

## L-Cysteine을 첨가하여 동결-융해한 한우 정자의 생존성과 체외 수정 난자의 분할

박보라<sup>1</sup>, 이경진<sup>2</sup>, 이상희<sup>2</sup>, 이은송<sup>1</sup>, 정희태<sup>1</sup>, 양부근<sup>2</sup>, 박춘근<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 수의과대학, <sup>2</sup>강원대학교 동물생명과학대학

## Cleavage of *In Vitro* Fertilized Oocytes and Viability of Sperm Cryopreserved with L-Cysteine in Korea native cattle

Bola Park<sup>1</sup>, Kung-jin Lee<sup>2</sup>, Sang-Hee Lee<sup>2</sup>, Eunsong Lee<sup>1</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>1</sup>, Boo-Keun Yang<sup>2</sup>  
and Choon-Keun Park<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effect of L-cysteine on sperm characteristics and oocyte cleavage *in vitro* in Korean native cattle. For this study, the freezing of diluted semen were added with Triladyl containing 20% egg-yolk and/or 0, 5, 10 and 20 mM L-cysteine before cryopreservation. The viability in frozen-thawed sperm were estimated by SYBR14/PI double stain, acrosome damage with FITC-PNA, mitochondria intact with Rhodamin123 and hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) level with carboxy-DCFDA by flow-cytometry. The developmental capacity was also assessed with cleavage rates in oocytes fertilized *in vitro* by frozen-thawed sperm. In results, the sperm viability was significantly increased in 10 mM and 20 mM concentrations of L-cysteine than other groups ( $p<0.05$ ). In addition, acrosome damage was significantly decreased in 10 mM and 20 mM concentrations of L-cysteine than other groups ( $p<0.05$ ). The mitochondria intact was also significantly increased in 10 mM and 20 mM concentrations of L-cysteine than other groups ( $p<0.05$ ). On the other hand, the cleavage rates were significantly increased in 0 mM, 5 mM and 10 mM groups than 20 mM concentration of L-cysteine ( $p<0.05$ ). The oocyte degeneration of oocytes were significantly decreased in 0 mM, 5 mM and 10 mM groups than in 20 mM L-cysteine group ( $P<0.05$ ). However, there are no significantly differences among the L-cysteine treatment groups. We suggest that concentration of 10 mM L-cysteine have beneficial impact for sperm cryopreserved in Korean native cattle. This result also could be recommended for artificial insemination program if supported by an improvement in the fertility results and required further study.

(key words : L-cysteine, sperm cryopreservation, oocyte cleavage, viability, Korea native cattle)

### 서 론

가축 정액의 동결 보존에 관한 연구는 지난 30여 년 동안 계속하여 이루어져 왔으며, 가축의 산업화에 의해 정액의 동결 보존에 대한 필요성이 점차 증가하였다. 동결 정액은 우수한 유전자를 지닌 개체의 정액을 통하여 가축의 개량과 증식 및 유전자원으로 확보가 가능하며, 정액의 수송이 간편하며 보존성이 짧은 액상 정액의 문제점을 보완할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 신선 정액과 비슷한 수태율을 유지하기 위해 개선해야 할 점이 많이 남아 있다.

일반적으로 정액 동결 시 정자 세포 내에 과도한 활성산소

(Oxidative Reactive Species : ROS)가 생성되게 된다(Bilodeau 등 2000; Gadea 등 2004). 이러한 ROS가 저 농도로 존재하면 정자의 수정 능력 획득 및 침체 반응 유지에 생리학적으로 관여를 하지만(Baumber 등, 2000), 고농도로 존재하게 되면 불포화 지방산(polyunsaturated fatty acids)에 지질 과산화(lipid peroxidation)가 일어남으로써 원형질막이 손상되며(Kim 등, 2010), 정자의 운동성 및 생존을 저하(Zhao 등 1995), 침체의 손상 및 난자와의 융합이 억제되게 된다(Kankofer 등 2005). 이와 같은 활성 산소를 제거하기 위해 소 정액에는 자연적인 방어 시스템을 가지고 있지만, 동결로 인한 고농도의 활성 산소에 대한 방어에는 한계가 있다(Bilodeau 등, 2000; Alvarez

\* 본 연구는 농촌진흥청 국립기술사업 (과제번호 : PJ907008)의 지원에 의해 이루어졌음.

