

## L-Ascorbic Acid와 Selenium이 돼지난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배발달에 미치는 영향

이 경 호 · 문 승 주\*

전남대학교 농과대학 동물자원학부

### Effect of L-Ascorbic Acid and Selenium on Maturation, Fertilization and Development of Porcine Oocytes *In Vitro*

Lee, K. H., and S. J. Moon\*

Department of Animal Science, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

#### ABSTRACT

This study was conducted to investigate effects of L-ascorbic acid and selenium on maturation, fertilization, and development ability of porcine follicular oocytes *in vitro*. When the follicular oocytes were cultured in the media containing 0, 62.5, 100 and 300 $\mu$ M of L-ascorbic acid for 40~44h, the percentages of germinal vesicle breakdown were 86.8, 92.9, 91.7 and 92.6% respectively, and the nuclear maturation rates (M II) were 44.7, 57.1, 52.8 and 53.7%. The nuclear maturation rates of treated groups were significantly higher than those of non-treated group ( $p < 0.05$ ). When the follicular oocytes were cultured at 0, 0.4, 0.8, and 1.5 $\mu$ M of selenium for 40~44h, the nuclear maturation rates of treated groups were significantly higher than those of non-treated group ( $p < 0.05$ ). The addition of L-ascorbic acid or selenium to the maturation medium, the incidence of male pronuclear formation was significantly increased ( $p < 0.05$ ) and polyspermy rate was significantly decreased ( $p < 0.05$ ). The addition of L-ascorbic acid or selenium to the maturation medium increased the cleavage rate, morula and blastocyst rate ( $p < 0.05$ ). These results suggested that the addition of L-ascorbic acid and selenium to maturation medium increase the nuclear maturation rates, male pronuclear formation and normal embryonic development in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*.

(Key words : L-ascorbic acid, Selenium, Polyspermy, IVC, Porcine oocyte)

#### I. 서 론

최근 수정란 이식, 난자 및 수정란의 동결보존, 수정란의 성판별, 핵이식을 통한 복제동물의 작출, 유전자 이식을 통한 유용한 생리활성물질을 생산해 내기 위한 복합개체의 작출 등과 같은 가축번식학 분야의 첨단기술을 연구하기 위해서는 우선적으로 다수의 수정란을

확보하는 것이 필수적이다. 따라서 이를 해결하는 하나의 수단으로서 가축의 난소내에 다량 존재하는 미성숙 난포란을 채취하여 체외에서 성숙 배양하여 수정시킴으로서 다량의 수정란을 얻고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 포유동물난자의 체외성숙에 관한 연구는 Pincus와 Enzman(1935)이 토끼의 미성숙 난포란을 채취 배양시 체내에서 일어나는 일련의 핵성숙과정이 일어난다는 것을 최초로 보고하였고, 이는

