

Original Article

Mito-TEMPO에 의한 미토콘드리아 유래 초과산화물의 감소가 돼지 난모세포 성숙에 미치는 영향

양슬기, 박효진, 이상민, 김진우, 김민지, 김인수, 제갈호근, 구덕본*

대구대학교 공과대학 생명공학과

Reduction of Mitochondrial Derived Superoxide by Mito-TEMPO Improves Porcine Oocyte Maturation In Vitro

Seul-Gi Yang, Hyo-Jin Park, Sang-Min Lee, Jin-Woo Kim, Min-Ji Kim, In-Su Kim, Ho-Geun Jegal and Deog-Bon Koo*

Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 38453, Korea

Received February 1, 2019

Revised March 4, 2019

Accepted March 19, 2019

*Correspondence

Deog-Bon Koo

Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, 201 Daegu-daero, Jilyang, Gyeongsan, Gyeongbuk 38453, Korea

Tel: +82-53-850-6557

Fax: +82-53-850-6559

E-mail: dbkoo@daegu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-7825-9598>

ABSTRACT Morphology of cumulus-oocyte-complexes (COCs) at germinal vesicle (GV) stage as one of the evaluation criteria for oocyte maturation quality after in vitro maturation (IVM) plays important roles on the meiotic maturation, fertilization and early embryonic development in pigs. When cumulus cells of COCs are insufficient, which is induced the low oocyte maturation rate by the increasing of reactive oxygen species (ROS) in porcine oocyte during IVM. The ROS are known to generate including superoxide and hydrogen peroxide from electron transport system of mitochondria during oocyte maturation in pigs. To regulate the ROS production, the cumulus cells is secreted the various antioxidant enzymes during IVM of porcine oocyte. Our previous study showed that Mito-TEMPO, superoxide specific scavenger, improves the embryonic developmental competence and blastocyst formation rate by regulating of mitochondria functions in pigs. However, the effects of Mito-TEMPO as a superoxide scavenger to help the anti-oxidant functions from cumulus cells of COCs on meiotic maturation during porcine oocyte IVM has not been reported. Here, we categorized experimental groups into two groups (Grade 1: G1; high cumulus cells and Grade 2: G2; low cumulus cells) by using hemocytometer. The meiotic maturation rate from G2 was significantly ($p < 0.05$) decreased (G1: $79.9 \pm 3.8\%$ vs G2: $57.5 \pm 4.6\%$) compared to G1. To investigate the production of mitochondria derived superoxide, we used the mitochondrial superoxide dye, Mito-SOX. Red fluorescence of Mito-SOX detected superoxide was significantly ($p < 0.05$) increased in COCs of G2 compared with G1. And, we examined expression levels of genes associated with mitochondrial antioxidant such as *SOD1*, *SOD2* and *PRDX3* using a RT-PCR in porcine COCs at 44 h of IVM. The mRNA levels of three antioxidant enzymes expression in COCs from G2 were significantly ($p < 0.05$) lower than COCs of G1. In addition, we investigated the anti-oxidative effects of Mito-TEMPO on meiotic maturation of porcine oocyte from G1 and G2. Meiotic maturation and mRNA levels of antioxidant enzymes were significantly ($p < 0.05$) recovered in G2 by Mito-TEMPO ($0.1 \mu\text{M}$, MT) treatment (G2: $68.4 \pm 3.2\%$ vs G2 + MT: $73.9 \pm 1.4\%$). Therefore, our results suggest that reduction of mitochondria derived superoxide by Mito-TEMPO may improves the meiotic maturation in IVM of porcine oocyte.

Keywords: meiotic maturation, Mito-SOX, Mito-TEMPO, porcine oocyte, superoxide

서론

포유동물의 난포란은 난모세포(oocyte)와 그 주변을 둘러싸고 있는 난구세포(cumulus cells)로 함께 구성된 난구-난모세포 복합체(Cumulus oocyte complexes: COCs)를 의미하며 서로의 물질교환을 통해 체외 성숙을 진행한다. 이 때, 난구세포는 과립막 세포로부터 유래되어 난모세포 주위를 둘러싸 난모 세포 성숙에 영향을 미치며, 이 후 초기배 발달에도 관여된다고 알려져 있다(Zhou 등, 2016). 돼지 미성숙 난포란의 체외 성숙에 있어서 난구세포의 형태학적 모습과 수는 체외 성숙 효율을 검증할 수 있는 평가 또는 표지 기준의 하나로써 적용되기 때문에 중요하다(Appeltant 등, 2017). 또한, 난구세포는 돼지 난포란의 성숙 과정 동안 영양분 공급, 성숙 관련 인자, 분자적 신호 그리고 항산화적 물질 분비 등과 같은 역할로써 핵과 세포질 성숙에 관여한다고 알려져 있다(Beyer와 Berthoud 등, 2018). 또한, 난구세포 성숙이 진행됨에 따라 난구세포는 확장을 하게 되는데, 이러한 과정은 수정 시 정자 침입과 관련된 히알루론산 합성 때문이라고 알려져 있다(Mlynarcikova 등, 2009). 난구세포의 역할과 확장 여부는 돼지 난구세포 내 세포질의 성숙에 밀접한 관련성을 가지며 향상시키는 요인 중 하나로 보고되었다(Ikeda와 Yamada, 2014).

돼지 난포란의 성숙 과정에는 미토콘드리아로부터 생성되는 생체 에너지인 adenosine triphosphate (ATP)를 필요로 한다(Sturme와 Leese, 2003). ATP의 생성과정 중에서 미토콘드리아의 전자 전달계로부터 다양한 활성산소(reactive oxygen species: ROS)들이 생성된다(Babayev 등, 2016). 이러한 활성산소종에는 초과산화물, 음이온 라디칼($O_2^{\cdot-}$), 수산기 라디칼($\cdot OH$) 및 과산화 수소(H_2O_2) 등이 포함된다(Zorov 등, 2014). 활성산소종은 산화 환원 신호와 같은 세포내 분자적 메커니즘 조절과 second messenger로써 역할 하는 것으로 알려져 있다(Schieber와 Chandel, 2014; Okon 등, 2015). 하지만 세포 내에서 과도한 활성산소의 생성으로 인해 세포 내 축적되거나 지속적인 반복적인 활성산소가 발생되면 산화적 스트레스를 유발한다. 이러한 산화적 스트레스의 발생은 다낭성 난소 증후군, 자궁내막증, 기형 정자 형성 등과 같은 남성과 여성의 생식기 관련 여러 가지 질병을 유발하는 원인으로 알려져 있다(Agarwal 등, 2012). 뿐만 아니라, 난모세포의 성숙 및 배 발달을 억제하고 DNA에 손상을 주어 세포사멸과 지질의 산화에도 영향을 미친다고 알려져 있다(Wang 등, 2015; Wang 등, 2017).

과도한 활성산소종에 대한 산화적 스트레스를 줄이기 위하여 항산화 물질이 존재하는데 이러한 항산화물질에는 크게 효소 항산화 물질과 비효소 항산화 물질로 구분된다(Agarwal 등, 2012). 효소 항산화 물질에는 초과산화물 불균등화효소(SOD), 글루타티온 과산화효소(GPx), 카탈라아제(CAT)와 퍼옥시리독신(PRDX) 등이 있으며 비효소 항산화 물질에는 비타민 C, 비타민 E, 타우린, 멜라토닌과 같은 물질들이 포함된다. 특히, 효소 항산화물질은 난포란의 난구세포에 많이 분포하는데, 생쥐의 경우 난포란에서 난

구세포는 활성산소종(H_2O_2 , $\cdot OH$, HOCl)으로부터 방어적인 역할을 하는데 도움을 준다고 알려진 바 있다(Shaeib 등, 2016). 비효소 항산화 물질의 경우, 많은 연구에서 돼지 수정란의 체외 발달 과정 동안 멜라토닌 첨가에 의한 항산화적 효과가 수정란의 발달능력을 향상시킨다는 것이 보고되었다(Chen 등, 2017; Wnag 등, 2017).