\* Correspondence : E-mail : parkck@kangwon.ac.kr

와 Storey, 2005; Nichi 등, 2006). 따라서 이러한 저해 요인들을 억제하고자 동결 보존액에 적절한 항산화제 첨가는 소 정자의 동결-융해 시 산화 손상을 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

L-Cysteine은 thiol을 포함하는 낮은 분자량의 아미노산이며, 세포막을 쉽게 통과할 수 있다. 그리고 세포 내 Glutathione(GSH)의 전구체로서(Meister와 Anderson, 1983) 세포 내 GSH의 생합성을 향상시킨다(Sagara 등, 1993; Mazor 등, 1996). *Egyptian* 및 *Italin buffalo*의 정액에 L-cysteine을 첨가하여 동결할 때 첨체의 손상과 미토콘드리아 손상을 줄이는데 효과가 있다는 보고되었으며(Singh 등, 1990), 돼지 난자의 체외 성숙 및 체외 수정 비율이 향상되었다고 보고되었다(Jeong 등, 2001).

따라서 이러한 저해 요인들을 항산화제인 L-cysteine을 동결 보존액에 첨가하였을 때 과도한 ROS의 발생을 억제해줌으로써 융해 후 정액의 질(생존율, 운동성, 원형질막의 온전 및 첨체의 온전성) 및 체외 수정 또는 인공 수정 능력을 향상시킬 수 있을 것으로 추측된다. 따라서 본 연구는 한우 정액의 동결 시 항산화제인 L-cysteine 첨가가 정자의 성상과 체외 발달 능력(분할율 및 퇴행율)에 미치는 영향을 검토하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 정액의 준비

한우 정액은 국립축산과학원 대관령 한우 시험장에서 사육되고 있는 중모우의 정액을 이용하였다. 한우 시험장 내에서 직접 채취된 정액은 곧바로 1차 동결 보존액에 1차 희석한 후 2시간 이내에 실험실로 운반하여 본 연구에 이용하였다. 1차 동결 보존액은 20% egg-yolk가 첨가된 Triladyl®(KRUUS, Cat. No. 340244, Denmark)을 원심 분리(4500 rpm, 45 min, 4 °C)하여 상층액을 회수하여 이용하였으며, 80% 이상의 정자 생존율을 나타내는 정액을 연구에 이용하였다.

### 2. 정액 동결 및 융해

1차 동결 보존액으로 처리한 정액은 4 °C에서 보존하였으며, 2차 동결 보존액 또한 20% egg-yolk가 첨가된 Triladyl을 원심 분리하여 상층액을 사용하였으며, 이때 L-cysteine을 각각 0 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM의 농도로 첨가한 뒤 동결에 사용하였다. 1차 동결 보존액으로 처리한 정액은 2차 동결 보존액을 첨가했을 때 정자의 최종 농도가  $2 \times 10^7$  spermatozoa/ml가 되도록 희석하였다. 그 후 0.5 ml straw에 충전하여 액체질소가 담겨있는 용기 표면 위로부터 10 cm 위에서 10분간 예비 동결 후 액체 질소에 침전하여 동결 보존하였다. 한편, 동결 정액은 7일 동안 보존한 후 융해 실험에 공시하였다. 동결 straw는 38.5 °C의 항온 수조에서 45초간 융해 후 38.5 °C로

가온된 Beltsville Thawing Solution(BTS)로 희석한 후 실험에 사용하였다.

### 3. 정자 생존율

생존율 검사는 LIVE/DEAD® sperm viability kit(Invitrogen)을 이용하였으며, 이를 위해 2 μM SYBR14와 2.4 μM Propidium Iodide(PI) stock solution을 준비하였다. 정액 100 μl에 BTS 1 ml와 SYBR14를 1 μl를 넣고 10분간 배양(38.5 °C) 후 1 μl의 PI를 첨가한 후 38.5 °C에서 10분간 재차 배양하였다. 그 후, 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 1 ml PBS를 첨가한 다음 Flow cytometry(BD, FACS Calibur)를 이용하여 분석하였다.

