발달이 증가하였다고 보고되었다(Brown과 Whittingham, 1990). Folic acid 또한 비타민 B군에 속하는 물질로서 pantothenic acid와 더불어 여러 동물 종에서 에너지 대사에 도움을 주며(Welch와 Couch, 1954; Balloun과 Phillips, 1957), 세포의 성장, 적혈구 형성, DNA와 RNA의 합성 및 세포의 단백질 합성에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 체외배양액에 첨가된 비타민 B군에 속하는 pantothenic acid, myo-inositol 및 folic acid가 체외성숙 유래 돼지 단위 발생 배아의 체외발육능에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배양액 및 시약

본 연구에 사용한 모든 시약은 특별한 설명이 없는 한 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 미성숙난자의 체외성숙에 사용된 기본 배양액으로는 TCM-199(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)에 10%(v/v) porcine follicular fluid, 0.6 mM cysteine, 0.91 mM pyruvate, 10 ng/ml 상피세포 성장인자, 75 μg/ml kanamycin과 1 μg/ml insulin을 첨가하여 사용하였다. 체외배양에는 0.4%(w/v) bovine serum albumin(BSA)이 포함된 NCSU-23 배양액(Petters와 Wells, 1993)에 glucose 대신 0.5 mM pyruvate와 5.0 mM lactate를 에너지원으로 첨가하여 사용하였다(Park 등, 2005).

2. 난자의 채취 및 체외성숙

도축장에서 도축한 미경산돈으로부터 난소를 채취한 후 37℃의 멸균 생리식염수에 넣어 실험실로 운반하였다. 일회용 주사기(10 ml 용량)에 18-G의 주사침을 부착하여 3~8 mm 직경의 난포에서 난포 내용물을 흡인하였다. 난포 내용물을 15 ml 원심관에 담아 침전물이 가라앉도록 5분간 정치하였다. 상층액을 제거한 후 난자가 포함된 침전물을 0.05% (w/v) polyvinyl alcohol(PVA)과 HEPES buffer가 포함된 Tyrode's medium(TLH-PVA)(Bavister 등, 1983)에 옮긴 후 실체현미경 하에서 난자를 관찰하였다. 세 층 이상의 치밀한 난구세포로 둘러싸인 cumulus-oocyte complexes(COCs)를 선별하여 채취한 후 체외성숙에 이용하였다. COCs는 2차례 이상 TLH-PVA에서 세정한 후 체외성숙 배양액으로 1회 세정하였다. 그 후 5 IU/ml eCG(Intervet International BV, Holland)와 5 IU/ml hCG(Intervet International BV)가 포함된 500 μl의 체외성숙 배양액이 들어 있는 4-well multi-dish(Nunc, Roskilde, Denmark)의 각 well에 50~90개의 COCs를 넣어 39℃, 5% CO_2 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 체외배양 22시간 후에 COCs를 호르몬이 포함되지 않은 체외성숙 배양액으로 3회 세정한 후 호르몬이 첨가되지 않은 체외성숙 배양액에서 추가로 22시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

3. 난자 활성화 및 단위 발생 배아의 체외배양

체외성숙 종료 후 난자로부터 난구세포를 제거한 후 제1극체를 방출한 *metaphase* II(MII)기의 성숙난자를 선별하였다. MII기 난자를 0.01 mM $CaCl_2$와 0.05 mM $MgCl_2$가 포함된 280 mM mannitol 용액에 넣어 1분간 평형시킨 후 120 V/cm의 직류 전압으로 60 μsec 동안 2회 통전하여 난자의 활성화를 유도하였다. 전기자극 후 난자를 5 μg/ml cytochalasin B(CB)가 첨가된 NCSU-23 배양액에서 4시간 동안 배양하였다. 최종적으로 CB 처리로 유도된 단위발생 배아를 체외배양 배지

로 3회 세정한 후 mineral oil을 도포한 30 μl 용량의 체외배양 배지에 옮겨 배양하였다. 단위 발생 배아는 39℃, 5% CO_2, 5% O_2와 90% N_2의 배양 조건 하에서 7일간 체외배양하였다.