최근 미토콘드리아 내 특이적 활성산소종 생성 여부는 미토콘드리아의 기능 유지, 미토콘드리아 칼슘 항상성 그리고 세포 사멸을 포함하는 다양한 세포적 메커니즘에 관여된다고 알려졌다(Redza-Dutordoir와 Averill-Bates, 2016). 또한, 항산화 효소들 중 SOD의 한 종류인, 그리고 superoxide dismutase 1 (SOD1)은 주로 세포질에 분포하며 superoxide dismutase 2 (SOD2)의 경우 미토콘드리아에 많이 분포한다고 알려져 있다(Kim 등, 2015). PRDX 또한 여러 가지 종류가 있는데, 특히 peroxiredoxin 3 (PRDX3)의 경우 미토콘드리아에 특이적으로 존재한다(Covarrubias 등, 2008). 이러한 미토콘드리아와 관련된 항산화 효소들의 발현 증가는 산화적 스트레스를 감소시키며, 사람의 인공수정 및 수정란 이식에 긍정적인 영향을 미친다고 알려져 있다(Lu 등, 2018).

최근, 세포 내 ROS 및 초과산화물인 superoxide에 대한 제거 능력이 포함되는 물질로 알려진 Mito-TEMPO를 이용하여 여성 생식 세포 및 기관에 관련된 미토콘드리아의 기능 변화 및 미토콘드리아 매개성 세포 사멸경로에 미치는 영향에 관련된 연구들이 보고되었다(Park 등, 2018; Vaka 등, 2018). 우리의 이전 연구 결과에 따르면, 돼지 초기배 발달과정에서 체외 배양액에 Mito-TEMPO의 첨가는 배반포 단계로의 발달능과 수정란의 난할율을 향상시키는데 도움이 된다는 사실을 입증하였다(Yang 등, 2018). 하지만 돼지의 난포란의 성숙과정 동안 난구세포의 항산화적 효과와 Mito-TEMPO에 의한 미토콘드리아 초과산화물 생성 억제제가 핵 성숙 효율에 미치는 영향에 대한 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 돼지 난포란에서 난구세포의 분포 정도에 따라 차이를 보이는 두 그룹을 이용하여 난포란에서 미토콘드리아 유래 초과산화물 생성 차이 여부를 확인하고, 핵 성숙을 그리고 항산화 관련 인자들의 발현 양상을 조사하고자 한다. 뿐만 아니라, 두 그룹의 난포란에서 미토콘드리아 유래 초과산화물 특이적 제거제인 Mito-TEMPO를 이용하여 난포란의 성숙 능력 향상 여부를 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 연구에서 특별히 명시하지 않은 화학물질들은 Sigma-Aldrich Korea (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

난소 채취 및 난포란 체외성숙

본 연구에서 사용된 돼지 난소는 지역의 도축장(대구축산물도매시장 신흥산업(주))에서 채취하여 30-35°C 온도 조건의 75 µg/mL Penicillin G가 첨가된 0.9% 생리식염수가 담겨진 보온병에 넣어 실험실로 운반하였다. 생리식염수로 2-3회 세척한 난소는 18 게이지 바늘이 장착된 10 mL 주사기를 이용하여 3-6 mm 지름의 난포로부터 난포액을 채취하였다. 채취한 난포액은 15분 가량 침전 후 petridish에 옮긴 뒤 실체현미경 아래에서 마우스 피펫을 이용하여 난포란 선별을 진행하였다. 이러한 과정 중 난포란 주변의 난구세포의 수가 많고 두꺼운 층을 가지는 난포란을 Grade 1 (G1)으로 나누고 상대적으로 난구세포의 수가 적고 얇은 층을 가지는 난포란을 Grade 2 (G2)로 나누어 선별하였다. 선별된 난포란은 tyrode's lactate-4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (TL-HEPES) 용액과 체외성숙 배양액에서 세척한 다음, 1개의 well당 40-50개의 미성숙한 난포란을 배양액 500 µL씩 분주된 4-well multi dish (NUNC, Roskilde, Denmark)에서 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 성숙을 진행하였다. 미성숙한 난포란의 체외성숙에 사용된 배양액은 North Carolina State University-23 (NC SU-23) 배지이며, 여기에 10% porcine follicular fluid, 10 IU/mL pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (hCG), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 25 µM β-mercaptoethanol 및 0.57 mM cysteine을 첨가하여 사용하였다. 총 44시간 체외성숙 중 미성숙 난포란들을

22시간 동안 배양시킨 후, PMSG와 hCG가 첨가되지 않은 배양액에서 22시간 동안 추가 배양하였다. Mito-TEMPO 첨가의 경우 G1, G2와 동일한 배양 과정에서 이전 연구인 Park 등, 2018에서 사용한 Mito-TEMPO의 농도와 같이 최종 농도가 0.1 µM이 되도록 첨가하여 배양하였다.

난구세포 정량

44시간 동안 성숙된 난포란을 0.1% hyaluronidase를 이용하여 조심스럽게 난구세포를 벗겨준 뒤 0.1% polyvinyl alcohol (PVA)가 포함된 phosphate buffer saline (PBS)에서 3회 세척하였다. 벗겨진 난구세포들은 microcentrifuge tube에 넣은 후 13,500 rpm에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상층액을 조심스럽게 제거한 뒤 침전된 난구세포를 0.1% PVA가 포함된 PBS에서 재현탁하였다. 이후, 난구세포의 수를 측정하기 위하여 hemocytometer를 이용하였다. 난구세포의 수는 hemocytometer의 제조 회사의 지침에 따라 (전체 세포 수 × 희석 계수)/(큰 사각형의 개수) × 10⁴으로 계산하였다.

난포란의 핵 성숙 확인

44시간 동안 성숙된 난포란을 0.1% hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 조심스럽게 벗겨준 뒤 0.1% PVA가 포함된 PBS에서 3회 세척하였다. 난구세포가 벗겨진 난포세포는 슬라이드 글라스에 올려 둔 뒤 커버 글라스를 덮어 압착한 뒤 아세트산:에탄올 (1:3) 용액에 하루 동안 고정시켰다. 하루 동안 고정된 난포세포는