### 4. 첨체막의 온전성 검사

정자 첨체막의 온전성 검사는 Fluorescein isothiocyanate-labeled peanut-agglutinin(FITC-PNA)/PI 형광 염색법을 이용하여 평가하였다. 이를 위해 2 μM FITC-PNA와 2.4 μM PI stock solution을 준비하였다. 정액 100 μl에 BTS 1 ml와 FITC-PNA를 1 μl를 넣고 10분간 배양 후 1 μl PI를 첨가 후 재차 10분간 배양하였다. 그 후 원심 분리(1,500 rpm, 5 min)하여 상층액을 제거한 뒤 1 ml의 PBS를 첨가하여 Flow cytometry(BD, FACS Calibur)를 이용하여 분석하였다.

### 5. 미토콘드리아 검사

미토콘드리아 기능을 검사는 Rhodamine123(SIGMA, cat. no. R8004, USA)/PI 형광 염색법을 이용하여 평가하였다. 이를 위해 1 μM Rhodamine123과 2.4 μM PI stock solution을 준비하였다. 정액 100 μl에 Rhodamine123을 1 μl를 넣고 10분간 배양 후 PI를 1 μl를 넣고 다시 10분간 배양하였다. 그 후 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 1 ml의 PBS 첨가 후 Flow cytometry(BD, FACS Calibur)를 이용하여 분석하였다.

### 6. 정자 세포 내 Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)측정

정자 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 측정은 Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(carboxy-DCFDA)/PI 형광 염색법을 이용하여 평가하였다. 이를 위해 1 μM Carboxy-DCFDA와 2.4 μM PI stock solution을 준비하였다. 정액 100 μl의 정액에 2% BSA가 첨가한 BTS 1 ml와 Carboxy-DCFDA를 1 μl를 넣고 30분간 배양(38.5 °C) 후 1 μl의 PI 첨가 후 38.5 °C에서 10분간 재차 배양하였다. 그 후 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 1 ml의 PBS 첨가 후 Flow cytometry(BD, FACS Calibur)를 이용하여 분석하였다.

### 7. 체외 수정란의 분할율

도축장에서 회수된 난소의 난포로부터 18-gauge의 주사기

를 이용하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취한 미성숙 난자 중 난구 세포가 3겹 이상 조밀하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 TCM-199 배양액에 4회 세척 후 5% CO<sub>2</sub>, 38.5 °C의 조건하에서 20~22 시간 성숙 배양하였다.

성숙 배양 20~22시간에서 난구 세포가 확장된 난자를 회수하여 체외수정 배양액인 0.1% BSA가 첨가된 DM-heparin 배양액으로 3회 세척 후 15개의 난자를 50 µl 소적으로 옮겼다. L-cysteine을 각각 0, 5, 10 및 20 mM으로 처리한 동결 정액을 38.5°C의 항온 수조에서 45초간 용해 후 1 ml의 BTS를 첨가하여 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 정자의 농도가 2×10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 체외 수정 배양액인 DM-caffeine과 혼합하여 체외 배양 소지에 50 µl씩 분주 후 5% CO<sub>2</sub>, 38.5 °C의 조건하에서 15~18시간 배양하면서 수정하였다.

수정된 난자를 회수하여 수정란에 붙어있는 난구 세포와 정자를 제거 후 10% FBS가 첨가된 CR1aa 배양액으로 3회 세척 후 100 µl의 배양액에 옮겨 체외 발육을 위해 5% CO<sub>2</sub>, 38.5 °C의 조건하에서 배양 48시간 후 분할을 및 퇴행율을 조사하였다.

## 8. 통계 처리

본 연구에서 얻어진 결과는 SAS(Statistical Analysis System) 9.2를 이용하여 통계분석을 실시하였고, 처리구간 차이는 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. 동결 보존액에 L-Cysteine 처리 후 생존을 검사

정자의 동결 보존액에 0 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM의 L-cysteine을 첨가하여 동결-용해 후 SYBR14/PI로 형광 염색하여 flow cytometry를 통해 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과, 10 mM과 20 mM의 L-cysteine을 처리한 경우, 정자의 생존율이 각각 64.4%와 64.7%로 0 mM 처리구(54.2%)에 비하여 유의적으로 높은 생존율을 보였다( $P<0.05$ ). 한편, 5 mM의 L-cysteine을 처리한 정자에서의 생존율은 60.5%로 0 mM의 L-cysteine을 처리한 대조군보다는 높았으나, 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