포유동물 체외 수정란 생산에 기초가 되었다(Fleming 등, 1985; Bavister, 1987). 돼지미성숙난포란의 체외성숙은 Edwards(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간동안 체외에서 배양함으로써 제1성숙분열전기(prophase I)의 이중기(diplotene)에 멈추어 있던 난자의 핵이 성숙분열을 재개하여 제2성숙분열중기(metaphase II)에 도달한다는 것이 처음 보고되었지만, 세포질의 불충분한 성숙과 낮은 전핵형성을, 높은 다전자 침입율, 수정후 낮은 난활율, 낮은배발포배 발달율등이 문제로 지적되고 있다(Thibault 와 Gerard, 1973; Funahashi 등, 1994). 따라서 돼지 난포란의 체외성숙율을 높이려는 연구 즉, 난소의 형태(Motlik 등, 1984) 및 난포의 크기(Nagai 등, 1993), 그리고 성숙배양시간(Yoshida, 1989) 등과 같은 요인에 의한 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 대한 연구가 다각적으로 수행되어 왔으며 난포란의 체외 발달 및 성숙율 개선을 위한 성장인자 첨가연구가 수행되었다(Lu 등, 1989; Yoshida 등, 1993). 또한 배양액내 체내유사인자들의 첨가로 난포란의 체외성숙 성적을 개선하였으며(Zhang 등, 1991; Kito와 Bavister, 1996), 성선자극 호르몬의 첨가는 체외성숙 난포란의 수정율과 배발달율에 증가를 보였고(Funahashi 와 Day, 1993), 적절한 배양액 조성에 대한 연구(Yoshida 등, 1989, 1992), 체외성숙 배양액내 혈청의 첨가(Naito와 Toyoda, 1992) 등 다양한 연구가 수행되어져 왔다. 그러나 돼지의 경우, 미성숙난포란의 체외성숙시간이 다른 가축에 비해 길고, 체외성숙시 체내성숙시보다 난구세포와 난포란이 미세용모로 연결되어져 있는 수가 적고, 쉽게 분리되어 gap junction의 감소가 빨라져 물질 이동에 장애를 초래(Funahashi 등, 1995)하여 성숙시간이 길어지고 수정시 다전자 침입율이 높아지며, 응성전핵형성율의 감소 및 체외발달배양시 체외발생능 정지현상(*in vitro* cell block)을 초래는등 결과적으로 체외수정란생산 및 산자생산이 극히 제한되고 있는 실정이다(Ball, 1983). 체외배양액내에서 생성되는 free radical을 제거하기 위한 수단의 일환으로 Li 등(1993)은 항산화제를 첨가함으로써 발육억제현상을 극복할 수 있다고 보고하였다. 세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포의 독성물질로 작용하는데, 이러한 과산화물을 환원시키기 위해서는 L-ascorbic acid(Vitamin C),  $\alpha$ -tolcolp-

herol(Vitamin E), superoxide dismutase, catalase등과 같은 항산화물질(antioxidants)이 유효하나, 체외에서는 이와 같은 항산화물질이 배양액 내에 존재되지 않아 세포의 성장을 억제하는 경우가 있다(Murray 등, 1990). 포유동물의 세포내 존재하는 황화합물인 GSH는 아미노산의 수송, 단백질의 합성과 DNA의 deoxyribonucleotid 전구물질 합성 및 free radical과 reactive oxygen compounds에 대한 세포의 보호등 많은 생물학적 이전에 있어 중요한 역할을 수행하고 있으며, 체외배양액에 GSH첨가는 oxidative stress에 의해 일어나는 발육억제현상으로부터 수정란을 보호하고, Free radical은 배란과 정자의 수정능획득 등 정상적인 생리작용에도 관여를 하지만, 포유동물의 모든 세포에서 효소의 불활성화, 세포막 지질의 과산화 등으로 세포기능을 손상시키는 것으로 보고(Bize 등, 1991)되고 있으며 이는 포유동물 수정란을 체외에서 배발달을 유도했을 때 특정배발달 단계에서 체외발생능 정지(*In vitro* cell block)현상을 야기시키는 것으로 보고되고있다.

따라서 본 연구는 체외성숙 배양액내에 항산화물질인 L-ascorbic acid 와 selenium을 첨가 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙율, 체외수정율 그리고 체외배발달율에 미치는 효과를 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시 난포란의 준비

실험에 공시한 난포란은 도살 직후 적출한 난소를 채취, 75 $\mu$ g/ml penicilline G와 50 $\mu$ g/ml streptomycine sulfate가 첨가된 30~36 $^{\circ}$ C의 생리 식염수에 보존 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소의 표면을 생리 식염수로 2~3회 세척한 다음, 난포의 직경 3~6mm인 난포에서 난포란을 채취하였다. 채취한 난포란은 실험현미경하에서 난구세포의 부착상태가 양호하고 난세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

