

항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향

I. 항산화제 첨가가 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

양부근 · 황환섭 · 박동현 · 정희태 · 박춘근 · 김종복 · 김정익

강원대학교 축산대학

Effect of Antioxidants and Co-culture System on the Development of Bovine Embryos Derived from *In Vitro* Fertilization

I. Effect of Antioxidants and Amino Acids on the Development of Bovine IVM/IVF Embryos

Yang, B. K., H. S. Hwang, D. H. Park, H. T. Choung, C. K. Park, J. B. Kim and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

The effect of several potential antioxidants and amino acids were examined as a means of increasing the development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized oocytes into morulae or blastocysts. Bovine embryos developed to the 2~8 cell stage after *in vitro* fertilization were cultured for 5 to 6 days at 39°C in CR_{1aa} containing varying concentration of the antioxidants and amino acid in a gas phase consisting of 5% CO₂, high humidified air. At 5~6 days, embryo developments were recorded, and embryos were fixed and stained with Hoechst 33342 DNA stain to facilitate counting of cells.

In experiment 1, the proportion of embryos developed to morulae and blastocysts in CR_{1aa} containing 1mM, 2.5mM taurine (22.6% and 20.4%) was slightly higher than those of 0, 5 and 10mM Taurine (5.7, 5.7 and 3.9%, $P < 0.05$). In experiment 2, addition of glutathione did not improve blastocyst development ($P > 0.05$). In experiment 3, concentrations of superoxide dismutase(SOD) ranging from 300 to 1,000 U did not affect the proportion of embryos developing into blastocysts ($P > 0.05$). In experiment 4, addition of 250 U catalase(38.5%) was slightly higher than those of 0, 500 and 1,000U. In experiment 5, the proportion of embryo developed beyond morula stage in CR_{1aa} with taurine plus EDTA was slightly higher than other treatments(15.7, 26.0 and 29.2%), there were no significantly increases in cell number among treatments ($P > 0.05$).

These results are indicating that antioxidants and amino acids can increase the proportion of embryos that develop into morulae and blastocysts, but did not increase in cell number of blastocysts.

* 이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

I. 서론

소 체외수정란을 대량 생산하기 위하여 체외수정란의 체외배양시 예견되는 8~16세포기 발육억제현상을 극복하기 위한 연구가 많이 시도되고 있는데, 그 중의 하나로 성숙 배양액에 thiol 화합물의 첨가, 성선자극 호르몬과 성호르몬의 첨가, 발정우 혈청 첨가, growth factor의 첨가 및 여러가지 종류의 단백질원의 첨가 (Fukui 등, 1982; Takahashi 등, 1993; Thibodeaux 등, 1993; Xu 등, 1987; 양 등, 1995)와, 난구세포, 난관상피세포 및 buffalo rat 간세포 등을 이용한 somatic cell과의 공동배양이 발육억제현상을 극복한다고 보고하였다(Carnous 등, 1984; Goto 등, 1988; Hensleigh 등, 1985; Rehman 등, 1994). 또한 Li 등(1993b)에 의하면 높은 산소압에서 배양한 수정란은 수정란 발육에 해로운 free radical을 많이 생성하는 것으로 보고하였으며, Pabon 등(1989)은 free oxygen radical이 수정란 발육억제현상의 한 원인이라고 제시하였다. 체외 배양액내에 존재하는 free radical을 제거하기 위한 수단으로 Li 등(1993a)은 항산화제를 첨가함으로써 발육억제 현상을 극복시킬 수 있다고 보고하였다.

세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포의 독성물질로 작용하는데, 이러한 과산화물을 환원시키기 위하여 체내에는 α -tocopherol (vit. E), ascorbic acid(vit. C), superoxide dismutase, catalase 등과 같은 항산화물질(antioxidants)이 존재하나, 체외에서는 이와 같은 항산화물질이 배양액내에 첨가되지 않아 세포의 성장을 억제하는 경우가 있다(Murray 등, 1990).

