

## Cysteine 및 Glutathione이 돼지난포란의 체외성숙에 미치는 영향

신성진 · 한만희 · 이규승  
충남대학교 농과대학 동물자원학부

### Effect of Cysteine and Glutathione on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

Sin, S. J., M. H. Han and K. S. Lee

Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture,  
Chungnam National University

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of cysteine (CySH) and glutathione (GSH) on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. The results obtained were summarized as follows :

1. When the immature oocytes were cultured at 0, 0.04, 0.14, 0.6 and 1.2 mM of cysteine (CySH) for 36h, the germinal vesicle breakdown (GVBD) rates were 90.8, 89.9, 90.5, 92.0 and 91.3%, respectively, and the maturation rates of the oocytes with metaphase-II were 56.1, 50.7, 41.9, 49.0 and 61.5%, respectively. Especially, the maturation rates of 0.14 and 0.6 mM treated groups were significantly lower than those of control (non-treated) group ( $P < 0.05$ ). After 44h of culture in the same treatments of CySH, the GVBD rates of porcine immature oocytes were 90.0, 91.8, 89.8, 90.5 and 89.6%, respectively, and the maturation rates were 80.2, 76.3, 69.4, 66.7 and 72.6%, respectively. Especially, the maturation rates of 0.14 and 0.6 mM treated groups were significantly lower than those of control group ( $P < 0.05$ ).
2. When the immature oocytes were cultured at 0, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mM of glutathione (GSH) for 36h, the GVBD rates of porcine immature oocytes were 91.0, 90.9, 89.5, 92.0 and 91.1%, respectively, and the maturation rates were 59.0, 48.5, 47.8, 38.6 and 37.5%, respectively. All treated groups of GSH showed lower maturation rates than the control group ( $P < 0.05$ ). After 44h of culture in the same treatments of GSH, the GVBD rates of porcine immature oocytes were 91.8, 94.1, 89.1, 91.3 and 91.1%, respectively, and the maturation rates were 84.6, 57.1, 69.6, 71.3 and 64.3% respectively. All treated groups of GSH showed lower maturation rates than the control group ( $P < 0.05$ ).

(Key words : Porcine oocytes, IVM, Cysteine (CySH), Glutathione (GSH))

#### I. 서 론

최근 가축번식학 분야는 번식의 효율성을 증진시키

거나 인류가 요구하는 형질을 가진 동물을 작출하기 위하여 수정란이식, 생식세포의 동결보존, 수정란의 성감별, 복합개체의 작출, 목적유전자의 미세주입에 의한 형질전환동물의 작출 및 핵치환 등을 통한 복제

동물의 작출과 같은 생명공학적 기법의 기술체계를 확립하고자 많은 연구가 수행되고 있다. 이러한 연구를 효율적으로 수행하고 보급하기 위해서는 우선적으로 다수의 수정란을 확보하는 것이 필수적이다. 이를 해결하는 하나의 수단으로서 도축된 개체의 난소에서 채취된 다수의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙배양시켜 이용하고자 하는 방법이 여러 연구자들에 의하여 다각적으로 검토되고 있다.

포유동물 난자의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzmann(1935)이 토끼의 미성숙 난포란을 채취하여 체외배양했을 때, 체내에서 일어나는 일련의 핵성숙과정이 자발적으로 일어난다는 것을 최초로 보고한 이래, 여러 연구자에 의해서 다양한 동물을 대상으로 연구가 진행되어 왔다. 특히 돼지에 있어서 미성숙 난포란의 체외성숙은 Edward 등(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양함으로써 제1성숙분열전기(prophase - I)의 이중기(diplotene)에 멈추어 있던 난자의 핵이 성숙분열을 재개하여 제2성숙분열중기(metaphase - II, M-II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래, 여러 연구자들에 의하여 돼지난포란을 이용한 체외수정란을 생산하기 위한 연구가 수행되어 왔다. 즉, 난소의 형태(Motlik 등, 1984), 난포의 크기(Leibfried와 First, 1979 ; Motlik 등, 1984 ; Nagai 등, 1993), 성숙배양시간(Yoshida와 Kojima, 1989), 각종 배양액(Eng 등, 1986 ; 정, 1993), 성선자극호르몬과 단백질원으로 혈청 및 BSA의 첨가배양(Linder 등, 1974 ; Channing 등, 1978 ; Racowsky, 1985 ; Natio와 Toyoda 등, 1992), 각종 성장인자의 첨가배양(Ueno 등, 1988 ; Downs, 1989 ; Feng 등, 1988 ; Ding과 Foxcroft, 1994) 및 체세포와의 공동배양(Eystone 등, 1989 ; Goto 등, 1988 ; Kano 등 1994 ; Han, 1996) 등과 같은 방법을 이용하여 핵성숙과 세포질성숙을 동시에 유기하여 난포란의 성숙율을 높이고 양질의 수정란을 생산하고자 하는 연구들이다.