4. 실험 설계

실험 1에서는 pantothenic acid(0, 3, 30, 300 μM), 실험 2에서는 myo-inositol(0, 3, 30, 300 μM), 실험 3에서는 folic acid (0, 3, 30, 300 μM)의 첨가 농도에 따른 돼지 단위 발생 배아의 체외발육능을 조사하였다. 체외배양 2일 및 7일째에 각각 분할율 및 배반포 형성률을 조사하였다. 또한 단위 발생 배아로부터 형성된 배반포를 5 μg/ml Hoechst 33342로 15분간 염색한 후 형광현미경 하에서 염색된 핵을 관찰하여 배반포의 평균 세포수를 산정하였다.

5. 통계 분석

실험 결과는 Statistical Analysis System(SAS, version 9.1; Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA)을 이용한 일반선형모델(general linear model)로 분산분석을 실시하였다. 처리 평균간의 차이는 least significant difference(LSD) test를 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다. 실험 결과는 mean ± standard error of the mean(SEM)으로 나타내었다.

결 과

실험 1: 체외배양액에 첨가된 Pantothenic Acid가 돼지 단위 발생 배아의 체외 발육능에 미치는 영향

단위 발생 배아의 체외배양 배지인 NCSU-23 배양액에 각각 0, 3, 30 및 300 μM의 pantothenic acid를 첨가하여 단위 발생 배아를 배양한 결과, 분할율은 각각 83, 81, 85 및 82%로 첨가 농도에 따른 유의적인 차이가 없었으나, 배반포 형성률은 각각 36, 34, 32 및 24%로 300 μM pantothenic acid 첨가군이 대조군 및 3 μM 첨가군에 비해 유의적으로 낮은($p<0.05$) 배반포 형성률을 나타내었다(Table 1). 배반포의 평균 세포수는 27~30개로 처리군 간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 1. Effect of pantothenic acid in a culture medium on *in vitro* development of parthenogenetic pig embryos

Pantothenic acid (μM)	No. of embryos cultured[a]	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
		≥ 2-cell	Blastocyst	
0	160	83 ± 4	36 ± 2[b]	30 ± 1
3	162	81 ± 1	34 ± 4[b]	30 ± 1
30	159	85 ± 4	32 ± 2[bc]	27 ± 1
300	160	82 ± 6	24 ± 3[c]	27 ± 2

[a] Four replicates.

[bc] Within a column, values with different superscripts are different ($p<0.05$).

실험 2: 체외배양액에 첨가된 Myo-inositol이 돼지 단위 발생 배아의 체외발육능에 미치는 영향

돼지 단위 발생 배아를 각각 0, 3, 30 및 300 μM의 myo-inositol을 첨가한 NCSU-23 배양액에서 배양한 결과, 분할율은 각각 80, 86, 86 및 81%로 유의적인 차이가 없었으며, 배반포 형성률은 각각 41, 45, 46 및 40%로 myo-inositol 첨가에 의해 영향을 받지 않았다(Table 2). 배반포의 평균 세포수는 30~33개로 처리군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

실험 3: 체외배양액에 첨가된 Folic Acid가 돼지 단위 발생 배아의 체외발육능에 미치는 영향

돼지 단위 발생 배아의 체외배양 배지인 NCSU-23 배양액

Table 2. Effect of myo-inositol in a culture medium on *in vitro* development of parthenogenetic pig embryos

Myo-inositol (μM)	No. of oocytes cultured[a]	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
		≥ 2-cell	Blastocyst	
0	146	80 ± 4	41 ± 3	33 ± 2
3	145	86 ± 4	45 ± 6	32 ± 1
30	144	86 ± 3	46 ± 4	33 ± 2
300	145	81 ± 5	40 ± 5	30 ± 1

[a] Three replicates.

Table 3. Effect of folic acid in a culture medium on *in vitro* development of parthenogenetic pig embryos

Folic acid (μM)	No. of oocytes cultured[a]	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
		≥ 2-cell	Blastocyst	
0	197	81 ± 2	41 ± 2[b]	35 ± 2
3	200	89 ± 1	41 ± 6[b]	33 ± 1
30	196	81 ± 2	36 ± 4[b]	34 ± 1
300	197	84 ± 1	56 ± 4[c]	32 ± 1

[a] Five replicates.

[bc] Within a column, values with different superscripts are different ($p<0.05$).