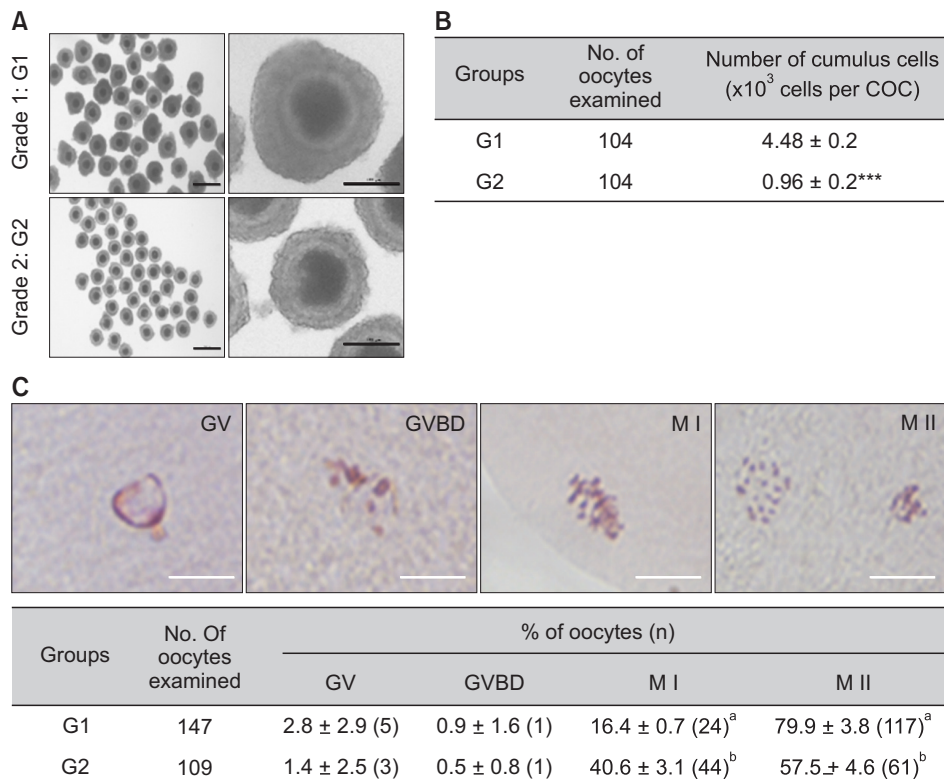


Fig. 1. Isolation of COCs according to the number of cumulus cells at GV stage. (A) G1 and G2 COCs were visualized through an optical microscopy. Top panel scale bar is 500 µm and bottom panel scale bar is 100 µm. (B) The number of cumulus cells were counted by a hemocytometer. (C) Representative photographs indicate different stages of nuclear maturation in COCs. Meiotic maturation rates were examined by using orcein staining. Scale bar is 200 µm. Different superscript letters a and b denote significant differences (*p* < 0.05). The data are representative of at least three independent experiments and shown as means ± SD. ****p* < 0.001. T-test was used.

1% 오르세인 용액에서 10분 동안 염색하였다. 이후 글리세롤:아세트산:물(1:1:3) 용액으로 탈 염색 반응을 실시하고 광학 현미경 (Leica, Solms, Germany) 아래에서 핵상을 확인하여 성숙 정도를 판별하였다. 핵상 판별 기준은 Fig. 1C의 대표사진에 따라 구분하였다.

Mito-SOX 염색

44시간 동안 성숙된 난포란을 0.1% PVA가 포함된 PBS에서 3회 세척하였다. 이후 최종 농도가 4 µg/mL이 되도록 Mito-SOX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 시약을 제외성숙에 사용된 배양액에 희석 후 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 염색을 진행하였다. 염색이 끝난 난포란은 2.5% glutaraldehyde 고정액에 4°C에서 하루 동안 고정을 진행하였다. 고정된 난포란은 슬라이드 글라스에 올려준 뒤 커버 글라스로 덮어서 형광현미경(iRIS Digital Cell Imaging System, Logos Biosystems, Gyeonggi-do, South Korea)을 통하여 초과산화물 발현 양상을 관찰하였다.

RNA 추출 및 역전사 PCR (RT-PCR)

RNA는 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 시약을 이용하여 제조 회사의 지침에 따라 추출을 진행하였다. 44시간 동안 배양된 난포란 50개를 0.1% PVA가 포함된 PBS에서 3회 세척한 후 난포란은 microcentrifuge tube에 담아 Trizol 용액 500 µL를 처리하였다. 용액 처리 후, vortex하여 5분간 반응 후 chloroform을 100 µL 첨가하여 15초간 vortex한 뒤 13,500 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 그 후, 상층액 200 µL를 새로운 microcentrifuge tube로 옮겨 담고 isopropanol을 같은 부피만큼 넣은 후 inverting하여 상온에서 2시간 동안 반응시켜 RNA를 침전시켰다. 13,500 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하고 침전물을 70% 에탄올로 세척 후 다시 같은 조건으로 10분 동안 원심분리하여 에탄올을 제거하였다. 그 후, 30분 동안 건조하여 에탄올을 완전히 제거한 뒤 RNase free-water에 녹여주었다. RNA의 농도와 순도는 OPTIZEN NanoQ (Mecasys, Daejeon, South Korea)를 이용하여 측정하였다. 이후, 1 µg/µL의 RNA와 AccuPower® RT-PCR Premix (Bioneer

Inc., Daejeon, South Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 프라이머 시퀀스(Table 1)는 NCBI 데이터베이스를 이용하여 디자인하였다. PCR은 95°C에서 5분동안 반응 후 95°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초를 30-35회 반복 후 마지막으로 72°C에서 5분 동안 진행하였다. 전기 영동은 2% 아가로스 겔을 이용하여 진행하고 ethidium bromide 염색 후 UV 아래에서 DNA 밴드를 확인하였다. DNA 밴드는 ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij>, version 1.46, National Institutes of Health, MD, USA)를 이용하여 정량화하였다.

통계 분석

본 연구에서 얻은 모든 백분율 데이터는 평균 ± 표준 편차(S.D)로 나타내었다. 모든 실험의 결과 값은 Bonferroni's Multiple Comparison Test를 따르는 one-way ANOVA 또는 t-test를 수행하여 분석하였다. 이미지 분석은 Image J (<http://imagej.nih.gov/ij>, version 1.46, National Institutes of Health, MD, USA) software를 사용하였다. 모든 데이터는 GraphPad Prism 5.0 소프트웨어 패키지(GraphPad software, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 본 연구에서 나타난 결과들에 대한 통계적 유의차는 $p < 0.05$ 이하인 것만 표기하였다.

결 과

난구세포의 수에 따른 돼지 난포란의 핵 성숙을 확인

돼지 미성숙 난구세포 난자 복합체(COCs)를 육안으로 관찰하여 난포세포 주변의 난구세포가 많고 두꺼운 층이 관찰되는 그룹을 G1으로 상대적으로 G1과 비교하여 난구세포 수가 적은 그룹을 G2으로 나누었다(Fig. 1A). 44시간동안 체외 성숙시킨 두 그룹의 COCs에서 난구세포 수를 정확하게 측정하기 위해서 hemocytometer 를 이용하여 분석한 결과, 난구세포의 수는 G2가 G1 보다 유의적으로 적은 것을 확인하였다(Fig. 1B; $p < 0.001$, G1: $4.48 \pm 0.2 \times 10^3$ cells/mL vs G2: $0.96 \pm 0.2 \times 10^3$ cells/mL). 예상대로, 44시간 동안 체외 성숙 후 G1과 G2의 핵 성숙율을 Orcein 염색을 이용하여 측정한 결과(Fig. 1C), metaphase II(M II) 단계로 성숙된 난자들의 핵 성숙율은 G2가 G1에

Table 1. Primer sequences of anti-oxidant genes for RT-PCR in matured COCs

Genes	Primer sequences	Tm °C	Gene bank Accession no.	Base Pairs
SOD1	F (5'- 3'): GCCAAAGGATCAAGAGAGGC	55	(NM_001190422.1)	226
	R (5'- 3'): GTCGTTTGGCCTGTGGTGTA			
SOD2	F (5'- 3'): GCAGCTCGAGCAGGAATCTGG	55	(NM_214127.2)	162
	R (5'- 3'): ACGCGGCCTACGTGAACAA			
PRDX3	F (5'- 3'): AGTGGATTCCCCTCAGCC	55	(NM_001244531.1)	290
	R (5'- 3'): AACCCATGGAGAAGTCTGCC			
GAPDH	F (5'- 3'): GAAGGTCGGAGTGAACGGAT	55	(NM_001206359.1)	527
	R (5'- 3'): ACTCATGACCACGGTCCATG			

SOD1: Superoxide dismutase 1, SOD2: Superoxide dismutase 2, PRDX3: Peroxiredoxin 3, GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase.