황을 함유한 β -아미노산인 taurine은 자성 생식기액과 수정란에 높은 농도로 존재하며 독성물질의 회색과 삼투압 조절자로서의 역할에 의해 세포막 보호작용을 하며(Gaull, 1989; Uchida 등, 1991), 세포내에서 thiol 화합물인 glutathione은 세포분화와 아미노산 수송, DNA와 단백질의 합성, disulfide의 환원반응 등 세포내에서 중요한 생물학적 기능을 가지며, 특히 산화반응에서 세포를 보호하는 항산화적 작용을 한다(Kosower 등, 1978; Meister 등, 1983). EDTA는 산소대사반응 형성을 촉진할 수 있는 Zn과 Cu의 미량

금속이온과의 착염에 의해 산화반응을 억제하는 것으로 알려져 있지만(Leipzig 등, 1970; Halliwell 등, 1975), 수정란 발육촉진에 대한 EDTA의 기전은 명확하게 밝혀지지 않았다.

본 연구는 수정란의 체외배양체계(39°C, 5% CO₂와 20% O₂조건)에서 많이 생성되는 것으로 예견되는 free radical을 제거, 수정란의 발육을 증진시키기 위한 연구로서 배양액에 적정량의 항산화제(superoxide dismutase와 catalase), glutathione, taurine 및 taucine과 EDTA의 첨가배양이 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙 배양

도살장에서 도살된 암소의 난소를 추출하여 30~35°C의 Dubelcco's Phosphate Buffered Saline에 0.1% polyvinyl alcohol과 1% antibiotic antimiotic(PBS-PVA) 용액이 함유된 배양액에 넣어 1~2시간내에 실험실로 운반하여 직경이 2~7mm의 난포로부터 18gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입채취하여 미성숙 난자를 채취한다. 채취된 난포란은 실험현미경하에서 난자 주위의 난구세포가 균일하게 둘러 쌓여 있는 것만을 선별하여 난소 운반액(PBS-PVA)과 성숙용 배양액(TC-199)으로 각각 2회 세척후 성숙 배양에 이용한다. 난포란의 성숙배양을 위하여 성숙배양접시는 TC-199배양액에 10% 자우혈청(fetal bovine serum, Gibco)과 호르몬(FSH 0.5 μ g/ml, LH 5 μ g/ml와 estradiol 1 μ g/ml)이 함유된 성숙배양액을 만든 후 100 μ l의 소적을 만들어 멸균된 medical oil(Sigma)로 피복하여 배양 2~3시간 전에 5% CO₂와 고습도의 가스조건과 39°C의 온도조건에서 평형시킨 후 각 소적 배양액에 15개의 난포란을 넣어 20~22시간 배양하여 성숙된 난포란을 선별하여 각 실험에 공용하였다.

2. 난포란의 체외수정

동결정액(0.5ml)을 37°C의 항온수조에서 1분간 용해한 후 Brackett와 Oliphant배양액(BO 배양액, 1975)에 10mM caffeine이 함유된 배양액과 혼합, 원심분리(1,500rpm, 10분)로 2회 세척후 정자 농도가

5×10⁶정자/ml가 되도록 준비한다. 체외수정액은 BO배양액에 20μg/ml의 heparin이 함유된 50μl의 소적 배양액을 만들어 2~3시간 평형시킨 후 체외수정에 이용하였다. 난구세포가 확장된 난포란을 선별하여 성숙배양액과 체외수정 배양액으로 각각 1회 세척후 10개씩을 체외배양소적으로 옮긴 후 상기 방법으로 준비한 정액 50μl를 수정배양액내에 첨가해 수정을 실시하였다. 체외수정 배양액내의 caffeine, heparin, BSA 및 정자의 최종농도는 5mM caffeine, 10μg/ml heparin, 10mg/ml BSA와 1.25×10⁶정자/ml로 하였다. 수정 후 6~8시간에 CR_{1aa} 배양액으로 2~3회 세척한 후 40~44시간 동안 체외배양을 실시한 후 체외발육 실험에 공용하였다.