에 0, 3, 30 및 300 μM의 folic acid를 첨가하여 단위 발생 배아를 배양한 결과, 분할율은 각각 81, 89, 81 및 84%로 처리군 간에 유의적인 차이가 없었으나, 배반포 형성률은 각각 41, 41, 36 및 56%로 300 μM 첨가군이 대조군, 3 및 30 μM 첨가군에 비해 유의적으로 높은($p<0.05$) 배반포 형성률을 나타내었다(Table 3). 배반포의 평균 세포수는 32~35개로 처리군 간에 유의적인 차이가 없었다.

고 찰

돼지 수정란의 체외배양에는 NCSU-23, PZM-3, PZM-4 및 TCM-199 등 다양한 배양액이 이용되고 있으며, 각각의 체외배양 배지에 따라 수정란 또는 단위 발생 배아의 체외발육능이 다르게 나타나는 것으로 보고되었다(Dobrinsky 등, 1996; Yoshioka 등, 2002). 체외배양 배지는 아미노산, 성장인자, 비타민, energy substrate 등으로 구성되어 있으며, 특히 비타민은 그 종류와 농도에 따라 난자의 발육과 배반포의 질 향상에 영향을 미친다(McKiernan과 Bavister, 2000). 마우스 수정란의 체외배양 배지에 F-10 비타민을 첨가할 경우 배 발육이 감소하며(Tasi와 Gardner, 1994), 이와는 대조적으로 토끼 수정란의 배 발육에 있어 inositol, pyridoxal, riboflavin 및 niacinamide가 필수적이라는 보고가 있다(Daniel, 1967; Kane, 1988). 햄스터에서는 inositol, pantothenic acid 및 choline이 배반포의 hatching을 위해 필요하며(Kane와 Bavister, 1988), O'Neill (1998)은 마우스 수정란의 발육에 folic acid가 필수적이라고 보고하였다. 비타민이 난자의 발달에 긍정적인 영향뿐 아니라 부정적인 영향 또한 미친다는 확실한 보고는 없으나 일정 농도 이상의 비타민은 난자의 발달을 저해할 수 있으며(Tasi와 Gardner, 1994), 종에 따라 난자의 발달에 필수적인 비타민의 종류와 농도는 다양하게 존재하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 돼지 단위 발생 배아의 체외발육능을 향상시키기 위해 NCSU-23 배양액에 비타민 B군에 속하는 pantothenic acid, myo-inositol 및 folic acid를 3~300 μM 농도로 첨가하여 단위 발생 배아를 체외배양함으로써 이들 물질에 의한 체외발육능 개선 여부를 검토하였다. 본 실험에서 돼지 단위 발생 배아의 체외배양액에 pantothenic acid, myo-inositol 및 folic acid를 각각 3, 30 및 300 μM의 농도로 NCSU-23 배양액에 첨가하여 첨가 농도에 따른 효과를 비교한 결과, 분할율은 첨가물의 종류 및 농도에 따라 유의적인 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러나 pantothenic acid 300 μM 첨가군은 대조군에 비해 유의적으로 낮은 배반포 형성률을 보임으로써 착상 전 배아발달에 해로운 영향을 보였다. 이 결과는 3 μM pantothenic acid를 햄스터 수정란의 체외배양 배지에 첨가하였을 때 햄스터 수정란의 oxidative metabolism에 관여하여 배아의 생존을 촉진하고(Slyshenkov 등, 1996), acetyl-CoA 형성을 통해 배반포 발생률을 증가시켰다는 보고와는 대조적이었다(McKiernan과 Bavister, 2000). Pantothenic acid는 햄스터 수정란의 상실배 이후의 발육에 영향을 미쳐 배반포의 hatching을 촉진하는 것으로 알려져 있으며(Kane와 Bavister, 1986; 1988), 첨가시기에 따른 발생률의 차이는 없는 것으로 보고되었다(McKiernan과 Bavister, 2000). 햄스터 수정란의 체외배양에서는 pantothenic acid를 체외배양 배지에 0~1 mM의 농도로 첨가하였을 때 3 μM pantothenic acid 첨가군에서 가장 높은 배반포 형성률을 나타내었으나, 농도간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다(McKiernan과 Bavister, 2000). 본 실험에서는 인간(0.5~0.9 μM), 소(0.1 μM) 및 세포 배양액인 minimum essential medium(MEM)/basal medium eagle(BME) (0.42 mM) 내의 pantothenic acid 농도를 바탕으로 다양한 농도를 설정하여 실험에 사용하였다(Eagle, 1959; Rychlik, 2000). 일반적으로 돼지의 체내에는 18.7 nM의 pantothenic acid가 존재하는데(Stahly와 Lutz, 2000), 본 실험에 사용된 pantothenic acid 농도는 돼지 체내의 생리적 수준보다 약 160~16,042배의 고농도임을 알 수 있다. 이로 미루어 볼 때 생리학적 농도보다 과도하게 높은 수준의 pantothenic acid는 돼지 단위 발생 배아의 체외발생률을 저하시키는 것으로 추측된다.