### 2. 동결 보존액에 L-Cysteine 처리 후 첨체 손상

정자의 동결 보존액에 L-Cysteine을 농도별로 첨가하여 동결-용해한 정자의 첨체 손상율을 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, 동결 보존액에 10 mM과 20 mM의 L-cysteine 첨가 시 정자의 첨체 손상율은 각각 16%와 15.9%로서 0 mM (20.4%)에 비하여 유의적으로 낮은 첨체 손상율을 보였다( $P<0.05$ ). 한편 5 mM의 L-cysteine을 처리한 정자에서의 첨체

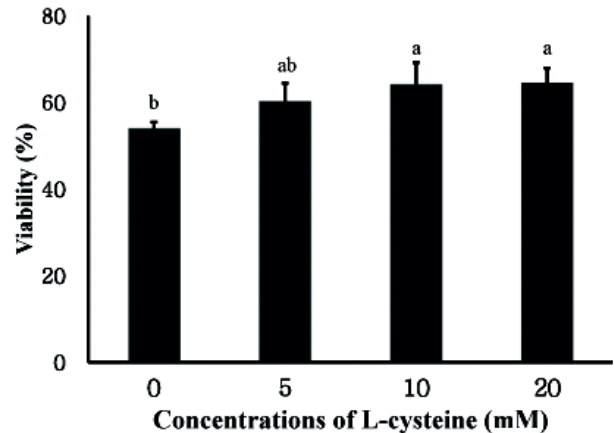


Fig. 1. Viability of sperm frozen-thawed with L-cysteine in Korean native cattle. <sup>a,b</sup> Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment groups( $p<0.05$ ).

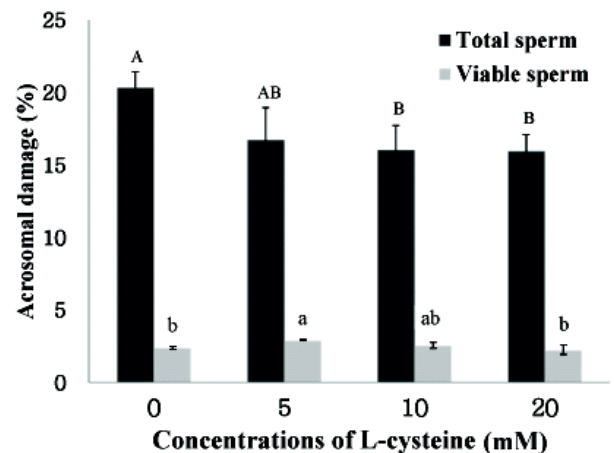


Fig. 2. Effects of L-cysteine on acrosome damage of viable sperm and total sperm frozen-thawed in Korean native cattle. <sup>A,B,ab</sup> Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment groups( $p<0.05$ ).

손상율이 16.7%로서 0 mM의 L-cysteine을 처리한 정자에 비해서는 첨체 손상율이 낮았으나, 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 또한 살아있는 정자에서는 0 mM(2.38%)와 20 mM(2.25%)의 L-cysteine을 첨가한 경우 5 mM(2.91%) 첨가에 비하여 낮은 첨체 손상율을 보였다( $P<0.05$ ).

### 3. 동결 보존액에 L-Cysteine 처리 후 미토콘드리아 보존을 검사

정자의 동결 보존액에 L-cysteine을 농도별 첨가하여 정자의 동결-용해 후 Rhodamin123/PI로 형광 염색하여 flow cytometry를 통해 정자 내 미토콘드리아 보존율을 분석하였다 (Fig. 3). 그 결과, L-cysteine 처리에 따른 미토콘드리아의 보존율은 10 mM과 20 mM에서 각각 57.3%와 58.9%로서 0

mM(49.9%)과 5 mM(51.1%)에 비하여 유의적으로 높게 나타났다( $P<0.05$ ).

4. L-Cysteine 처리 후 동결-융해 정자 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발현 검사

정자의 동결 보존액에 L-cysteine을 농도별로 첨가하여 동결-융해 후 Carboxy-DCFDA/PI로 형광 염색하여 flow cytometry를 통해 정자 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발현을 분석하였다. 그 결과, Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 L-cysteine의 농도별 처리에 따른 정자 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발현은 유의적인 차이는 인정되지 않았으나, 0 mM에 비하여 낮은 경향을 나타냈다.