3. 체외수정란의 황산화제 첨가배양

체외수정시킨 후 40~44시간 체외 배양한 수정란의 난구세포를 반복 pipet방법으로 제거한 후 2~8세포기 수정란을 CR_{1aa}배양액에 taurine 1mM, 2.5mM, 5mM 및 10mM 첨가배양, glutathione 1mM, 5mM 및 10mM 첨가배양, SOD 300U, 600U 및 1,000U 첨가배양, catalase 250U, 500U 및 1,000U를 첨가하여 39℃, 5% CO₂ 및 고습도의 조건에서 5~6일간 배양하여 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외발육 성적을 조사하였고, 배반포기까지 발육된 수정란을 형광염색법에 의하여 세포수를 조사하였다(Pursel 등, 1985).

4. 배반포 수정란의 세포수 조사

형광염색액의 보존액은 Hochest 33342(Sigma) 1mg을 1ml의 증류수에 희석하여 4℃ 냉장고에 보존하고, 실험용액은 500μl의 PBS용액에 5μl의 보존액

을 첨가하여 준비하고, mounting용액은 PBS와 glycerol을 1:1로 혼합하여 사용하였다. Slide glass위에 10~15μl의 mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 mounting 용액내에 수정란을 옮긴 후, 10μl의 형광염색액을 혼합한 후 cover glass를 덮고 메니큐어로 봉입한 후 형광현미경하에서 세포수를 조사하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 최소유의차검정(least significant difference test; LSD test)을 실시하여 통계처리를 하였다.

III. 결과 및 고찰

난포란을 회수하여 체외수정시킨 후 40~44시간에 회수한 2~8세포기 수정란을 단순배양액인 CR_{1aa}에 각각의 다른 농도의 taurine을 첨가하여 5~6일간 체외배양후 얻은 체외발육 성적을 Table 1에 요약하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이 CR_{1aa}배양액에 taurine 0, 1mM, 2.5mM, 5mM 및 10mM을 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외배양 성적은 각각 5.7, 22.6, 20.4, 5.7 및 3.9%로써 taurine 1mM과 2.5mM 첨가구가 여타구보다 높은 성적을 얻었다(P<0.05).

Taurine은 성장하는 포유동물 조직에 높은 농도로 존재하며 외부의 높은 삼투압으로부터 세포를 보호하는 삼투압 조절자이다(Shihabi 등, 1989; Uchida 등, 1991). Taurine의 세포배양학상 중요한 역할은 세포나 수정란의 체외 배양시 발생하는 독성물질의 중화와 삼투압 조절자으로써 세포막 보호작용을 하며 더욱

Table 1. Effect of taurine of the development of bovine IVM/IVF embryos

Taurine (mM)	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to:			Morulae plus blasto. (%)	Aver. cell no. of blasto. (Mean±S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts		
0	53	50	1	2	3(5.7) ^a	97.0±2.5
1	53	41	8	4	12(22.6) ^b	95.5±5.6
2.5	54	43	7	4	11(20.4) ^b	97.8±6.8
5	53	50	2	1	3(5.7) ^a	96.0
10	51	49	1	1	2(3.9) ^a	89.0

^{a,b} Within column treatment superscript differ, P<0.05

이 정제된 insulin receptors의 결합과 insulin의 생리학적 작용을 매개한다(Gaull 등, 1989; Maturo 등, 1988).

착상전 생쥐 수정란에 대한 taurine의 기능이 규명되지는 않았지만 Dumoulin 등(1992)은 taurine이 자성생식기액에 존재하는 높은 K⁺ 농도와 산화작용으로부터 생쥐 수정란을 보호한다고 하였다.

이상의 결과는 taurine 첨가 배양이 생쥐, 토끼 및 돼지 수정란의 체외배양에 taurine이 효과적이었다(Dumoulin 등, 1992; Li 등, 1993a; Petters 등, 1991)는 보고와 일치하는 경향을 보였다.

또한 배반포기 수정란의 세포수는 각각 97.0±2.5, 95.5±5.6, 97.8±6.8, 96.0 및 89.0으로서 커다란 차이는 인정되지 않았다.

단순배양액인 CR_{1aa}에 thiol 화합물인 다른 농도의 glutathione을 첨가한 후 체외발육을 조사한 결과를 Table 2에 요약하였다.