그러나 돼지 난포란의 체외배양에 관한 연구는 난포란의 체외성숙시간이 타가축에 비하여 길고, 체외성숙시 체내성숙시보다 난구세포와 난포란의 미세융모로 연결되어 있는 수가 적고 쉽게 분리되어 gap junction의 감소가 빨라져 물질이동에 장애가 발생(Motlik 등, 1984)하며, 난세포질내의 세포내소기관들의 재배

열이 불완전하게 이루어질 뿐만 아니라 응성전핵 형성시 관여하는 것으로 알려진 glutathione(GSH)과 같은 물질의 합성에 장애를 초래(Funahashi 등, 1995)하여 난포란의 성숙이 불완전하게 이루어지므로 인하여, 수정시 다정자침입율의 증가, 불완전한 응성전핵 형성 등으로 인한 수정율의 감소, 초기배 발달시 4세포기에 발달이 지연되거나 정지되는 체외발육능 정지현상(*in vitro* cell block)을 초래하는 등 다른 축종보다 양질의 수정란을 생산하는 것이 어려운 것으로 보고되었다.

한편, Corsby 등(1988)은 포유동물 수정란의 체외 발육능 정지현상은 난포란의 체외성숙시 산소분압이 난관내의 조건(28~42  $\mu$ M)보다 고분압(224  $\mu$ M)의 조건에 노출됨으로 인하여 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 발생하며, 이들 유리산소기(oxygen-free radical)들은 'oxidative stress'를 초래하여 미토콘드리아의 호흡작용억제, 세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA상의 손상을 초래하는 등 난포란의 성숙 및 체외발달시에 중요한 저해요인으로 작용한다고 보고하고 있다. 이와 같은 체외배양조건에서 발생하는 유리기(free radical)를 제거하여 난포란의 체외성숙율과 배발달율을 높이기 위한 하나의 수단으로 연구자들은 저분압 산소조건(hypoxic condition)의 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 및 90% N<sub>2</sub> 배양기사용(Quinn과 Harlow, 1978 ; Legge와 Sellens, 1991), 효소계 항산화제인 super oxide dismutase(SOD)와 catalase 등의 첨가배양, 비효소계 항산화제로서 황화합물(thiol compounds)인 cysteine(CySH),  $\beta$ -mercaptoethanol( $\beta$ -ME), cysteamine, glutathione(GSH) 및 thioredoxin 등을 첨가배양하는 방법 등이 연구되었다(Ishii 등, 1981 ; Zmuda 등, 1983 ; Meister, 1983 ; Pabon 등, 1989 ; Yoshida 등, 1993 ; Li와 Foote, 1993 ; Lafleur 등, 1994). 그러나, 돼지난포란(immature oocyte)의 체외성숙(*in vitro* maturation, IVM)에 관한 연구는 체외수정 및 배발달에 비하여 연구가 미진한 것이 현실이다.

이에 본 연구는 복합배양액인 TCM-199에 cysteine(CySH) 및 glutathione(GSH)을 첨가하여 난포란의 체외성숙을 유기시킴으로써 이들 황 화합물이 돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 구명하고

자 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 미성숙난포란의 회수

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경산돈(체중 120 kg 내외)으로부터 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와 100 µg/ml의 streptomycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가한 38℃의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 후 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고 재차 신선 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 100 ml 비이커에 넣어 38℃로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10 ml 주사기로 직경이 2~5 mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15 ml 원심분리관에 옮겨 38℃로 조정된 정온대(multi-block, USA)에 10 분간 정지, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5 cm 간격으로 방안을 표시한 87×15 mm 페트리접시(petri dish, Korea)에 넣고 1 mg/ml BSA(Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 TL-HEPES와 희석하여 실험현미경(Nikon SMZ-2T, Japan) 하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질의 균일한 난포란만을 선별하여 난포란 흡입에 적당한 직경이 되도록 제작한 9" pasteur pipet(corning, USA)을 이용하여 난포란을 회수한 후 체외성숙 실험에 공시하였다.