비하여 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$, G1: $79.9 \pm 3.8\%$ vs G2: $57.5 \pm 4.6\%$). 위 결과를 통해서 난구세포의 수가 상대적으로 적은 G2가 G1에 비하여 핵 성숙 효율이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과를 기반으로 난구세포의 수 차이에 따라 핵 성숙율에 차이를 보이는 두 그룹 G1과 G2를 이용하여 후속 실험을 진행하였다.

성숙된 난포란에서 초과산화물 생성과 항산화 효소의 발현 조사

두 그룹의 성숙된 난포란에서 초과산화물 생성 여부를 확인하기 위해서 미토콘드리아 유래 초과산화물을 직접 염색하는 시약인 Mito-SOX 염색을 사용하였다(Fig. 2A). Mito-SOX 염색에 의한 붉은 형광 발현은 G2가 G1에 비하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 이 후, 항산화효소의 발현을 통한 초과산화물 생성 여부를 확인하기 위해서 미토콘드리아 관련 항산화 효소인 *SOD1*, *SOD2* 그리고 *PRDX3*의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통하여 조사하였다(Fig. 2B). 3가지 항산화 효소들의 mRNA 수준에서의 발현은 G2가 G1보다 유의적으로 낮았다($p < 0.05$).

Mito-TEMPO 첨가에 따른 돼지 난포란의 핵 성숙율 변화 확인

미토콘드리아 초과산화물 및 활성산소 제거제로 알려진 Mito-TEMPO MT, 0.1 μM 를 체외성숙 배양액에 첨가하여 G1과 G2의 핵 성숙율의 변화를 확인하였다(Fig. 3A). 그 결과 G1에 MT를 첨가하였을 때 핵 성숙의 변화는 다소 증가하였지만 유의적인 차이는 없었다(G1: $80.5 \pm 9.8\%$ vs G1 + MT: $86.1 \pm 10.0\%$). 그러나 G2군과 G2에 MT를 첨가한 돼지 난포란의 핵 성숙율은 MT가 첨가되었을 때 G1만큼 회복되는 것을 확인하였다(G2: $75.9 \pm 12.6\%$ vs G2 + MT: $80.0 \pm 12.6\%$). Mito-SOX 염색을 통하여 초과산화물 생성 여부를 성숙된 돼지 난포란에서 확인한 결과(Fig. 3B), G1과 G2 모두 Mito-TEMPO를 첨가하지 않은 그룹에 비하여 첨가한 그룹에서 초과산화물의 생성이 감소하였다. 또한, 미토콘드리아 유래 항산화 효소들(*SOD1*, *SOD2* 그리고 *PRDX3*)의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR 분석으로 확인해 본 결과(Fig. 3C), Mito-TEMPO를 첨가하지 않은 G1과 G2 보다 Mito-TEMPO를 첨가한 G1과 G2에서 세 유전자 모두 증가하는 패턴으로 나타났다. 이러한 결과는 Mito-TEMPO를 이용한 미토

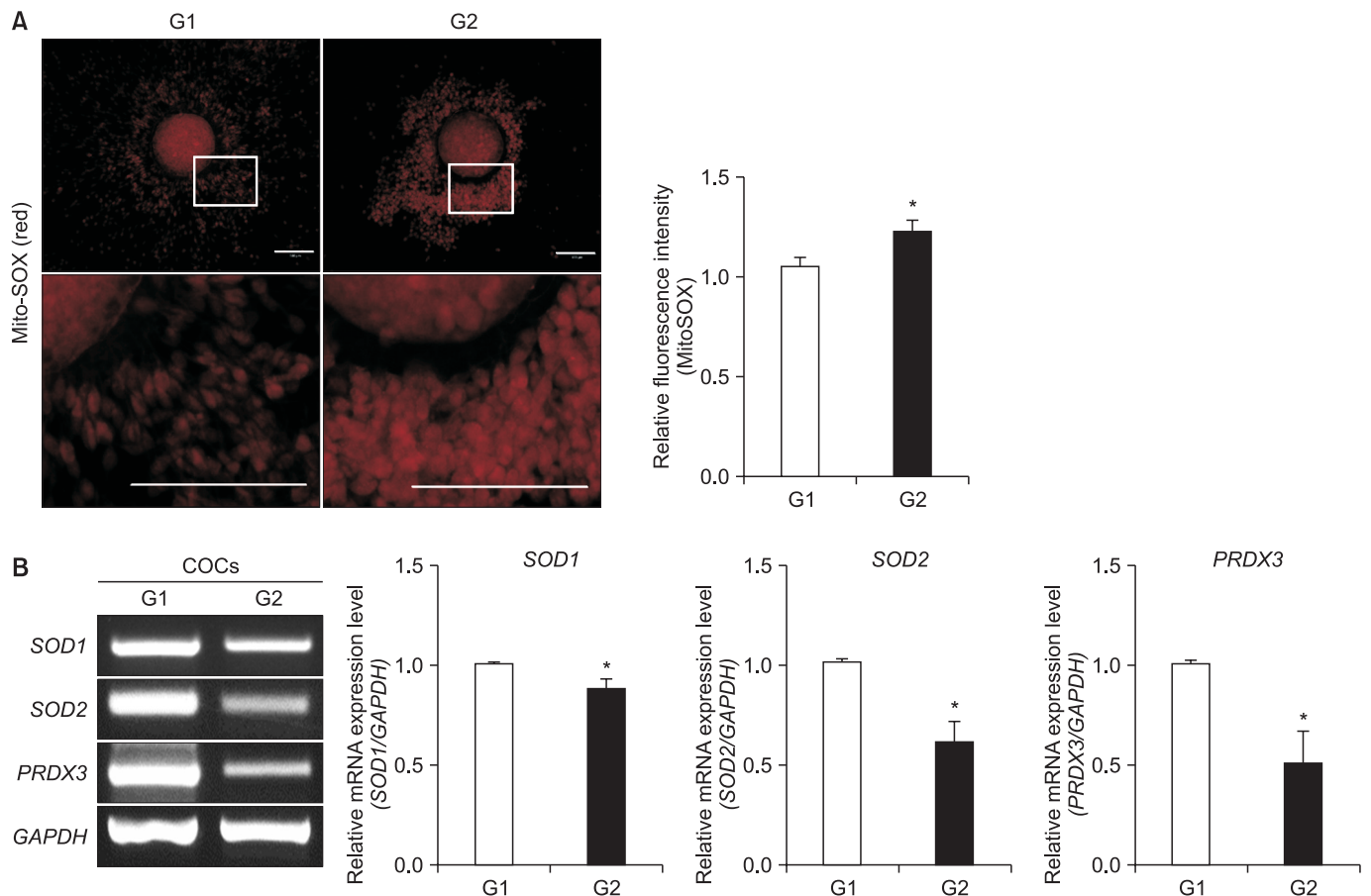


Fig. 2. Measurement of Mito-SOX staining and antioxidant enzymes on COCs after 44 h maturation. (A) Red fluorescence indicated mitochondria derived superoxide on 44 h matured COCs. Scale bar is 100 μm . (B) Antioxidant enzyme genes (*SOD1*, *SOD2*, *PRDX3*) expressions were measured by RT-PCR analysis. Histogram values of densitometry analysis were obtained using Image J software. The data are representative of at least three independent experiments and shown as means \pm SEM. * $p < 0.05$. T-test was used.