CR_{1aa} 배양액에 glutathione을 0, 1mM, 5mM 및 10mM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과 상실배기 이상 발육된 성적을 각각 50.8, 38.7, 47.5 및 33.3%로서 glutathione이 첨가되지 않은 구가 glutathione

이 첨가된 구보다 높은 체외 발육성적의 결과를 얻었다.

세포내 유리 화합물인 glutathione은 세포의 산화환원상태(redox state)를 유지하는데 중요한 역할을 하며 산화의 해로부터 세포를 보호하는 항산화적 작용을 한다(Takahashi 등, 1993).

이상의 결과에서 Yoshida 등(1993)은 glutathione을 체외배양액에 첨가하면 체외발육을 증진시킨다는 보고와는 상이한 결과를 보였다. 이는 배양액에 glutathione의 농도가 다소 높은 것으로 생각되어 glutathione의 농도를 μM수준으로 첨가하여 수정란을 체외 배양하는 실험이 필요할 것으로 생각된다.

CR_{1aa} 배양액에 항산화제의 일종인 superoxide dismutase(SOD)을 첨가하여 체외수정란의 체외발육을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에 나타난 바와 같이 SOD 0, 300, 500 및 1,000U를 체외배양액에 첨가하여 체외발육을 조사한 결과 상실배기 이상 발육된 수정란의 비율은 각각 28.2, 36.0, 35.3 및 31.5%로서 SOD을 첨가한 처리구에서 체외 발육율이 다소 높은 경향을 나타냈으나, 통계적 차이는 인정되지 않았다(P>0.05).

Table 2. Effect of glutathione on the development of bovine IVM/IVF embryos

Glutathione (mM)	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blasto. (%)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	61	30	24	7	31(50.8) ^b
1	75	46	19	10	29(38.7) ^a
5	61	32	29	0	29(47.5) ^{ab}
10	63	42	21	0	21(33.3) ^a

^{a,b} Within column treatment superscript differ, P<0.05

Table 3. Effect of superoxide dismutase on the development of bovine IVM/IVF embryos

SOD (U)	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blasto. (%)	Aver. cell no. of blasto. (Mean±S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts		
—	71	51	15	5	20(28.2) ^a	83.4±5.8
300	75	48	22	5	27(36.0) ^a	87.4±6.5
600	68	44	17	7	24(35.3) ^a	86.3±5.4
1,000	73	50	19	4	23(31.5) ^a	88.5±5.9

^a Within column treatment same superscript is not differ, P>0.05

SOD는 거의 모든 동물조직에 분포하고 있으며 (Thaete 등, 1985), superoxide anion radicals에 의한 세포손상에 대한 생물학적 방어체로서 중요하다 (Fridovich 등, 1983).

SOD는 생쥐 수정란의 2세포기 억제현상을 극복하는데 효과적이며, SOD가 생쥐 수정란이 배반포기까지 발육을 촉진한다고 보고하였으며 (Goto 등, 1992; Noda 등, 1989) Li와 Foote(1993a)는 SOD 첨가 배양이 토끼의 수정란 발육에 효과적이었다는 보고와 일치하는 경향을 보였지만, Walker 등(1992)이 발표한 양의 체외수정란과 Liu 등(1995)이 발표한 소의 체외수정란 발육에는 비효과적이었다는 발표와는 상이한 차이를 보였다. 이 같은 상이한 결과는 종 특이성과 사용된 배양액의 차이 때문인 것으로 생각된다.

체외배양액에 SOD 0, 300, 500 및 1,000U첨가구에서 배반포기 수정란의 세포수는 각각 83.4 ± 5.8 , 87.4 ± 6.5 , 86.3 ± 5.4 및 88.5 ± 5.9 로서 커다란 차이는 인정되지 않았다.

체외수정후 40~44시간에 얻은 2~8세포기 수정란의 체외배양에 항산화제인 catalase가 미치는 효과를

검토한 결과를 Table 4에 요약하였다.

체외배양액에 Catalase을 0, 250, 500 및 1,000U를 첨가한 결과 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 26.1, 38.5, 30.9 및 30.8%로서 항산화제인 catalase을 체외 배양액에 첨가한 경우 상실배 이상 발육된 체외 발육성적은 다소 높은 경향을 나타냈으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다 ($P > 0.05$).