Myo-inositol은 세포 형성, 분화, 지질 합성, 세포 막 구성과 세포 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Berridge, 1987; Downes, 1989). 본 실험에서 myo-inositol을 NCSU-23 배양액에 첨가하였을 때 단위 발생 배아의 체외발달에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Inositol은 토끼 배반포에서 DNA 합성에 필수적이며 수정란의 세포수를 증가시키고 배반포 형성을 향상시키는 것으로 보고되었으며(Fahy와 Kane, 1992), 햄스터 수정란의 hatching을 촉진하는 것으로 나타났다(Kane와 Bavister, 1988). 이와는 반대로 햄스터 수정란의 체외배양에서 3 μM myo-inositol을 체외배양 배지에 첨가하였을 때 배 발육에 영향을 미치지 않았으며, myo-inositol을 pantothenic acid와 같이 첨가하였을 때 pantothenic acid 단독 처리에 비해 낮은 배아 발달율을 나타내었다(McKiernan과 Bavister, 2000). Inositol은 종에 따라 다양한 생리학적 농도를 가지고 있는데, 인간의 경우 임신한 여성의 혈장내에는 21.4 μM의 myo-inositol이 존재하며(Quirk와 Bleasdale, 1983), MEM/BME에는 1.11 mM의 myo-inositol이 첨가되어 사용되고 있다. 실제 소 수정란의 체외배양에 사용된 *myo-inositol* 농도는 2 mM로 보고되었으며(Brown과 Whittingham, 1990), 돼지 단위 발생 배아의 활성화에는 이보다 약 40배가 낮은 50 μM의 농도로 사용되었다(Petr 등, 2002). 따라서 본 실험의 결과에 있어서 myo-inositol이 소와는 달리 단위 발생 배아의 체외발생률에 영향을 미치지 못한 이유로 myo-inositol의 낮은 농도를 의심할 수 있으며, 소와 돼지의 종간에 따른 차이를 고려해 볼 수 있다.

본 실험에서 300 μM folic acid를 NCSU-23 배양액에 첨가하여 단위 발생 배아를 배양하였을 때 배반포 형성률이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. Folic acid는 DNA methylation을 억제하고 정상적인 태아 발달에 중요한 역할을 한다(Miller 등, 1989). 이와는 반대로 3 μM folic acid는 햄스터 수정란의 발육에 영향을 미치지 못하였으며(McKiernan과 Bavister, 2000), 마우스 체외수정란의 경우 체외배양액에 0.0624~4 μg/ml folic acid를 첨가하였을 때 배 발육에 영향을 미치지 못하는 것으로 보고되었다(O'Neill, 1998). Folic acid는 사람(7~30 nM), 소(30~60 nM), MEM/BME(0.23 mM) 및 임신한 암퇘지의 혈장 내(104 nM)에 다양한 농도로 존재한다(van der Molen 등, 1996; Barkow 등, 2001; Courtemanche 등, 2004; Brevik 등, 2005). 소 및 사람과 비교해 볼 때 돼지의 생체 내 folic acid 농도는 약 1.7~3배 높은 편이며 따라서 수정란의 체외배양에 folic acid를 첨가하였을 때 높은 농도의 folic acid에서 세포 증식 기전이 자극을 받아 배반포 형성률이 증가한 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 체외배양액에 비타민 B군에 속하는 pantothenic acid, myo-inositol 및 folic acid의 첨가가 돼지 단위 발생 배아의 체외발육능에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 설계에 따라 체외배양액에 각각 0(대조군), 3, 30 및 300 μM의 pantothenic acid, myo-inositol 및 folic acid를 첨가하여 돼지 단위 발생 배아를 7일 동안 체외배양하여 배아의 분할율, 배반포 형성률 및 배반포의 세포수를 조사한 결과, 분할율은 첨가물질의 종류 및 농도에 따라 유의적인 영향을 받지 않았다. 그러나 300 μM의 pantothenic acid는 배반포 형성률을 유의적으로 저해하였으며, 300 μM folic acid 첨가는 배반포 형성을 유의적으로 증가시켰다. 결론적으로 돼지 단위 발생 배아의 체외발육능은 배양액에 첨가되는 비타민 B의 종류 및 첨가농도에 의해 영향을 받는 것으로 사료된다.