### 2. 배양액

본 실험에 사용된 체외성숙 배양액인 Whitten's 배양액에 100IU/ml HCG와 PMSG를 첨가, 황화합물인 L-ascorbic acid는 0, 62.5, 100, 300 $\mu$ M, sel-

enium은 0, 0.4, 0.8, 1.5 $\mu$ M을 첨가후 0.22 $\mu$ M syringe filter로 여과, CO<sub>2</sub>배양기(39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10~12시간 동안 평형 시킨 후 사용하였다. 수정능 획득 배양액은 TCM-199(Sigma, USA)에 3.05mM D-glucose, 2.92mM Ca lactate, 0.91mM Sodium pyruvate, 75 $\mu$ g Potassium penicillin G와 50 $\mu$ g Streptomycine sulfate를 첨가한 기초 배양액에 0.4% BSA(Sigma, USA)를 첨가 pH 7.8로 조정 사용했다. 체외수정배양액은 TCM-199에 caffeine sodium benzonate(Sigma, USA)를 첨가 pH 7.4로 조정 사용하였다. 체외발달배양액(In vitro culture medium)은 Whitten's 배양액을 사용하였다. Whitten's 배양액에 BSA 0.4%를 첨가 사용하였으며, 사용 전에 0.22 $\mu$ M millipore filter로 여과, 멸균하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 10~12시간 동안 평형시킨 후 사용하였다.

### 3. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 10%의 난포액, PMSG 100IU와 HCG 100IU를 첨가한 체외 성숙 배양액을 500 $\mu$ l씩 4-well dish(Nunc, USA)에 분주하고 mineral oil로 피복한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 well당 50개 정도의 미성숙 난포란을 적하하여 20~22시간 배양한 후 호르몬이 첨가되지 않은 체외 성숙 배양액에 옮겨 다시 20~22시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

### 4. 정자의 준비 및 체외수정

맨손채취법으로 채취한 정액은 75 $\mu$ g/ml potassium penicillin G와 50 $\mu$ g/ml streptomycine sulfate를 첨가 16 $^{\circ}$ C에 보관 사용하였다. 정액 5cc와 동량의 BSA-saline(0.9% NaCl에 10 $\mu$ g/ml BSA 첨가)과 혼합한 후 200g에서 3분간 원심분리 한 후 상층액 5ml와 BSA-Saline 5ml 혼합, 1200g에서 3분간 2~3회 원심 분리하여 세정하였다. 세정 후 미리 준비한 수정능 획득 배양액과 혼합, 정자수가 2 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml가 되도록 조절 CO<sub>2</sub> 배양기(39 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 90분 동안 수정능 획득을 유도하였다(Nagai 등, 1984). 체외수정은 체외수정 배양액을 50 $\mu$ l의 미소적을 적하 mineral oil로 피복한 후 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 10~12시간동안 평형 시켰다. 40시간 체외 성숙된 난자 10~15개씩을 준비한 미소적내로 옮기고, 수정능 획득 배양액으로 정자의 최종농도가 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml가 되도록 조

절 정자를 주입한 후 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 6시간 동안 배양하여 체외수정을 유도하였다.

### 5. 난자의 체외 성숙 판정

체외 배양 40~44시간 후에 0.1%의 hyaluronidase로 성숙된 난자의 난구세포를 완전히 제거한 후 25% acetic ethyl alcohol 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1% orcein과 45% acetic acid로 염색하여 위상차 현미경(Nicon, Japan)하에서 검경 핵성숙을 조사하였다.

### 6. 정자의 침입 및 응성 전핵 형성을 조사

체외수정후 수정란을 acetic acid와 ethyl alcohol을 3:1로 혼합한 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1% orcein과 45% acetic acid로 염색하여 위상차 현미경 하에서 정자의 난자내 침입 및 응성 전핵 형성을 등을 조사하였다. 난자내 정자 또는 응성전핵이 관찰되면 정자의 침입이 이루어졌다고 판단하고 한개 이상의 응성전핵이 하나의 난자에서 관찰되면 다정자 침입으로 간주하였다.(Nagai 등, 1984)

### 7. 체외배발달

Whitten's배양액에 L-ascorbic acid와 selenium을 각각의 농도별로 첨가한 배양액을 50 $\mu$ l씩 미소적을 작성하여 최소한 실험 6시간전에 전배양하였다. 수정한 난자는 수정미소적으로부터 세정용 배양액으로 옮겨 가볍게 pipeting한 뒤 난자에 부착된 정자와 난구세포를 제거하였고, 작성된 미소적에 각각 난자를 10개씩 옮긴후 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 120시간동안 배양하면서 수정란을 관찰하여 난할율, 상실배 및 배반포배로의 발달율을 조사하였다.