Catalase는 모든 동물조직에서 발견되고 있으며, H_2O_2 를 H_2O 로 환원시킴으로써 과산화 지질에 의한 세포손상을 방어하는 효소로 알려져 있다 (Aebi 등, 1974).

이상의 결과는 catalase의 첨가배양이 생쥐와 토끼의 체외수정란 발육에 비효과적이었다 (Li 등, 1993a; Legge 등, 1991)는 발표와는 유사한 결과를 보였다.

한편 배반포기 수정란의 세포수는 catalase을 0, 250, 500 및 1,000U를 첨가구에서 각각 79.0, 76.0, 77.0 ± 9.1 및 82.0으로서 역시 커다란 차이는 인정되지 않았다.

체외수정란의 체외발육을 증진시키는 효과가 있는 taurine과 chilorin인 EDTA의 첨가배양이 수정란

Table 4. Effect of catalase on the development of bovine IVM/IVF embryos

Catalase (U)	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blasto. (%)	Aver. cell no. of blasto. (Mean \pm S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts		
—	69	51	14	4	18(26.1) ^a	79.0 \pm 6.2
250	65	40	23	2	25(38.5) ^a	76.0
500	68	47	17	4	21(30.9) ^a	77.0 \pm 9.1
1,000	65	45	19	1	20(30.8) ^a	82.0

^a Within column treatment same superscript is not differ, $P > 0.05$

Table 5. Effect of taurine plus EDTA on the development of bovine IVM/IVF embryos

Taurine (mM)	EDTA (mM)	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to;			Morulae plus blasto. (%)	Aver. cell no. of blasto. (Mean \pm S.E)
			Premorulae	Morulae	Blastocysts		
—	—	51	43	5	3	8(15.7) ^a	89.0 \pm 6.5
1	—	50	37	8	5	13(26.0) ^{ab}	89.6 \pm 9.2
1	1	51	36	13	2	15(29.4) ^b	89.0 \pm 11.0
2.5	—	48	34	9	5	14(29.2) ^b	88.0 \pm 9.3
2.5	1	49	32	13	4	17(34.7) ^b	75.0 \pm 2.7

^{a,b} Within column treatment superscript differ, $P < 0.05$

의 체외 발육에 병용효과가 있는지를 조사한 결과를 Table 5에 요약하였다.

체외수정후 얻은 2~8세포기 수정란을 CR_{1aa} 배양액에 taurine과 EDTA를 첨가하지 않은 구, taurine 1mM 첨가구, taurine 1mM에 EDTA 1mM 첨가구, taurine 2.5mM 첨가구 및 taurine 2.5mM에 EDTA 1mM 첨가구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 15.7, 26.0, 29.4, 29.2 및 34.7%로서 taurine(2.5mM) + EDTA(1mM) 병용처리한 구가 유의하게 높은 성적을 나타내어 taurine과 EDTA병용효과가 있음을 나타냈다(P<0.05).

본 실험의 결과는 Abramczuk 등(1977)이 Whitten 배양액에 EDTA를 첨가함으로써 생쥐 2세포기 발육억제현상을 극복시킬 수 있었다는 보고와 일치하였다. 한편 세포수를 조사한 결과로서 무처리구, taurine 1mM 첨가구, taurine 1mM에 EDTA 1mM 첨가구, taurine 2.5mM 첨가구 및 taurine 2.5mM에 EDTA 1mM 첨가구에서 각각 89.0±6.5, 89.8±9.2, 89.0±11.0, 88.0±9.3 및 75.0±2.7로서 taurine과 EDTA 병용 첨가구에서 가장 많은 세포수를 나타냈으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다.