### 2. 체외성숙 배양액

본 실험에서 사용된 체외성숙 배양액은 TCM-199(Gibco, USA)에 10% FCS(Gibco, USA), 0.2 mM Na-pyruvate(Sigma, USA)와 10 µg/ml FSH-p 및 1 µg/ml estradiol-17β의 호르몬, 25 µg/ml의 gentamycin(Sigma, USA)을 첨가하여 기본 배양액으로 작성하였고, 각각의 황 화합물(thiol compounds)을 실험 목적에 적합하도록 첨가한 후, 0.22 µm millipore filter(MFS, USA)로 여과·멸균하여 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 및 고습도의 조건의 CO<sub>2</sub> 배양기(Forma, USA)에서 3시간 이상 평형시킨 후 사용하였다.

### 3. Cysteine(CySH) 및 glutathione(GSH)의 첨가 배양

체외성숙배양액인 TCM-199에 항산화제(Antioxidants)중 cysteine(CySH) 및 glutathione(GSH)을 각각 첨가하여 4-well plastic dish(Nunc, Denmark)에 500 µl의 well을 제작한 후 well당 30~40개의 미성숙난포란을 적하하여 36시간 및 44시간 동안 39℃, 5% CO<sub>2</sub> 및 고습도 조건의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 염색을 통하여 난핵포봉괴울(germinal vesicle breakdown, GVBD) 및 핵성숙울(second meiotic division Metaphase-II, M-II)을 조사하였다. 구체적인 실험설계는 다음과 같다. 실험 1. Cysteine을 0(control), 0.04, 0.14, 0.6 및 1.2 mM을 각각 첨가하였을 때 난핵포봉괴울과 핵성숙울에 미치는 영향, 실험 2. glutathione(GSH)을 0(control), 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mM을 각각 첨가하였을 때 난핵포봉괴울과 핵성숙울에 미치는 영향에 대하여 조사하였고, 이상과 같은 모든 실험은 37.5℃로 조정된 현미경가온판(microscopic stage warmer, Japan) 위에서 실시하였다.

### 4. 체외성숙 난포란의 염색 및 성숙판정

각각의 처리구별 36시간 및 44시간 동안 성숙배양시킨 난포란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속 염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하여 핵성숙단계를 비교 판정하였다. 염색방법을 요약하면 0.3% hyaluronidase(Sigma, USA)용액에 성숙이 유기된 난자난구세포복합체(Cumulus-Oocytes Complexes, COCs)를 옮겨 1분간 vortexing을 통하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 1% BSA가 함유된 TL-HEPES로 3회 세척하였다. 100% 에탄올에 침지하여 세척한 slide glass 위에 난포란을 30~40개를 적하한 다음, cover slip으로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover slip과 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol=1:3)을 흘리는 방법으로 5분간 고정하였다. 고정이 끝난 난포란의 염색은 염색액을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol=1:3:1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거시킨 다음, 위상차현미경(400~

1,000×)으로 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다. 핵성숙단계의 판정은 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 실시하였다.

### 5. 통계분석

본 연구에서 얻어진 실험자료의 통계처리는 Chi-square test( $P < 0.05$ )을 하여 처리구간의 유의성을 검정하였다.

## II. 결과 및 고찰

### 1. Cysteine(CySH)의 첨가배양이 체외성숙에 미치는 영향

돼지 미성숙난포란을 체외성숙 기본배양액인 TCM-199에 cysteine을 첨가하여 36시간 및 44시간 동안 성숙을 유지하였을 때의 결과는 Table 1 및 Fig. 1과 같다. 즉, 성숙배양액에 cysteine을 0, 0.04, 0.14, 0.6 및 1.2 mM을 첨가하여 36시간 동안 체외 성숙을 유지시켰을 때, 난핵포 붕괴율은 각각 90.8, 90.5, 92.0 및 91.3%로서 각 처리구 모두 높았고, 핵성숙율은 각각

56.1, 50.7, 41.9, 49.0 및 61.5%로서 대조구에 비하여 낮은 성숙율을 보였으며, 특히 0.14 mM 및 0.6 mM 첨가군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다( $P < 0.05$ ). 또한, 44시간 동안 체외성숙을 유지시켰을 때 난핵포붕괴율은 각각 90.0, 91.8, 89.8, 90.5 및 89.6%로서 처리구간 유의성이 없었으며, 핵성숙율은 각각 80.2, 76.3, 69.4, 66.7 및 72.6%로서 무첨가한 대조구에 비하여 비교적 낮은 성숙율을 보였으며, 특히 0.14 mM 및 0.6 mM 첨가군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다( $P < 0.05$ ).