### 8. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과는 ANOVA(Analysis of Variance)검정에 의하여 통계처리를 실시하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. L-ascorbic acid와 selenium첨가배양이 체외성숙 및 체외수정에 미치는 영향

체외성숙배양액(Whitten's medium)내에 L-asc-

orbic와 selenium을 첨가 40~44시간 성숙배양시킨 결과는 Table 1과 2와 같다. 체외성숙배양액내 L-ascorbic acid를 0, 62.5, 100 및 300 $\mu$ M을 첨가배양했을 때 난핵포봉괴율은 각각 86.8%, 92.9%, 91.7% 및 92.6%로 대조구에서 처리구에 비하여 약간 낮았으나 통계적인 유의차는 없었다. 그러나 제 2성숙분열증기(M II)의 핵성숙율은 대조구에서 44.7% 처리구에서 각각 57.1%, 52.8% 및 53.7%로 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ). L-ascorbic acid와 selenium을 첨가 성숙배양된 난자를 체외수정 유도후 체외수정율, 다정자침입율 및 응성전핵형성율은 Table 3과 4에 제시하였다. L-ascorbic acid를 첨가 체외성숙시킨 난자를 체외수정 유도후 난자내 정자침입율은 각각 70.0%, 78.3%, 75.0% 및 75.6%로 대조구에 비하여 처리구에서 약간 높은 경향이었으나 다정자 침입율은 대조구에서 77.8%로 매우 높은 반면 처리구에서 각각

34.5%, 30.0% 및 29.0%로 유의적으로 낮게 나타났다( $P < 0.05$ ). 또한 하나의 난자에 침입한 정자수도 대조구에서 2.31개인 반면 처리구에서 1.29개~1.67개로 낮았으며 응성전핵형성율도 처리구에서 유의적으로 낮게 나타났다( $P < 0.05$ ). 성숙배양액내 selenium을 첨가 체외성숙시킨 난자를 체외성숙유도후 성적도selenium을 첨가 체외성숙시킨 난자를 체외수정유도후 성적도 L-ascorbic acid를 첨가했던 경우에 유사한 경향을 보였다. 이와 같이 L-ascorbic acid와 selenium등 항산화물질을 첨가한 처리구에서 대조구에 비하여 체외성숙과 체외수정이 양호한 것은 L-ascorbic acid와 selenium등 항산화 물질을 배양액내 첨가 배양함으로써 미성숙난포란의 체외성숙시 생성된 GSH가 난세포질내 축적 수정시 응성전핵형성을 증가시키고 Free radical생성을 억제하여 oxidative stress로 수정란을 보호하기 때문(Shihabi등, 1989;

**Table 1. Effect of L-ascorbic acid addition to maturation medium on nuclear maturation of porcine follicular oocytes**

L-ascorbic acid concentrations ( $\mu$ M)	No. of oocytes examined	No. of oocytes degenerated	No(%). of oocytes at the stage of					Percentage of GVBD
			GV	M I	A I	T I	M II	
0	76	6(7.9)	10(13.2)	12(15.8)	8(10.5)	6(7.9)	34(44.7) <sup>a</sup>	86.8
62.5	84	6(7.1)	10(11.9)	10(11.9)	6( 7.1)	4(4.8)	48(57.1) <sup>b</sup>	92.9
100	72	6(8.3)	10(13.9)	10(13.9)	4( 5.6)	4(5.6)	38(52.8) <sup>b</sup>	91.7
300	108	8(7.4)	14(13.9)	10( 9.3)	12(11.1)	6(5.6)	58(53.7) <sup>b</sup>	92.6