세포의 체외배양액에 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)의 첨가 효과에 관한 연구가 진행되어 왔으나 수정란의 체외배양시 어떤 기전에 의해 수정란의 발육을 촉진시키는지에 대한 기작은 정확히 밝혀지지 않았으나, 일반적으로 Zn과 Cu의 미량 금속 이온과의 착염에 의해 산화반응을 억제하는 것으로 알려져 있다(Leipzig 등, 1970; Halliwell, 1975). Borenfreund와 Puerner(1986)은 생쥐 배양세포에 대한 중금속 이온들의 독성은 EDTA를 첨가함으로써 독성을 중화시킬 수 있다고 보고하였으며, Butler와 Halliwell(1982)은 EDTA와 Fe 이온이 상호작용에 의해 superoxide radical을 산소로 불균화 시킨다고 하였다.

본 실험의 결과로 볼 때 단순배양액인 CR_{1aa} 배양액에 적정량의 항산화제 첨가 또는 taurine의 단독 첨가 보다는 EDTA와 병용 첨가하는 것이 체외수정란의 체외배양에 효과적이라고 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 얻은 2~8세포기 체외수정란의 체외발육율을 검토하기 위하여, CR_{1aa} 배양액에 적정량의 SOD, catalase, glutathione, taurine 및 taurine과 EDTA의 첨가배양이 체외 배양내에 존재하는 free radical을 제거하고, 체외수정란의 체외발육에 효과가 있는지 검토하였다.

1. CR_{1aa} 배양액에 taurine을 0, 1, 2.5, 5 및 10 mM을 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외배양성적은 taurine 1mM(22.6%)과 2.5 mM(20.4%) 첨가구가 여타구(0;5.7%, 5mM;5.7%, 10mM;3.9%)보다 통계적 유의하게 높은 성적을 얻었다(P<0.05).
2. CR_{1aa} 배양액에 glutathione을 0, 1, 5 및 10mM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과 상실배기 이상 발육된 체외배양성적은 glutathione 무첨가구 (50.8%)가 glutathione첨가구(1mM;38.7%, 5mM;47.5%, 10mM;33.3%)보다 다소 높은 결과를 얻었다.
3. CR_{1aa} 배양액에 SOD를 0, 300, 600 및 1,000U를 첨가하여 체외배양을 실시한 결과 상실배기 이상 발육율은 각각 28.2, 36.0, 35.3 및 31.5%로서 실험구간에 커다란 차이는 인정되지 않았다(P>0.05).
4. CR_{1aa} 배양액에 catalase 0, 250, 500 및 1,000U를 첨가하여 체외배양을 실시한 결과 상실배기 이상 체외발육율은 각각 26.1, 38.5, 30.9 및 30.8%로서 실험구간의 커다란 차이는 인정되지 않았다(P>0.05).
5. CR_{1aa} 배양액에 무첨가구, taurine 1mM, taurine 1mM+EDTA 1mM, taurine 2.5mM, taurine 2.5mM+EDTA 1mM을 첨가한 결과 상실배기 이상 발육율은 각각 15.7, 26.0, 29.4, 29.2 및 34.7%로서 taurine 2.5mM+EDTA 1mM 병용첨가구가 여타구보다 다소 높은 성적을 나타내어 taurine+EDTA의 병용효과가 있음을 나타냈다(P<0.05).