이와 같은 결과는 Yoshida 등(1993)이 mTLP-PVA 배양액에 cysteine을 첨가하여 성숙을 유도하였을 때, 무첨가한 대조구에 비하여 첨가한 모든 처리구에서 핵성숙율이 낮았고, 특히 0.57 mM 처리구에서 더욱 낮은 핵성숙율을 보고한 결과 및 Sawai 등(1997)이 TCM-199에 돼지 미성숙난포란을 0.57 mM cysteine을 첨가하여 36시간 동안 배양하였을 때, 핵성숙율은 무처리구(62%)보다 낮은 57%이고, 48시간 동안 성숙을 유지하였을 때 무처리구(90%)에 비하여 88%로서, 낮은 성적을 보고한 것과 일치하는

**Table 1. Effect of the addition cysteine(CySH) to TCM-199 on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes**

Culture periods(h)	Addition of CySH(mM)	Total no. of oocytes examined <sup>4</sup>	No. of oocytes at the stages of <sup>1</sup>						Percentage of GVBD	Maturation rate(%) <sup>2</sup>
			GV <sup>3</sup>	Pro-I	Met-I	Ana-I	Tel-I	Met-II		
36	0	98	9	—	17	6	11	55	90.8	56.1
	0.04	89	9	1	11	4	19	45	89.9	50.7
	0.14	105	10	1	14	16	20	44	90.5	41.9*
	0.6	100	8	2	14	12	15	49	92.0	49.0*
	1.2	104	9	—	12	8	11	64	91.3	61.5
44	0	101	10	—	6	1	3	81	90.0	80.2
	0.04	97	8	1	7	2	5	74	91.8	76.3
	0.14	98	10	—	10	1	9	68	89.8	69.4*
	0.6	105	10	1	14	0	10	70	90.5	66.7*
	1.2	106	11	1	10	2	5	77	89.6	72.6

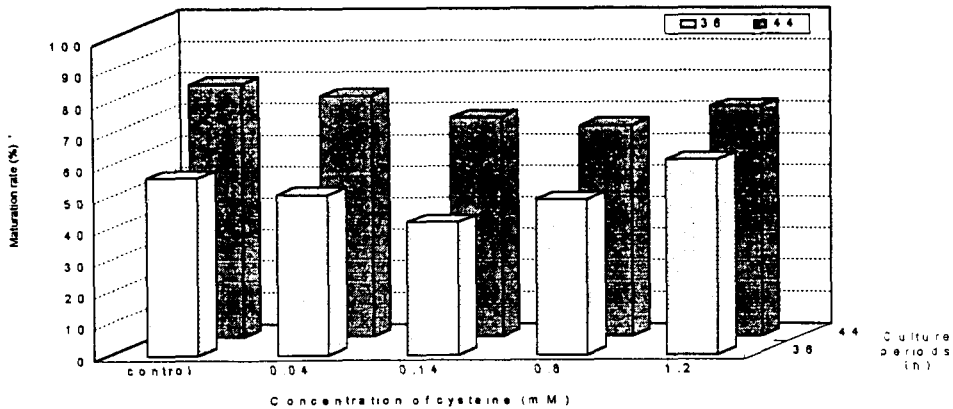
<sup>1</sup> GV ; germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

<sup>2</sup> percentage of oocytes reached Met-II.

<sup>3</sup> the data included degeneration oocytes.

<sup>4</sup> Data from 3 replicates.

\* Significantly different from the control value( $P < 0.05$ ).