5. L-Cysteine 처리한 동결 정액을 이용한 체외 수정란의 분할율

L-Cysteine을 농도별 첨가한 동결 정액을 이용한 체외 수정란의 분할율을 Table 1에 나타냈다. 그 결과, 동결 보존액에 L-cysteine을 각각 0, 5, 10 및 20 mM 처리에 따른 동결 정액을 이용하여 수정 후 48시간에서 분할율을 관찰한 결과, 0 mM ( $82.8 \pm 1.7\%$ ), 5 mM( $85.7 \pm 1.3\%$ ) 및 10 mM( $81.8 \pm 2.7\%$ )를 처리한 그룹에서는 유의적 차이가 나타나지 않았으나, 20 mM ( $61.5 \pm 6.8\%$ )를 처리한 그룹에 비하여 유의적으로 높은 분할율을 나타냈다( $P<0.05$ ). 또한 퇴행율을 관찰한 결과, 0 mM ( $17.2 \pm 1.7\%$ ), 5 mM( $14.3 \pm 1.3\%$ ) 및 10 mM( $18.2 \pm 2.7\%$ )을 처리한 그룹에서 유의적 차이가 나타나지 않았으나, 20 mM( $38.5 \pm 6.8\%$ )를 처리한 그룹과 대조하여 유의적으로 낮은 퇴행율을 나타냈다( $P<0.05$ ).

고 찰

본 연구는 소 정액 동결 보존에 있어 L-cysteine을 동결 보존액에 첨가하였을 때 정자의 성장과 체외 발달 능력에 대

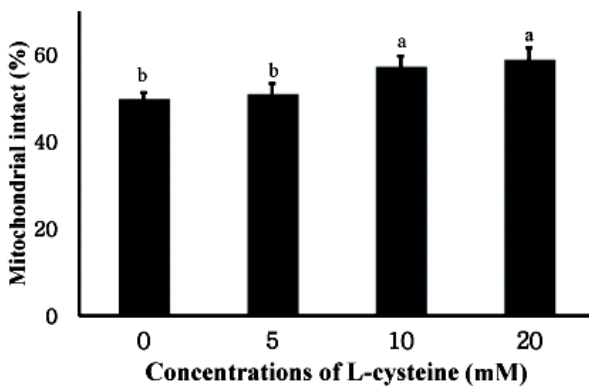


Fig. 3. Effects of L-cysteine on viable sperm with mitochondrial intact in sperm frozen-thawed of Korean native cattle. <sup>a,b</sup> Bar with different superscripts differ significantly of each other treatment groups( $p<0.05$ ).

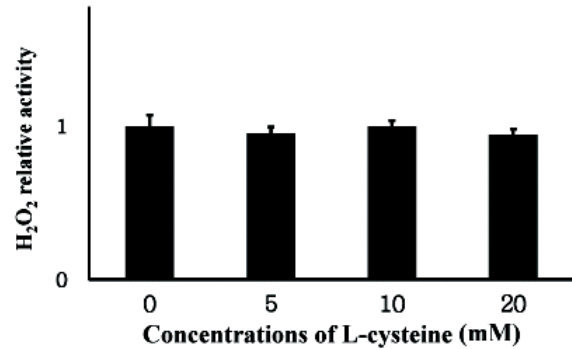


Fig. 4. Effects of L-cysteine on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level of viable sperm frozen-thawed in Korean native cattle.

Table 1. Cleavage of oocytes fertilized *in vitro* by frozen semen with L-cysteine in Korea native cattle

Concentrations of L-cysteine (mM)	No. of embryos examined	No. of embryo developed 2~16 cell(%)	No. of oocytes degenerated (%)
0	156	131( $82.8 \pm 1.7$ ) <sup>a</sup>	25( $17.2 \pm 1.7$ ) <sup>b</sup>
5	160	137( $85.7 \pm 1.3$ ) <sup>a</sup>	23( $14.3 \pm 1.3$ ) <sup>b</sup>
10	150	125( $81.8 \pm 2.7$ ) <sup>a</sup>	25( $18.2 \pm 2.7$ ) <sup>b</sup>
20	135	82( $61.5 \pm 6.8$ ) <sup>b</sup>	53( $38.5 \pm 6.8$ ) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Different superscript letters denote significantly difference in same columns( $P<0.05$ ), n=3.