V. 인용문헌

1. Abramczuk, I., D. Solter and H. Koprowski.

1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.* 61:378-383.
2. Aebi, H. 1974. Catalase. In "Methods of enzymic analysis" Hans. Ulrich. Bergmeyer(eds.). pp. 73.
 3. Borenfreud, E. and J. A. Puerner. 1986. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed *in vitro*. *Toxicology.* 38:121-134.
 4. Butler, J. and B. Halliwell. 1982. Reaction of iron-EDTA chelators with the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 218:174-178.
 5. Camous, S., Y. Heyman, W. Meziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.* 72:479-485.
 6. Dumoulin, J. C. M., J. L. H. Evers., M. Bras., M. H. E. C. Pieters and J. P. M. Geradts. 1992. Positive effect of taurine on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 94:373-380.
 7. Fridovich, I. 1983. Superoxide dismutase: An endogenous toxicant. *Annu. Rev. Toxicol.* 23:239-257.
 8. Fukui, Y., Y. Terawaki and H. Ono. 1982. Effect of gonadotropin, steroids and culture on bovine oocyte maturation. *Theriogenology.* 18:161-175.
 9. Gaull, G. E. 1989. Taurine in pediatric nutrition: Review and update. *Pediatrics.* 83:433-442.
 10. Goto, K., Y. Kajihara., S. Kosaka., M. Koba., Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83:753-758.
 11. Goto, Y., Y. Noda., K. Narimoto., Y. Umaoka and T. Mori. 1992. Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. *Free Radical Biol. & Med.* 13:47-53.
 12. Halliwell, B. 1975. The superoxide dismutase activity of iron complexes. *FEBS. Lett.* 56:34-38.
 13. Hensleigh, H. C. and A. G. Hunter. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J. Dairy. Sci.* 68:1456-1462.
 14. Kosower, N. S. and E. M. Kosower. 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54:109-160.
 15. Legge, M. and M. H. Sellens. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.* 6:867-871.
 16. Leipzig, I. J., A. J. Noyle and D. S. McCan. 1970. Case histories of rheumatoid arthritis treated with sodium or magnesium EDTA. *J. Chron. Dis.* 22:553-563.
 17. Li, J. R. H. Foote and M. Simkin. 1993a. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 49:33-37.
 18. Li, J. and R. H. Foote. 1993b. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. *J. Reprod. Fertil.* 98:163-167.
 19. Liu, Z., R. H. Foote and X. Yang. 1995. Development of bovine embryos in co-culture with KSOM and taurine, superoxide dismutase or insulin. *Theriogenology.* 44:741-750.
 20. Maturo, J. and E. C. Kulakowski. 1988. Taurine binding to the purified insulin receptor. *Biochem. Pharmacol.* 37:3755-3760.
 21. Murray, R. K., D. K. Granner., P. A. Mayes and V. W. Rodwell. 1990. Lipid peroxi-

- dition is a source of free radicals *in vivo*. Harper's Biochem(eds.). pp. 142-143.
22. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. Annu. Rev. Biochem. 52:711-760.
 23. Noda, Y., H. Matsumoto and T. Mori. 1989. Superoxide dismutase overcomes 2-cell block in mouse embryos. Acta. Obst. Gynae. Jpn. 41:751-752.
 24. Pabon, W. E., W. E. Findley and W. E. Gibbons. 1989. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil. Steril. 51:896-900.
 25. Petters, R. M. and M. L. Reed. 1991. Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one-cell and two-cell pig embryos *in vitro*. Theriogenology 35:253.
 26. Pursel, V. G., R. J. Wall., C. E. Rexroad and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24:687-694.
 27. Rehman, N., A. R. Collins., T. K. Suh and R. W. Wright, Jr. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalo rat liver cells. Theriogenology 41:1453-1462.
 28. Shihabi, Z. K., H. O. Goodman, R. P. Holmes and M. L. O'Connor. 1989. The taurine content of avian erythrocytes and its role in osmoregulation. Comp. Biochem. Physiol. 92A:545-549.
 29. Takahashi, M., T. Nagai., S. Hamano., M. Kuwayama., N. Okamura and A. Okano. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol. Reprod. 49: 228-232.
 30. Thaete, L. G., R. K. Crouch and S. S. Spicer. 1985. Immunologicalization of copper-zinc superoxide dismutase. J. Histochem. Cytochem. 33:803-808.
 31. Thibodeaux, J. K., R. P. Del Vecchio and W. Hansel. 1993. Role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. J. Reprod. Fert. 98:61-66.
 32. Uchida, S., T. Nakanishi., H. M. Kwon, A. S. Preston and J. S. Handler. 1991. Taurine behaves as an osmolyte in Madin-Darby canine kidney cells; protection by polarized, regulated transport of taurine. J. Clin. Invest. 88:656-662.
 33. Walker, S. K., T. M. Heard and R. F. Seamark. 1992. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. Theriogenology 37:111-126.
 34. Xu, K. P., T. Greve., H. Callssen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81:501-504.
 35. Yoshida, M., K. Ishigaki, T. Nagai and M. Chikyu. 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.
 36. 양부근, 정희태, 김정익. 1995. 소 체외수정란의 실용화를 위한 체외배양과 동결보존에 관한 연구. 한국가축번식학회지 10:53-63.