**Fig. 1. Comparison of glutathione(GSH) effect on the maturation rate of porcine follicular oocytes for 36h or 44h *in vitro***

결과이다. 그러나 이와 같은 낮은 핵성숙율의 보고와는 반대로 유의적으로 높은 GSH 합성율과 높은 응성전핵(male pronucleus, MPN)형성율을 보임으로써 양질의 수정란을 생산하는데 cysteine의 첨가가 반드시 필요하다고 보고하고 있어, 본 연구는 추가적으로 체외수정을 통해 정상수정율과 배발달을 유기하여 배발달에 미치는 영향을 구명해야 할 것으로 사료된다.

## 2. Glutathione(GSH)의 첨가배양이 체외성숙에 미치는 영향

돼지 미성숙난포란을 체외성숙 기본 배양액인 TC-M-199에 glutathione(GSH)을 첨가하여 36시간 및 44시간 동안 성숙을 유기하였을 때의 결과는 Table 2 및 Fig. 2와 같다. 즉, 성숙배양액에 GSH를 0, 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mM을 첨가하여 36시간 동안 체외성숙을 유기시켰을 때 난핵포봉괴율은 각각 91.0, 90.9, 89.5, 92.0 및 91.1%로서 처리구간 유의성이 없이 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 59.0, 48.5, 47.8, 38.6 및 37.5%로서 대조구에 비하여 모든 처리구에서 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다( $P < 0.05$ ). 또한, 44시간 동안 체외성숙을 유기시켰을 때 난핵포봉괴율은 각각 91.8, 94.1, 89.1, 91.3 및 91.1%로서 모든 처리구에서 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 각각 84.6, 57.1, 69.6, 71.3 및 64.3%로서 대조구에 비하여 모든 처리구에서 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다

( $P < 0.05$ ).

Glutathione( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl glycine; GSH)은 Kosower(1978), Meister와 Anderson(1983) 및 Lafleur 등(1994)에 따르면 포유동물의 세포에서 주된 thiol 화합물로서 세포의 증식, 아미노산의 수송, DNA 및 단백질의 합성, 여러 화합물의 이황화결합(disulfide bonds)의 환원 및 'oxidative stress'로부터 세포를 보호한다고 보고하였고, 특히 Calvin 등(1986)은 GSH는 미성숙난포란의 성숙시 합성되어 수정시 침입한 정자의 두부에 있는 염기성이 강한 아미노산으로 구성되어 있는 protamine이 팽화(dec-ondensation)될 수 있도록 하여 histone으로 치환되어 응성전핵형성을 촉진한다고 마우스를 가지고 실험한 결과를 발표하였다.

본 연구에서 실험한 체외성숙에 관한 연구보고는 많지 않지만, Luvoni 등(1996)이 소수정란의 미성숙난자를 체외성숙시 1 mM의 GSH 첨가 배양이 무첨가한 대조구(57%)에 비하여 첨가구가 66.2%로서 수정율의 증가 및 상실배/배반포 도달율도 대조구(13.9%)에 비하여 18.2%로서 발달을 촉진한다는 보고를 볼 때, 체외성숙시 첨가한 GSH가 미성숙난포란의 체외성숙시 세포질내 GSH와 같은 항산화제를 합성함으로써 수정율 및 배발달율을 증가시킨 것으로 사료된다.

**Table 2. Effect of the addition glutathione(GSH) to TCM-199 on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes**

Culture periods(h)	Addition of GSH(mM)	Total no. of oocytes examined <sup>4</sup>	No. of oocytes at the stages of <sup>1</sup>					Percentage of GVBD	Maturation rate(%) <sup>2</sup>	
			GV <sup>3</sup>	Pro-I	Met-I	Ana-I	Tel-I			Met-II
36	0	100	9	—	16	6	10	59	91.0	59.0
	0.05	99	9	6	15	3	18	48	90.9	48.5*
	0.1	105	11	3	24	7	10	50	89.5	47.8*
	0.5	101	8	4	29	12	9	39	92.0	38.6*
	1.0	112	10	—	32	22	6	42	91.1	37.5*
44	0	110	9	1	5	2	—	93	91.8	84.6
	0.05	84	5	—	28	1	2	48	94.1	57.1*
	0.1	138	15	—	18	—	9	96	89.1	69.6*
	0.5	115	10	—	17	3	3	82	91.3	71.3*
	1.0	112	8	—	20	2	10	72	91.1	64.3*