참고문헌

Balloun SL and Phillips RE. 1957. Interaction effects of vitamin B_{12} and pantothenic acid in breeder hen diets on hatchability, chick growth and livability. Poultry Sci. 36:929-934.

Barkow B, Pietriz K and Flachowsky G. 2001. Effect of folic acid supplements on homocysteine concentration in plasma of gestating sows. Arch. Anim. Nutr. 54:81-85.

Bavister BD, Leibfried ML and Lieberman G. 1983. Development of preimplantation embryos of the Golden Hamster in a defined culture medium. Biol. Reprod. 28:235-247.

Beckmann LS and Day BN. 1993. Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. Theriogenology 39:611-622.

Berridge MJ. 1987. Inositol lipids and cell proliferation. Biochim. Biophys. Acta. 907:33-45.

Berridge MJ and Irvine RF. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. Nature 341:197-205.

Brevik A, Vollset SE, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Loeken EB, Drevon CA and Andersen LF. 2005. Plasma concentration of folate as a biomarker for the intake of fruit and vegetables: the Hordaland Homocysteine Study. Am. J. Clin. Nutr. 81:434-439.

Brown JJ and Whittingham DG. 1990. Glucose requirement for morula to blastocyst transition during culture of 1-cell F_2 hybrid mouse embryos. J. Reprod. Fertil. Abstract Series 5, 16.

Chiu TT and Tam PP. 1992. A correlation of the outcome of clinical *in vitro* fertilization with the inositol content and embryotrophic properties of human serum. J. Assist. Reprod. Genet. 9:524-530.

Courtemanche C, Elson-Schwab I, Mashivama ST, Kerry N and Ames BN. 2004. Folate deficiency inhibits the proliferation of primary human CD8+ T lymphocytes *in vitro*. J. Immunol. 173: 3186-3192.

Daniel JC. 1967. Vitamins and growth factors in the nutrition of rabbit blastocysts *in vitro*. Growth 31:71-77.

Dobrinsky JF, Johnson LA and Rath D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Biol. Reprod. 55:1069-1074.

Downes CP. 1989. Twenty-fifth Colworth medal lecture. The cellular functions of myo-inositol. Biochem. Soc. Trans. 17:259-268.

Eagle H. 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130:432-437.

Evans RJ, Groschke AC and Butts HA. 1951. Effect of vitamin B_{12} on pantothenic acid metabolism in the chick. Arch. Biochem. 31:454-456.

Fahy MM and Kane MT. 1992. Inositol stimulates DNA and protein synthesis, and expansion by rabbit blastocysts *in vitro*. Hum. Reprod. 7:550-552.

Fahy MM and Kane MT. 1993. Incorporation of [3H] inositol into phosphoinositides and inositol phosphates by rabbit blastocysts. Mol. Reprod. Dev. 34:391-395.

Hoagland MB and Novelli GD. 1954. Biosynthesis of coenzyme

A from phospho-pantetheine and of pantetheine from pantothenate. J. Biol. Chem. 207:767-773.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T and Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 52:683-700.

Hyun SH, Lee GS, Kim DY, Kim HS, Lee SH, Kim S, Lee ES, Lim JM, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. 2003. Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. Theriogenology 59: 1641-1649.