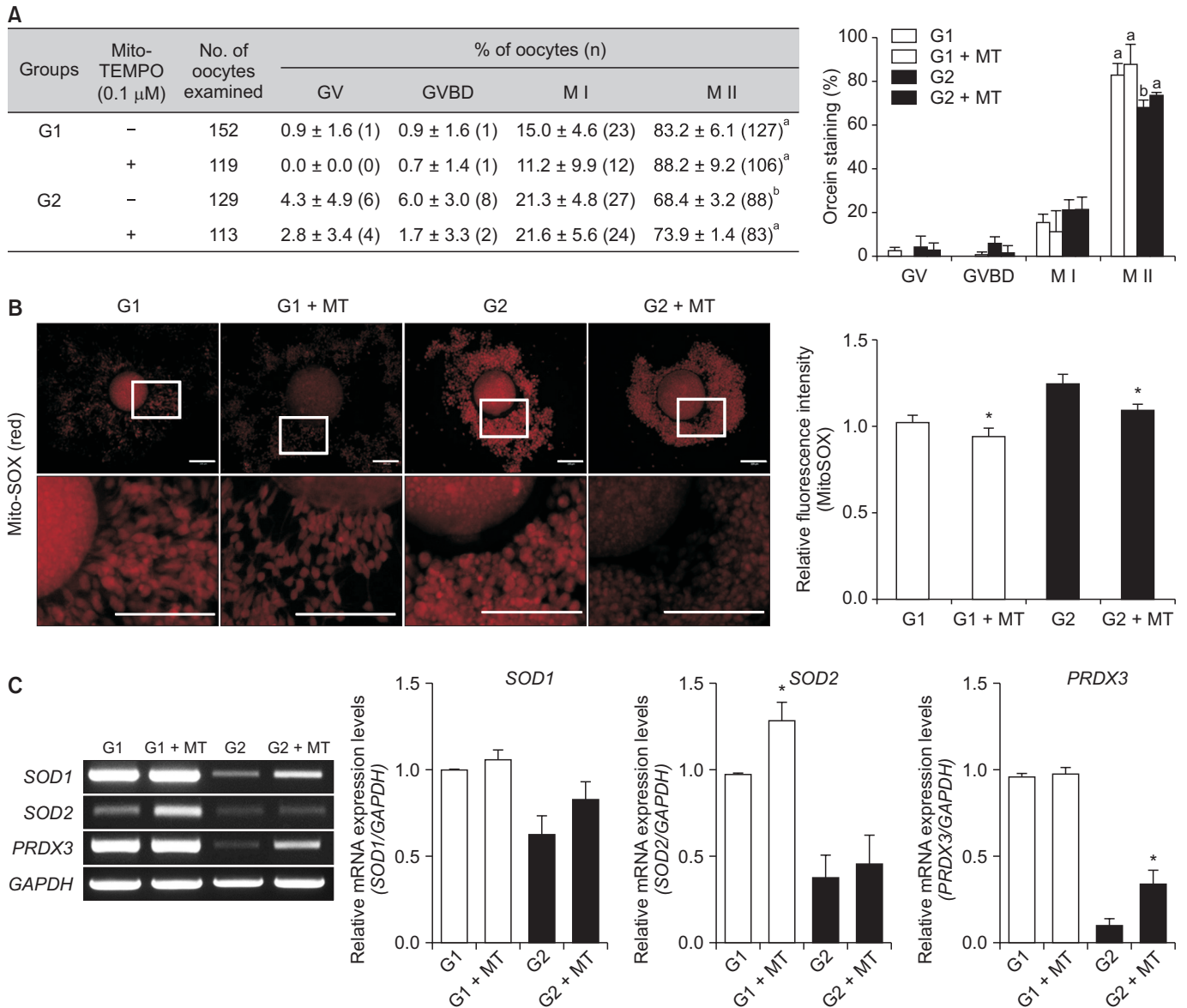


Fig. 3. Investigation of meiotic maturation rate, superoxide production and expression of antioxidant enzymes on COCs after 44 h maturation treated with Mito-TEMPO. (A) Meiotic maturation rates were examined on 44 h matured COCs treated with Mito-TEMPO using orcein staining. Different superscript letters a and b denote significant differences ($p < 0.05$) and t-test was applied with compared to G1 (as a control). (B) Red fluorescence showed mitochondria derived superoxide on 44 h matured COCs treated with Mito-TEMPO. Scale bar is 100 μm. (C) Antioxidant enzyme genes (*SOD1*, *SOD2*, *PRDX3*) expressions were measured in 44 h matured COCs treated with Mito-TEMPO by RT-PCR analysis. Data in the bar graph represents the means ± SD and SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$. T-test was used.

콘드리아 유래 초과산화물의 제거는 체외성숙 능력을 향상시키고 항산화 효소의 발현을 증가시켰다.

고찰

본 연구에서는 germinal vesicle (GV)에서 돼지 난모세포 및 난구세포 난자 복합체(COCs)의 품질을 평가하는 하나의 기준인

형태학적 모습과 난구세포의 수를 기준으로 나눈 두 그룹 G1과 G2로부터 44시간 동안 체외 성숙한 다음 핵 성숙 비율을 조사하였다. 알려진 바와 같이, 난구세포의 수가 많고 형태학적으로 좋은 G1에서 G2보다 M II 단계까지의 핵 성숙율이 높았으며, 동시에 미토콘드리아 유래 초과산화물 생성은 난구세포의 수가 적은 G2에서 높게 나타났다. 이러한 결과는 GV시기의 난구세포의 수의 여부에 따른 차이가 난포란의 핵 성숙에 영향을 미치며, 체외

성숙 능력이 낮은 G2의 난포란은 상대적으로 G1에 비해 높은 수준의 초과산화물이 생성된다는 것 확인하였다. 또한, 44시간 동안 체외성숙된 돼지 G2 난포란에서 미토콘드리아와 관련되는 항산화 효소로 알려진 *SOD1*, *SOD2* 그리고 *PRDX3*의 mRNA 발현 수준이 G1보다 낮았다. 결과적으로 돼지 난포란의 체외 성숙과정 동안 핵 성숙 효율에 있어서 초과산화물의 생성 여부가 밀접한 관련이 있음을 본 연구의 G1과 G2를 이용한 비교 분석을 통해서 입증하였다.

본 연구에서는 Mito-TEMPO가 미토콘드리아 유래 초과산화물 제거제로써 돼지 체외 성숙에 미치는 영향을 확인하였다. Mito-TEMPO (0.1 μ M)을 체외 성숙 배양액에 첨가하였을 때 G2의 낮은 핵 성숙 효율이 회복되고 초과산화물의 생성이 감소될 뿐만 아니라 항산화 효소들의 mRNA 발현 수준도 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 연구 결과를 기반으로 G2의 난구세포의 역할이 부족함에도 불구하고 Mito-TEMPO는 돼지 체외성숙 과정 동안 미토콘드리아 유래 초과산화물의 생성을 억제하여 난포란의 핵 성숙에 관련됨을 처음으로 확인하였다.

난구세포는 난모세포를 둘러싸고 있는 세포이며, 체내·외 성숙 과정에 있어서 확장 여부와 관련 인자들을 분비하는 역할로써 성숙 능력에 중요한 요인 중 하나이다. 이전 연구결과에 따르면, 난구세포의 수와 확장 여부는 난포란 성숙에 대한 지표로 사용이 가능하며(Prochazka 등, 2011), 세포질의 성숙과 관련된 난모세포의 지름과 핵 성숙 효율 향상에 기여하는 것으로 보고된 바 있다(Matsunaga와 Funahashi, 2017). 돼지 미성숙 난포란의 체외 성숙과정에서도 품질을 평가하는 기준으로 난구세포의 형태학적 모습, 수 그리고 확장여부가 적용된다고 보고되었다(Ozawa 등, 2008). 따라서 본 연구에서는 이러한 이전 연구를 바탕으로 난구세포 난자 복합체(Cumulus oocyte complexes; COCs)의 형태학적 모습을 현미경을 이용하여 육안으로 분리하였다. 뿐만 아니라 hemocytometer를 이용하여 난구세포의 수를 측정하여 유의적인 차이를 제시함으로써 분리한 두 그룹에 대한 기준을 뒷받침하였다. 예상한 바와 같이 난구세포의 수의 차이를 보이는 G1과 G2의 난포란은 44 시간 체외 성숙 이후, 확연한 핵 성숙율의 차이를 보였다(Fig. 1). 난구세포의 수와 형태학적 모습을 기준으로 나눈 G1과 G2는 핵 성숙에서 차이를 가지며, 이를 이용하여 본 연구의 목적인 초과산화물 제거능이 포함하는 Mito-TEMPO처리가 돼지 체외 성숙에 미치는 영향에 대해서 구체적으로 조사하였다.