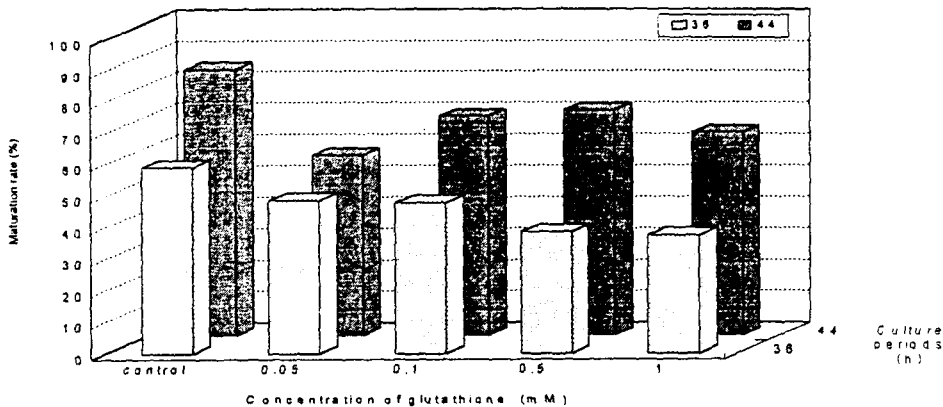
<sup>1</sup> GV : germinal vesicle stage, Pro I ; first prometaphase, Met I ; first metaphase, Ana I ; first anaphase, Tel I ; first telophase, Met II ; second metaphase.

<sup>2</sup> percentage of oocytes reached Met-II.

<sup>3</sup> the data included degeneration oocytes.

<sup>4</sup> Data from 3 replicates.

\* Significantly different from the control value(P<0.05).



**Fig. 2. Comparison of glutathione(GSH) effect on the maturation rate of porcine follicular oocytes for 36h or 44h *in vitro***

#### IV. 적 요

본 연구는 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙시킬 때, cysteine(CySH) 및 glutathione(GSH)의 첨가 배양이 난핵포붕괴 및 핵성숙율에 미치는 영향을 조사

하기 위하여 실시하였다. 본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 체외성숙 배양액인 TCM-199에 cysteine(CySH)을 각각 0, 0.04, 0.14, 0.6 및 1.2 mM 첨가하여 36시간 동안 체외성숙을 유지시켰을 때의 난핵포붕괴율은 각각 90.8, 89.9, 90.5, 92.0 및

91.3%으로서 각 처리구간 유의성이 없었고, 핵성숙율은 각각 56.1, 50.7, 41.9, 49.0 및 61.5%로서 대조구에 비하여 낮은 성숙율을 보였으며, 특히 0.14 mM 및 0.6 mM 첨가군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다( $P < 0.05$ ). 또한, 44시간 동안 체외성숙을 유지시켰을 때 난핵포방괴율은 각각 90.0, 91.8, 89.8, 90.5 및 89.6%로서 처리구간 유의성이 없었고, 핵성숙율은 각각 80.2, 76.3, 69.4, 66.7 및 72.6%로서 무첨가한 대조구에 비하여 비교적 낮은 성숙율을 보였으며, 특히 0.14 mM 및 0.6 mM 첨가군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다( $P < 0.05$ ).

2. 체외성숙 배양액인 TCM-199에 glutathione (GSH)을 0, 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mM을 첨가하여 36시간 동안 성숙을 유지시켰을 때 난핵포방괴율은 각각 91.0, 90.9, 89.5, 92.0 및 91.1%로서 처리구간 유의성이 없이 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 59.0, 48.5, 47.8, 38.6 및 37.5%로서 대조구에 비하여 모든 처리구에서 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다( $P < 0.05$ ). 또한, 44시간 동안 성숙을 유지시켰을 때 난핵포방괴율은 각각 91.8, 94.1, 89.1, 91.3 및 91.1%로서 모든 처리구에서 높은 결과를 나타냈으며, 핵성숙율은 각각 84.6, 57.1, 69.6, 71.3 및 64.3%로서 대조구에 비하여 모든 처리구에서 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다( $P < 0.05$ ).