Ikeda K and Takahashi Y. 2001. Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development *in vitro* following somatic cell nuclear transfer. J. Vet. Med. Sci. 63:1003-1008.

Im GS, Lai L, Liu Z, Hao Y, Wax D, Bonk A and Prather RS. 2004. *In vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. Theriogenology 61:1125-1135.

Kane MT. 1988. The effects of water-soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts *in vitro*. J. Exp. Zool. 245: 220-223.

Kane MT and Bavister BD. 1988. Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. Biol. Reprod. 39:1137-1143.

Kane MT, Carney EW and Bavister BD. 1986. Vitamins and amino acids stimulate hamster blastocysts to hatch *in vitro*. J. Exp. Zool. 239:429-432.

Kim J, You J, Hyun SH, Lee G, Lim J, Lee E. 2010. Developmental competence of morphologically poor oocytes in relation to follicular size and oocyte diameter in the pig. Mol. Reprod. Dev. 77:330-339.

McKiernan SH and Bavister BD. 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: Pantothenate stimulates blastocyst production. Hum. Reprod. 15:157-164.

Miller PN, Pratten MK and Beck F. 1989. Growth of 9.5-day rat embryos in folic-acid-deficient serum. Teratology 39:375-385.

Nagashima H, Nagai T and Yamakawa H. 1993. *In vitro* development of *in vivo* and *in vitro* fertilized porcine zygotes. J. Reprod. Dev. 39:163-168.

O'Neill C. 1998. Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. Hum. Reprod. 13:1312-1316.

Park Y, Hong J, Yong H, Lim J and Lee E. 2005. Effect of exogenous carbohydrates in a serum-free culture medium on the development of *in vitro* matured and fertilized porcine embryos. Zygote 13:269-275.

Petr J, Urbánková D, Tománek M, Rozinek J and Jílek F. 2002. Activation of *in vitro* matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. Anim. Reprod. Sci. 70:235-249.

Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl. 1, 48:61-73.

Quirk JG Jr and Bleasdale JE. 1983. Myo-inositol homeostasis in the human fetus. Obstet. Gynecol. 62:41-44.

Rath D, Niemann H and Torres CR. 1995. *In vitro* development to blastocysts of early porcine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. Theriogenology 43:913-926.

Rychlik M. 2000. Quantification of free and bound pantothenic acid in foods and blood plasma by a stable isotope dilution assay. J. Agric. Food Chem. 48:1175-1181.

Stahly TS and Lutz TR. 2000. Pantothenic acid needs for specific biological processes in pigs. ISU Swine Research Report, ASL-R65S, Iowa State University, Ames, IA. pp. 33-38.

Slyshenkov VS, Moiseenok AG and Wajtczak L. 1996. Noxious effects of oxygen reactive species on energy-coupling processes in ehrlich ascites tumor mitochondria and the protection by pantothenic acid. Free Rad. Biol. Med. 20:793-800.

Tao T, Macharty Z, Boquest AC, Day BN and Prather RS. 1999. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes. Anim. Reprod. Sci. 56:133-141.

Tasi FC and Gardner DK. 1994. Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development *in vitro* and reduces subsequent developmental potential after transfer. Fertil. Steril. 61:376-382.

van der Molen EF, van den Heuvel LP, te Poele Pothoff MT, Monnens IA, Eskes TK and Blom HJ. 1996. The effect of folic acid on the homocysteine metabolism in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Eur. J. Clin. Invest. 26:304-309.

Viet Linh N, Dang-Nguyen TQ, Nguyen BX, Manabe N, Nagai T. 2009. Effects of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes under low oxygen tension on their subsequent *in vitro* fertilization and development. J. Reprod. Dev. 55:594-598.

Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC and Day BN. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. J. Reprod. Fertil. 111:101-

108.

Welch BE and Couch JR. 1954. Vitamin B_{12} and sub-optimal levels of pantothenic acid in chick nutrition. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87:121-123.

Yacowitz H, Norris LC and Heuser GF. 1951. Evidence for an interrelationship between vitamin B_{12} and pantothenic acid. J. Biol. Chem. 192:141-146.

Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, and Iwamura S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol. Reprod. 66:112-119.

(접수: 2010. 2. 4 / 심사: 2010. 2. 18 / 채택: 2010. 2. 22)