한 효과를 분석하기 위해 수행되었다. 정자는 ROS를 제거할 수 있는 항산화 효과를 갖고 있는 세포질의 구성 요소가 한정적이다. 따라서 포유류의 정자는 동결 융해 과정 동안에 산화를 억제할 수 있는 충분한 능력이 없다고 보고되었다(Lapointe과 Bilodeau, 2003). 정자의 동결 융해 과정 동안 항산화 방어시스템 및 정자의 막에 손상이 일어나며, 과도한 ROS가 생성되게 된다(Bilodeau 등, 2000). 이러한 정자의 수정 능력을 높이기 위하여 정자 희석액에 항산화제(Tuncer 등, 2011; Towhidi와 Parks, 2012), 광물질(Lee 등, 2010) 그리고 아미노산(Amirat 등, 2009)을 첨가하여 정자의 수정 능력을 향상시키는 연구가 많이 진행되고 있다.

동결 보호제에 항산화제 종류 중 하나인 L-cysteine 첨가는 ROS로 인한 산화 스트레스를 감소시킬 수 있으며, 이를 통해 소 정자가 입는 손상을 줄일 수 있을 것이다(Alvarez와 Storey, 1983). 또한 1990년 Singh 등의 연구에 의하면 항산화제 첨가는 액체 저장 또는 동결 보존 동안의 운동성, 생존 능력 및 손상을 방지한다고 보고되었다.

본 연구에서도 이와 같은 점에 초점을 맞춰 정자의 생존율,

침체의 온전성, 미토콘드리아의 정상성, 정자 내  $H_2O_2$  발현 및 난자의 체외 발달을 검사를 실시하였다. 그 결과, 동결 보존액에 10 mM 및 20 mM L-cysteine의 농도로 처리 후 동결-용해한 정자에서 다른 처리군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타냈다. 한편, 침체 손상율에서 다른 그룹에 비해 10 mM 및 20 mM L-cysteine 첨가 시 유의적으로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 2011년에 Beheshti 등의 연구에 의해 L-cysteine을 1.0 및 2.0 mM을 첨가하였을 때 0 및 0.5 mM 첨가에 비하여 생존율 증가와 침체 손상이 낮아진 결과와 유사하였다. 또한 L-cysteine의 농도가 높을수록 미토콘드리아 정상성 검사에서도 유의적으로 높아지는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과들은 L-cysteine에 의해 동결 보존 시 발생하는 ROS를 감소시켰다는 것을 의미할 수 있다. L-Cysteine을 첨가 후 동결한 정액을 이용하여 수정한 소 배아는 0 mM, 5 mM 및 10 mM의 L-cysteine 첨가의 경우 20 mM 첨가에 비해 유의적으로 높은 분할율과 낮은 퇴행율을 나타냈다. 2003년 Ali 등의 연구에 의하면 고농도의 L-cysteine을 처리한 소 난자의 경우 오히려 배반포율이 감소하는 것으로 보고되었으며, 일정 수준의 ROS는 정자의 수정 능력 획득, 난자와 정자 사이의 융합 및 수정란의 배 발육에도 필요하다고 보고(Blondin 등, 1997)와 유사하지만, 본 연구에서 정액의 동결 보존 시 L-cysteine을 첨가하는 방법과 다르기 때문에 직접적인 비교는 어렵다. 본 연구에서 소 정액의 동결 보존 시 L-cysteine을 10 mM, 20 mM의 농도로 첨가하는 것이 정자의 성장에 긍정적인 효과가 나타났으나, 분할율과 퇴행율의 경우 다른 처리군에 비해 20 mM L-cysteine 첨가한 동결 정액을 수정에 이용하였을 때 부정적인 효과가 나타났다. 이러한 결과는 1999년 Kang 등의 연구에서 생쥐 정액에 Superoxide dismutase (SOD)를 처리하였을 때 처리 농도가 높아짐에 따라 수정율이 저하되는 경향이 유사하였다. 이러한 결과들은 동결 용해 과정 동안 과도한 ROS 생성에 의해 발생하는 문제들을 제거해 줌으로써 정자의 수정 능력을 향상시킬 수 있으며, 적당한 농도로 처리할 경우 배 발달에 긍정적인 효과를 줄 것으로 추측된다.