GV ; geminal vesicle stage, M I ; metaphase I, A I ; anapahase I, T I ; telophase I, M II ; metaphase II, GVBD ; geminal vesicle breakdown

<sup>a,b</sup> ; Different superscript within column denote significant difference( $P < 0.05$ )

**Table 2. Effect of selenium addition to maturation medium on nuclear maturation of porcine follicular oocytes**

Selenium concentrations ( $\mu$ M)	No. of oocytes examined	No. of oocytes degenerated	No(%). of oocytes at the stage of					Percentage of GVBD
			GV	M I	A I	T I	M II	
0	60	6(10.0)	8(13.3)	8(13.3)	6(10.0)	4(6.7)	28(46.7) <sup>a</sup>	90.0
0.4	90	6( 6.7)	10(11.1)	10(11.1)	10(11.1)	6(6.7)	48(53.3) <sup>b</sup>	93.0
0.8	98	8( 8.2)	10(10.2)	11(11.2)	8( 8.2)	8(8.2)	54(55.1) <sup>b</sup>	91.0
1.5	100	7( 7.0)	10(10.0)	11(11.0)	10(10.0)	8(8.0)	54(54.0) <sup>b</sup>	93.0

GV ; geminal vesicle stage, M I ; metaphase I, A I ; anapahase I, T I ; telophase I, M II ; metaphase II, GVBD ; geminal vesicle breakdown

<sup>a,b</sup> ; Different superscript within column denote significant difference( $P < 0.05$ )

**Table 3. Effect of L-ascorbic acid addition to maturation medium on sperm penetration, polyspermy and male pronuclear formation rate of porcine oocytes**

L-ascorbic acid concentrations ( $\mu\text{M}$ )	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated (%)	No. of polyspermy (%)	Mean number of spermatozoa in penetrated oocytes	No. of MPN* formation (%)
Control	60	42(70.0)	28(77.8) <sup>a</sup>	2.31	16(38.1) <sup>a</sup>
62.5	74	58(78.3)	20(34.5) <sup>b</sup>	1.29	34(58.6) <sup>b</sup>
100	80	60(75.0)	18(30.0) <sup>b</sup>	1.67	34(56.7) <sup>b</sup>
300	82	62(75.6)	18(29.0) <sup>b</sup>	1.51	36(58.1) <sup>b</sup>

a, b : Different superscript within column denote significant difference( $P < 0.05$ )

\* MPN : Male pronucleus formation

**Table 4. Effect of selenium addition to maturation medium on sperm penetration, polyspermy and male pronuclear formation rate of porcine oocytes**

Selenium concentrations ( $\mu\text{M}$ )	No. of oocytes examined	No. of oocytes penetrated (%)	No. of polyspermy (%)	Mean number of spermatozoa in penetrated oocytes	No. of MPN* formation (%)
Control	60	42(70.0)	28(77.8) <sup>a</sup>	2.31	16(38.1) <sup>a</sup>
0.4	100	68(68.0)	20(29.4) <sup>b</sup>	1.60	38(55.9) <sup>b</sup>
0.8	80	52(65.0)	14(26.9) <sup>b</sup>	1.76	30(57.6) <sup>b</sup>
1.5	98	78(79.6)	28(35.9) <sup>b</sup>	2.11	40(51.2) <sup>b</sup>

a, b : Different superscript within column denote significant difference( $P < 0.05$ )

\* MPN : Male pronucleus formation

Caamano등, 1996)이라고 생각된다.