이전 연구 결과에서 미토콘드리아 초과산화물을 붉은 형광으로 염색시키는 시약인 Mito-SOX를 이용하여 미토콘드리아 유래 초과산화물의 검출이 가능하다고 알려져 있다. 특히, 우리의 이전 연구 결과에서 Mito-SOX를 이용하여 돼지 초기배의 발달동안 미토콘드리아 유래 초과산화물의 생성 여부를 조사하였다(Yang 등, 2018). 또한, 초과산화물은 미토콘드리아가 ATP를 생성하는 과정에서 전자전달체로부터 발생된다고 알려져 있다(Fogg 등, 2011). 성숙된 난포란에서는 수정을 위해 다량의 ATP생성이 요구된다고 알려져 있다(Dalton 등, 2014). Fig. 2의 결과를 보면,

상대적으로 난구세포 수가 많아 높은 핵 성숙율을 보이는 G1의 성숙된 COCs에서도 Mito-SOX 염색에 의한 붉은색 형광 발현을 확인하였다. 이러한 결과는 초과산화물의 생성이 일반적인 체외 성숙과정 동안에서 성숙되는 난포란에서 생성된다는 것을 본 연구의 결과로 확인하였다. 또한, 상대적으로 난구세포 수가 적은 G2의 성숙된 COCs에서는 G1 보다 더 높은 수준의 미토콘드리아 초과산화물이 생성되는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 흥미롭게도 G1은 상대적으로 높은 핵 성숙율을 보이는 좋은 품질의 체외 성숙 난포란 임에도 불구하고, 초과산화물 생성이 확인되었다. 이러한 결과는 높은 수준의 ATP 생산이 핵 성숙과정에 필요하기 때문에 초과산화물의 생성이 일어나는 것으로 판단된다.

또한, 난포란의 난구세포는 성숙 과정 동안 활성산소(reactive oxygen species: ROS)의 생성에 따른 산화 스트레스로부터 보호하기 위해서 난구세포 내에는 여러 종류의 효소 및 비효소 항산화물질을 가지며 이를 통해 ROS의 독성으로부터 난모세포를 보호한다고 알려져 있다(Shaeib 등, 2016). 이러한 항산화 효소들 중에서 미토콘드리아와 관련된다고 알려진 효소들은 *SOD1*, *SOD2* 그리고 *PRDX3*을 포함하는 것으로 보고되었다(Covarrubias 등, 2008; Kim 등, 2015). 특히, *PRDX3*는 peroxiredoxin 1-6 중에 미토콘드리아에 특이적으로 존재하며(Slominski 등, 2017), 세포의 증식이나 포유동물 초기배 발달과정 동안 세포와 난자 내의 산화적 스트레스를 감소 및 ROS생성 조절에 관여되는 것으로 알려져 있다(Covarrubias 등, 2008). 또한, 본 연구진의 이전 연구 결과에서 돼지 체외 성숙란에서 미토콘드리아 관련 항산화 효소들로 *SOD1*, *SOD2* 그리고 *PRDX3*의 mRNA 수준에서의 발현 양상을 확인하였다(Park 등, 2018). Fig. 2의 결과에 따르면, 3가지 미토콘드리아 관련 항산화효소들의 mRNA수준에서의 발현이 G2에서 G1 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 난구세포가 상대적으로 적은 G2에서 ROS 생성으로 유도되는 산화적 스트레스가 발생하는 것을 보호해 줄 항산화 효소의 발현이 감소하였기 때문에 G1 보다 더 많은 초과산화물이 생성된 것으로 생각된다.

2010년 이후의 연구에 따르면 Mito-TEMPO는 쥐의 상피세포(Ni 등, 2016) 및 심근세포(Zhang 등, 2017)를 포함하는 다양한 포유동물 세포에서 세포내 활성산소 및 미토콘드리아 유래 초과산화물에 대한 특이적 제거제로써 보고되었다. 이전 연구결과들에 따르면 소의 난포란에서 멜라토닌과 EGCG (Epigallocatechin Gallate)와 같은 항산화물질들을 첨가하였을 때, 난포란의 성숙이나 배발달 능력이 증가하였다(Yang 등, 2017; Huang 등, 2018). 뿐만 아니라, 우리의 최근 연구에 따르면, 돼지 초기배의 체외 생산과정에서 미토콘드리아 유래 초과산화물의 특이적 제거능으로 배반포 발발 효율 및 생산에 긍정적인 효과를 보이는 것으로 보고되었다(Yang 등, 2018), 또한, 돼지 난포란이 체외 성숙 동안 환경호르몬으로 알려진bisphenol A (BPA) 노출에 의해 유도되는 활성산소 및 초과산화물 생성에 따른 손상을 극복하고 보호하는 기작으로 Mito-TEMPO의 역할을 규명하였다(Park 등,