## 결 론

본 연구는 한우 정액의 동결 보존 시 L-cysteine 첨가가 용해 후 정자의 수정 능력과 체외 수정 후 난자의 발생 능력에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, 정자의 생존율은 10 mM과 20 mM에서 다른 처리군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타냈다( $P<0.05$ ). 또한 정자의 침체 손상율도 10 mM과 20 mM에서 유의적으로 낮게 나타났으며( $P<0.05$ ), 정자의 미토콘드리아 정상성은 10 mM과 20 mM에서 다른 처리군에 비해 유의적으로 높게 나타냈다( $P<0.05$ ). 한편, L-cysteine 첨

가 후 동결-용해한 정액을 이용하여 체외 수정 난자의 분할율 및 퇴행율은 20 mM에 비하여 0 mM, 5 mM, 10 mM에서 유의적으로 높게 나타냈다( $P<0.05$ ). 앞으로 L-cysteine의 처리에 따른 배반포 발육능력에 대한 추가 연구를 통하여, 한우 정액의 동결 보존과 체외에서 난자의 수정 및 분할에 L-cysteine의 첨가에 의한 동결 정액 생산 시스템의 개발로 인공 수정 산업에 활용이 기대된다.

## 참 고 문 헌

- Amirat-Briand L, Bencharif D, Vera-Munoz O, Bel Hadj Ali H, Destrumelle S, Desherces S, Schmidt E, Anton M and Tainturier D. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: preliminary results. *Theriogenology* 71: 1209-14.
- Ali AA, Bilodeau JF and Sirard MA. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59: 939-949.
- Alvarez JG and Storey BT. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29: 548-555.
- Alvarez JG and Storey BT. 2005. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 334-346.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V and Davies-Morel MC. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21: 895-902.
- Beheshti R, Asadi A, Eshratkhan B, Ghalekandi JG and Ghorban A. 2011. The effect of cysteine on post-thawed Buffalo bull (*Bubalu bubalis*) sperm parameters. *Adv. Environ. Biol.* 5: 1260-1263.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA and Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 282-288.
- Blondin P, Coenen K and Sirard MA. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.* 18:454-460.
- Lee SH, Lee JH, Cheong HT, Yang BK, Kim HM, Lee SB, Kwon SS, Choi SK, Sim JM, Kim JD and Park CK. 2010.

- Effects of brine mineral water on sperm preervation in miniature pig. *Annals of Animal Resources Sciences* 21: 19-25.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R and Ruiz S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62: 690-701.
- Jeong BS and Yang X. 2001. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 330-335.
- Kang HG, Kim MK, Kim DH, Han SW, Lee HJ, Kim SR and Kim MK. 1999. Effects of reactive oxygen species on acrosome reaction, lipid peroxidation and fertilization in mouse spermatozoa : (1) Effects of superoxide anion and hydroxideyl radicals. *Dev. Reprod.* 3: 177-184
- Kankofer M, Kolm G, Aurich J and Aurich C. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 63: 1354-1365.
- Kim SH, Yu DH and Kim YJ. 2010. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology* 73: 282-292.
- Lapointe J and JF Bilodeau. 2003. Antioxidants defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 68: 1157-1164.
- Mazor D, Golan E, Philip V, Katz M, Jafe A, Ben-Zvi Z, Meyerstein N. 1996. Red blood cell permeability to thiol compounds following oxidative stress. *Eur. J. Haematol.* 57: 241-246.
- Meister A and Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760.
- Nichi M, Goovaerts IG, Cortada CN, Barnabe VH, De Clercq JB and Bols PE. 2007. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* 67: 334-340.
- Sagara J, Miura K and Bannai S. 1993. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J. Neurochem.* 61: 1667-1671.
- Singh J, Pangawkar GR, Biswas RK, Srivastava AK and Sharma RD. 1990. Studies on lactic dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase release in relation to deep freezing of buffalo semen in certain extenders. *Theriogenology* 34: 371-378
- Towhidi A and Parks JE. 2012. Effect of n-3 fatty acids and  $\alpha$ -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *J. Assit. Reprod. Genet.* 29: 1051-6.
- Tuncer PB, Sarıözkan S, Bucak MN, Ulutaş PA, Akalın PP, Büyükleblebici S and Canturk F. 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* 75: 1459-65.
- Zhao X, Vyas K, Nguyen BD, Rajarathnam K, La Mar GN, Li T, Phillips GN Jr, Eich RF, Olson JS, Ling J and Bocian DF. 1995. A double mutant of sperm whale myoglobin mimics the structure and function of elephant myoglobin. *J. Biol. Chem.* 270: 20763-20774.

---

(접수: 2013. 08. 15/ 심사: 2013. 08. 16/ 채택: 2013. 09. 03)