## 2. L-ascorbic acid와 selenium첨가배양이 수정후 체외배발달에 미치는 영향

L-ascorbic acid와 selenium을 첨가 체외성숙된 난자를 체외수정 유도후 체외발달 성적은 Table 5와 6과 같다. 체외수정 48시간후 난할율은 L-ascorbic acid 첨가구에서 각각 65.9%, 60.3%와 64.1%로 47.8%인 대조구에 비하여 유의적으로 높았고( $P < 0.05$ ), 120시간동안 체외에서 발달성적은 상실배 발달율이 대조구에서 20.2%인 반면 처리구에서 21.8%~27.2%, 배반포배발달율은 대조구에서 9.0% 처리구에서 11.4%~13.8%로 모두 처리구에서 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ). 한편, selenium 첨가시 48시간후 난할율은 대조구에서 48.2% 처리구에서 각각 53.6%, 56.9%와 49.3%로 0.4 $\mu\text{M}$ 과 0.8 $\mu\text{M}$  첨가구에서 유의적으로 높았고( $P < 0.05$ ) 상실배발달율과 배반포배 발달율 모두 처리구에서 유의적으로 높았다( $P < 0.05$ ). 이

러한 결과는 Umaoka등(1992)이 배양액내 항산화제인 SOD첨가는 생쥐수정란의 발달율을 촉진시킨다는 보고와 일치 하였으며 배양액내 항산화 물질 첨가시 cell block현상을 제거하여 배발달율을 향상시킨다(Matsuyama 와 Fukui, 1994)는 보고와도 일치하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합해보면 배양액내 항산화제 첨가는 난포란이 체외에서 성숙되는 동안 세포질의 산화에 의한 손상을 보호하는데(Gruppen등, 1995) 본 실험의 결과에서도 체외성숙율이 첨가구와 대조구사이에 통계적인 유의차를 보였고( $P < 0.05$ ), 체외수정후 수정율, 응성전핵형성을, 난할율등도 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타나 항산화제의 배양액내 첨가는 난포란의 성숙율, 정자침투율 및 전핵형성율등이 개선된다는 보고와 일치하는 경향을 보였다. 항산화제 첨가는 세포의 성장을 촉진시키며, 배양액내 존재하는 GSH(glutathione)합성기질로 작용, 세포내 GSH농도를 증진시킴으로써 free radical로 부터 수정란을

**Table 5. Effect of L-ascorbic acid addition to culture medium on *in vitro* development of porcine oocytes following insemination *in vitro***

L-ascorbic acid concentrations ( $\mu$ M)	No. of oocytes examined	Cleavage rate at 48h(%)	No. (%) of embryos that developed to			
			48h		120h	
			2 to 4cell.	8 to 16cell.	Mor.	Blast.
Control	186	89(47.8) <sup>a</sup>	46(51.7)	43(48.3)	18(20.0) <sup>a</sup>	8( 9.0) <sup>a</sup>
62.5	132	87(65.9) <sup>b</sup>	40(46.0)	47(51.0)	19(21.8) <sup>a</sup>	12(13.8) <sup>b</sup>
100	145	88(60.3) <sup>b</sup>	48(54.5)	40(45.5)	24(27.2) <sup>b</sup>	10(11.4) <sup>b</sup>
300	134	86(64.1) <sup>b</sup>	40(46.5)	46(53.5)	22(25.5) <sup>b</sup>	10(11.6) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> ; Different superscript within column denote significant difference(P<0.05)

**Table 6. Effect of selenium addition to culture medium on *in vitro* development of porcine oocytes following insemination *in vitro***

Selenium concentrations ( $\mu$ M)	No. of oocytes examined	Cleavage rate at 48h(%)	No. (%) of embryos that developed to			
			48h		120h	
			2 to 4cell	8 to 16cell	Mor.	Blast.
Control	112	54(48.2) <sup>a</sup>	35(64.8)	19(35.2)	11(20.3) <sup>a</sup>	6(11.1) <sup>a</sup>
0.4	125	67(53.6) <sup>b</sup>	36(53.7)	31(46.3)	24(35.8) <sup>b</sup>	17(25.4) <sup>b</sup>
0.8	123	70(56.9) <sup>b</sup>	34(48.6)	36(51.4)	21(30.0) <sup>b</sup>	18(25.7) <sup>b</sup>
1.5	152	75(49.3) <sup>a</sup>	35(46.7)	30(40.0)	25(33.3) <sup>b</sup>	15(20.0) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> ; Different superscript within column denote significant difference(P<0.05)