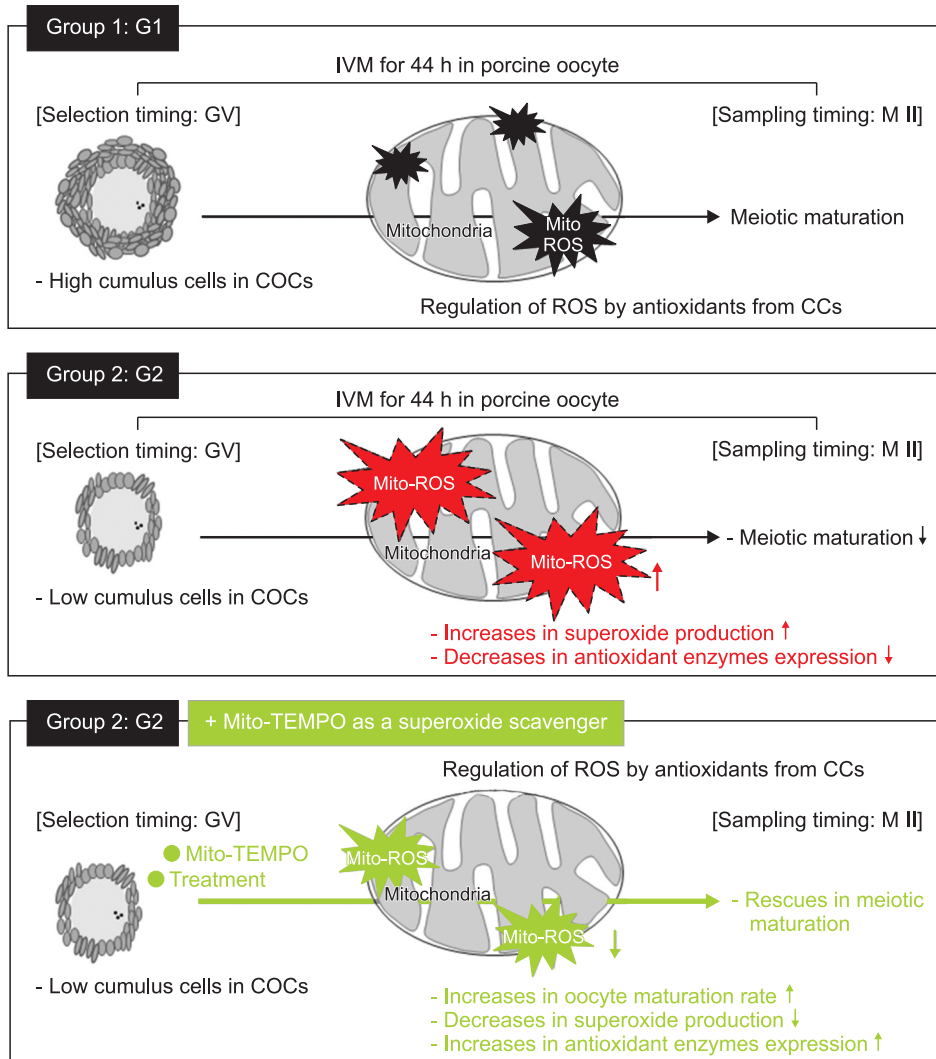


Fig. 4. Recovery of meiotic maturation by Mito-TEMPO as a superoxide scavenger during porcine COCs maturation. Top panel; COCs with high cumulus cells had increasing meiotic maturation. Middle panel; COCs with low cumulus cells had increasing mitochondrial superoxide. In addition, high superoxide production in G2 COCs induced decreasing antioxidant enzymes expressions. Bottom panel; COCs of low cumulus cells cultured with Mito-TEMPO for meiotic maturation. Reduction of mitochondrial superoxide induced increasing meiotic maturation rate and antioxidant enzymes expressions in porcine oocyte.

2018). 그러나 구체적으로 돼지 난포란의 체외 성숙과정에서 핵 성숙율에 미치는 영향 및 항산화적 효과에 대한 보고된 바는 없다. 본 연구에서 Mito-TEMPO (0.1 μ M)를 체외 배양액에 첨가하여 비록 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 G1과 G2의 핵 성숙율이 증가하였다. 본 연구에서 사용한 Mito-TEMPO의 농도는 우리의 이전 연구를 참고하여 적용하였다(Park 등, 2018). 또한, Mito-TEMPO가 첨가된 배양액에서 체외 성숙된 돼지 난포란에서 유의적으로 초과산화물의 생성 여부가 G1과 G2 모두 감소하였으며, 난구세포로부터 발현되는 것으로 추정되는 미토콘드리아 관련 3가지 항산화 효소들의 감소된 mRNA 수준에서의 발현 역시 회복되었다(Fig. 3). G2에서 증가된 초과산화물을 생성이 Mito-TEMPO 처리에 의해 감소되고, 이를 돕기 위해 난구세포로부터 항산화 효소들의 발현 증가가 유도된 것으로 판단된다. 따라서, 미토콘드리아 유래의 초과산화물 특이적 제거제인 Mito-TEMPO는 난모세포와 난구세포 내에 발생한 초과산화물 생성에 대한 제거능을 포함하고 미토콘드리아 관련 항산화 효소들의 발

현을 증가시킴으로써 체외성숙 과정 동안 난포란의 핵 성숙 효율을 향상시킨다는 사실을 본 연구를 통해서 입증하였다.

결론적으로, 본 연구결과는 난구세포의 수를 기준으로 분리한 두 그룹의 난포란으로부터 핵 성숙을 변화, 초과산화물 생성 여부 및 미토콘드리아 관련 항산화 효소의 mRNA 발현 수준 여부를 조사하였다. 이를 통해 난구세포 수에 따라 돼지 난포란의 핵 성숙과 미토콘드리아 초과산화물의 생성이 밀접한 관련성을 가지는 사실을 확인하였다. 이후, 미토콘드리아 유래 초과산화물 특이적 제거제인 Mito-TEMPO를 돼지 난포란의 체외성숙 동안 배양액에 첨가하였을 때, 난포란으로부터 생성되는 초과산화물은 감소하였으며, 미토콘드리아 관련 항산화효소들의 mRNA 발현 수준이 증가함에 따라 핵 성숙 효율이 향상되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 본 연구는 미토콘드리아 유래 초과산화물 생성과 돼지 난포란의 체외성숙과의 관련성을 확인함으로써 궁극적으로 체외성숙란의 품질 향상에 도움이 되는 기초 연구로서 의미가 있다고 판단된다.

결론

돼지 난포란의 체외성숙 동안 난구세포의 수, 확장 여부 및 형태학적 모습은 성숙된 난포란의 품질을 평가할 수 있는 중요한 기준으로 적용된다고 알려져 있다. 또한, 난포란의 체외성숙 동안 미토콘드리아내 ATP 생산에 따라 산화적 인산화로부터 초과산화물과 같은 활성산소종 (ROS)이 발생된다. 이러한 ROS의 과도한 생성 및 축적은 산화적 스트레스를 유도하여 세포 내 손상을 일으키는 것으로 보고되었다. 특히, 돼지 난포란의 체외 성숙과정에서 산화적 스트레스의 조절은 핵 성숙에 있어서 중요한 요인으로 적용되며, 난모세포를 둘러싼 난구세포로부터 항산화 효소들을 합성하여 보호하는 것으로 알려져 있다. 그러나 돼지 난포란의 체외성숙에서 미토콘드리아 유래 초과산화물 생성 여부 및 미토콘드리아 특이적 초과산화물 제거제로 알려진 Mito-TEMPO에 의한 항산화 효과가 난포란의 핵 성숙에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다. 우선, GV단계에서 난구세포 수가 많은 난포란을 G1 군과 난구세포의 수가 상대적으로 적은 난포란을 G2로 분리하였다. 체외성숙 44시간 후 orcein 염색을 통한 핵형 분석을 통해서 핵 성숙율을 조사한 결과, 난구세포의 수가 많은 G1이 상대적으로 G2보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$, G1: $79.9 \pm 3.8\%$ vs G2: $57.5 \pm 4.6\%$). 이를 기반으로 난구세포 수를 평가 기준으로 분리한 G1과 G2 돼지 난포란을 이용하여 초과산화물 제거능을 포함하는 Mito-TEMPO가 핵 성숙효율에 미치는 영향을 조사하였다. 두 그룹의 난포란으로부터 초과산화물생성 여부를 조사하기 위해서 미토콘드리아 특이적 초과산화물 염색 시약으로 Mito-SOX를 사용하였다. 그 결과 G2가 G1보다 초과산화물을 검출한 Mito-SOX의 붉은색 형광발현이 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 또한, 난포란 내의 미토콘드리아와 관련되는 항산화 효소들 (*SOD1*, *SOD2* 그리고 *PRDX3*)의 mRNA 수준에서의 발현 변화를 reverse transcription (RT)-PCR 방법으로 분석하였다. 체외 성숙 44시간 후 G2의 난구세포 난모세포 복합체 (cumulus oocyte complexes: COCs)에서 세 가지 미토콘드리아 관련 항산화 효소들의 발현이 G1보다 상대적으로 낮았다. 미토콘드리아 유래의 초과산화물 특이적 제거제인 Mito-TEMPO를 체외성숙 배양액인 NCSU23에 44시간 동안 첨가한 후 핵 성숙율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, Mito-TEMPO를 첨가해 준 G1과 G2 난포란에서 모두 핵 성숙율이 증가하는 경향을 보여주었다. 또한, 체외성숙된 난포란 내의 초과산화물의 생성이 G1과 G2 난포란 모두 감소하는 것을 확인하였으며, 항산화 효소들(*SOD1*, *SOD2* 그리고 *PRDX3*)의 mRNA 발현 수준이 증가하였다. 결과적으로 난구세포의 수에 따른 돼지 난포란의 체외 성숙과정에서 Mito-TEMPO의 첨가는 초과산화물 제거능을 포함하는 항산화적 효과로 적용되어 체외 성숙 능력 향상에 긍정적인 효과를 보였다. 따라서 이러한 결과들을 기반으로 Mito-TEMPO에 의한 미토콘드리아 유래 초과산화물의 생성 조절은 돼지 난포란의 체외성숙과 밀접한 관련성이 있다는 것을 확인하였다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