## V. 인용문헌

1. Byun, T. H. and S. H. Lee. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. *Kor. J. Emb. Trans.*, 7:97-110.
2. Byun, T. H., S. H. Lee and H. B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for of the oocytes from domestic animals. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
3. Caamano, J. N., Z. Y. Ryoo, J. A. Thomas, and C. R. Youngs. 1996.  $\beta$ -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured /*in vitro*-fertilized embryos. *Biol. Reprod.*, 55:1179-1184.
4. Calvin, H. I., K. Grosshans and E. J. Blake. 1986. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova ; relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Research*. 6:107-114.
5. Channing, C. P. and Tsafiriri. 1978. Regulation of ovulatory processes : Ovum maturation, follicular reapture and luteinization. Plenum Press, New York.
6. Corsby, I. M., F. Gandolfi et al. 1998. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*, 82:769-775.
7. Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
8. Downs, S. M. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 41:371-379.
9. Edward, R. G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-352.
10. Eng, L. A., E. T. Konegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. *Reprod. Fert.*, 76:657-662.
11. Eystone, W. H., and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
12. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 98:177-185.
13. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of different serum supplements in matu-

- ration medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39:965-973.
14. Funahashi, H., T. T. Stumpf, T. C. Cantley, N. H. Kim and B. N. Day. 1995. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of *in vitro* matured porcine oocytes following *in vitro* fertilization and/or electrical activation. *Zygotes*, 3:273-281.
  15. Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma and Y. Nakanish. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
  16. Grupen, C. G., H. Nagashima and M. B. Nottle. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 53:173-178.
  17. Hunter, R. H. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fert.*, 12:525-531.
  18. Ishii, T., S. Bannai and Y. Sugita. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 256:12387-12392.
  19. Kano, K., T. Miyano and S. Kato. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:1061-1068.
  20. Kosower, N. S. and E. M. Kosower. 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.*, 54:109-160.
  21. Lafleur, M. V. M., J. J. Hoorweg, E. J. Westmijze and J. Retel. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free. Radic. Res.*, 21:9-17.
  22. Legge, M. and M. H. Sellens. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.*, 6:867-871.
  23. Leibfried, M. L. and N. L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
  24. Luvoni, G. C., L. Keskinetepe and B. G. Brackett. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 43:437-443.
  25. Li, J. and R. H. Foote. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. *J. Reprod. Fert.*, 98:163-167.
  26. Linder, G. M. and R. W. Right, Jr. 1978. Morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:711-717.
  27. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52:711-760.
  28. Motlik, J., N. Crozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:323-328.
  29. Nagai, T., J. Ding and R. M. Moor. 1993. Effects of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. *J. Exp. Zool.*, 266:146-151.
  30. Naito, K. and Y. Toyoda. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 47:43-47.
  31. 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. *Fert. Steril.*, 51:896-900.
  32. Pincus, G. and E. V. Enzmann. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62:655-657.
  33. Quinn, P. and G. M. Harlow. 1978. The ef-



- fect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. J. Exp. Zool., 206:73-80.
34. Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. J. Reprod. Fert., 74:9-24.
  35. Sawai, K., H. Funahashi and K. Niwa. 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.
  36. Ueno S., T. F. Manganaro and P. K. Donahoe. 1988. Human recombinant Mullerian inhibiting substance of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor *in vitro*. Endocrinology. 123:1652-1659.
  37. Wang, Z. K., P. H. Wei, J. Z. Wang, C. Lei and M. Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 37:733-739.
  38. Yoshida, M. and Y. Kojima. 1989. Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hairpin-curved tail in zona-free hamster egg. Jpn. J. Vet. Sci., 51(2):428-430.
  39. 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.
  40. Zmuda, J. and B. Friedenson. 1983. Changes in intracellular glutathione levels in stimulated and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptoethanol or cysteine. M. Immunol., 130:362-364.
  41. 양부근, 박동현, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1997. Thiol 화합물과 항산화제 첨가배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 효과 ; I.  $\beta$ -Mercaptoethanol과 Cysteamine 첨가가 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 21(4):335-343.
  42. 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 농도 변화에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 21(4):345-353.
  43. 정형민. 1993. 형질전환동물의 생산을 위한 돼지난포란의 체외발생에 관한 연구. 건국대학교 박사학위논문. pp13-23.
  44. 한만희. 1996. 체세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 배발달에 미치는 영향. 충남대학교 석사학위논문.
  45. 황환섭. 1997. 항산화제와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향. 강원대학교 석사학위논문.
- (접수일자 : 1998. 12. 13. / 채택일자 : 1998. 12. 23.)