본 연구는 2015년도 대구대학교 교내연구비 과제에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar B J, Shaman A and Gupta S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review, *Reprod Biol Endocrinol*, 10:49.
- Appeltant R, Somfai T, Santos E C S, Dang-Nguyen T Q, Nagai T and Kikuchi K. 2017. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation, *Reprod Fertil Deve*, 29:2419-2429.
- Babayev E, Wang T, Szigeti-Buck K, Lowther K, Taylor H S, Horvath T and Seli E. 2016. Reproductive aging is associated with changes in oocyte mitochondrial dynamics, function, and mtDNA quantity, *Maturitas*, 93:121-130.
- Beyer E C and Berthoud V M. 2018. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins, *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860:5-8.
- Chen Z, Zuo X, Li H, Hong R, Ding B, Liu C, Gao D, Shang H, Cao Z, Huang W, Zhang X and Zhang Y. 2017. Effects of melatonin on maturation, histone acetylation, autophagy of porcine oocytes and subsequent embryonic development, *Anim Sci J*, 88:1298-1310.
- Covarrubias L, Hernandez-Garcia D, Schnabel D, Salas-Vidal E and Castro-Obregon S. 2008. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?, *Dev Biol*, 320:1-11.
- Dalton C M, Szabadkai G and Carroll J. 2014. Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption, *J Cell Physiol*, 229:353-361.
- Fogg V C, Lanning N J and Mackeigan J P. 2011. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death, *Chin J Cancer*, 30:526-539.
- Huang Z, Pang Y, Hao H, Du W, Zhao X and Zhu H. 2018. Effects of epigallocatechin-3-gallate on bovine oocytes matured in vitro, *Asian-Australas J Anim Sci*, 31:1420-1430.
- Ikeda S and Yamada M. 2014. Midkine and cytoplasmic maturation of mammalian oocytes in the context of ovarian follicle physiology, *Br J Pharmacol*, 171:827-836.
- Kim S H, Kim S H, Lee J H, Lee B H, Yoon H J, Shin D H, Park S S, Jang S B, Park J S and Jee Y K. 2015. Superoxide Dismutase Gene (*SOD1*, *SOD2*, and *SOD3*) Polymorphisms and Antituberculosis Drug-induced Hepatitis, Allergy Asthma Immu-

- nol Res, 7:88-91.
- Lu X, Wu Z, Wang M and Cheng W. 2018. Effects of vitamin C on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer in endometriosis: A randomized controlled study, *J Int Med Res*, 46:4624-4633.
- Matsunaga R and Funahashi H. 2017. Supplementation with cumulus cell masses improves the in vitro meiotic competence of porcine cumulus-oocytes complexes derived from small follicles, *Reprod Domest Anim*, 52:672-679.
- Mlynarcikova A, Nagyova E, Fickova M and Scsukova S. 2009. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes, *Toxicol In Vitro*, 23:371-377.
- Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan G C, Lacefield J C, Lu Y, Le Tissier S and Peng T. 2016. Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy, *Free Radic Biol Med*, 90:12-23.
- Okon I S, Coughlan K A, Zhang M, Wang Q and Zou M H. 2015. Gefitinib-mediated reactive oxygen specie (ROS) instigates mitochondrial dysfunction and drug resistance in lung cancer cells, *J Biol Chem*, 290:9101-9110.
- Ozawa M, Nagai T, Somfai T, Nakai M, Maedomari N, Fahrudin M, Karja N W, Kaneko H, Noguchi J, Ohnuma K, Yoshimi N, Miyazaki H and Kikuchi K. 2008. Comparison between effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine and FSH on gap junctional communication, LH-receptor expression, and meiotic maturation of cumulus-oocyte complexes in pigs, *Mol Reprod Dev*, 75:857-866.
- Park H J, Park S Y, Kim J W, Yang S G, Kim M J, Jegal H G, Kim I S, Choo Y K and Koo D B. 2018. Melatonin Improves Oocyte Maturation and Mitochondrial Functions by Reducing Bisphenol A-Derived Superoxide in Porcine Oocytes In Vitro, *Int J Mol Sci*, 19.
- Prochazka R, Petlach M, Nagyova E and Nemcova L. 2011. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins, *Reproduction*, 141:425-435.
- Redza-Dutordoir M and Averill-Bates D A. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim Biophys Acta*, 1863:2977-2992.
- Schieber M and Chandel N S. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr Biol*, 24:R453-462.
- Shaeib F, Khan S N, Ali I, Thakur M, Saed M G, Dai J, Awonuga A O, Banerjee J and Abu-Soud H M. 2016. The Defensive Role of Cumulus Cells Against Reactive Oxygen Species In Vitro in Metaphase II Mouse Oocytes, *Reprod Sci*, 23:498-507.
- Slominski A T, Zmijewski M A, Semak I, Kim T K, Janjetovic Z, Slominski R M and Zmijewski J W. 2017. Melatonin, mitochondria, and the skin, *Cell Mol Life Sci*, 74:3913-3925.
- Sturmey R G and Leese H J. 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos, *Reproduction*, 126:197-204.
- Vaka V R, McMaster K M, Cunningham M W, Jr., Ibrahim T, Hazlewood R, Usry N, Cornelius D C, Amaral L M and LaMarca B. 2018. Role of Mitochondrial Dysfunction and Reactive Oxygen Species in Mediating Hypertension in the Reduced Uterine Perfusion Pressure Rat Model of Preeclampsia, *Hypertension*, 72:703-711.
- Wang H W, Zhao W P, Liu J, Tan P P, Zhang C and Zhou B H. 2017. Fluoride-induced oxidative stress and apoptosis are involved in the reducing of oocytes development potential in mice, *Chemosphere*, 186:911-918.
- Wang T, Gao Y Y, Chen L, Nie Z W, Cheng W, Liu X, Schatten H, Zhang X and Miao Y L. 2017. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging and promotes subsequent embryonic development in the pig, *Aging (Albany NY)*, 9:1552-1564.
- Wang W, Zhang Y, Lu W and Liu K. 2015. Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine, *PLoS One*, 10:e0120629.
- Yang M, Tao J, Chai M, Wu H, Wang J, Li G, He C, Xie L, Ji P, Dai Y, Yang L and Liu G. 2017. Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results, *Molecules*, 22.
- Yang S G, Park H J, Kim J W, Jung J M, Kim M J, Jegal H G, Kim I S, Kang M J, Wee G, Yang H Y, Lee Y H, Seo J H, Kim S U and Koo D B. 2018. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos, *Sci Rep*, 8:10130.
- Zhang J, Wang Q, Xu C, Lu Y, Hu H, Qin B, Wang Y, He D, Li C, Yu X, Wang S and Liu J. 2017. MitoTEMPO Prevents Oxalate Induced Injury in NRK-52E Cells via Inhibiting Mitochondrial Dysfunction and Modulating Oxidative Stress, *Oxid Med Cell Longev*, 2017:7528090.
- Zhou C J, Wu S N, Shen J P, Wang D H, Kong X W, Lu A, Li Y J, Zhou H X, Zhao Y F and Liang C G. 2016. The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice, *PeerJ*, 4:e1761.
- Zorov D B, Juhaszova M and Sollott S J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol Rev*, 94:909-950.