보호하며 (Tesuro 등, 1981; Li 등, 1993), 배양액내 L-ascorbic acid와 selenium 등 항산화제의 첨가는 GSH의 농도를 증진시켜 수정란의 생존율과 발달을 저해하는 heat shock로 부터 수정란을 보호하며 oxidative stress에 의해 일어나는 체외배발달 억제현상을 극복 체외발달을 향상시키는 것으로 알려져 있다 (Ealy 등, 1992; Arechiga 등, 1995). 본 연구에서는 수정란의 체외발달시 GSH농도는 측정하지 않았지만 상실배와 배반포배 발달율이 L-ascorbic acid, selenium을 첨가한 구에서 대조구에 비하여 통계적인 유의차(P<0.05)를 보이는 결과로 보아 항산화제 첨가는 체외수정란내의 GSH농도를 증가시키며 체외발달율을 증가시킨다고 보고한 Takahashi 등(1993)과 유사한 결과를 보였다. 따라서 돼지 미성숙난포란의 체외성숙배양 및 체외수정란의 배발달시 배양액내 항산화제 첨가는 미성숙난포란의 성숙율과 체외수정율과 전핵형성을 및 수정란의 체외발생능 정지 현상을 극복하여 체외발달율을 향상시키는 효과적인 첨가물질로 이용될 수 있으리라 생각된다.

#### IV. 요약

본 연구는 체외성숙배양액에 L-ascorbic acid와 selenium을 첨가 배양, 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배발달에 미치는 영향을 검토하고자 수행하였다. 배양액내 L-ascorbic acid를 0, 62.5, 100 그리고 300 $\mu$ M 첨가 40~44시간동안 배양한 성적은 난핵포 붕괴율이 각각 86.8%, 92.9%, 91.7%, 그리고 92.6%였으며 핵성숙율은 각각 44.7%, 57.1%, 52.8%, 그리고 53.7%로 첨가구에서 유의적으로 높았다 (p<0.05). 체외성숙배양액내 L-ascorbic acid와 selenium을 첨가 배양 후 체외 수정 유리 결과, 응성전핵 형성율은 유의적으로 높았고 (p<0.05) 다정자 침입율은 유의적으로 낮게 나타났으며 (p<0.05), 체외수정 후 난할율, 상실배와 배반포배 발달율도 첨가구에서 유의적으로 높게 나타났었다(p<0.05).

이러한 결과는 체외성숙 배양액내 L-ascorbic acid와 selenium을 첨가 배양 했을때 돼지 미성숙난포란

의 체외 성숙율, 응성 전핵 형성을 그리고 돼지 체외수정란의 배발달율을 향상 시킬 수 있으리라 사료된다.

## V. 인용문헌

1. Arechiga, C. F., A. D. Ealy and P. J. Hansen. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. Reprod.* 52:1296-1301.
2. Ball, G. D., M. L. Leibfried, R. W. Lenz, R. L. Ax, B. D. Bavister, and N. L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28:717-725.
3. Bavister, B. D. 1987. Oocytes maturation and *in vitro* fertilization in the rhesus monkey In RL Stouffer(ed): "The Promate Ovary." New York:Plenum Press, pp 119-137.
4. Bize, I., G. santander, P. Cabello, D. Driscoll and C. Sharpec. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 44:398-403.
5. 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.
6. Ealy, A. D., M. Drost, C. M. Barros and P. J. Hansen. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell. Biol. Inter. Reports*, 16(2):125-131.
7. Edwards, R. G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature*. 208:349-352.
8. Fleming, A. D., G. Evanss, E. A. Walton and D. T. Armstrong. 1985. Developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro* in defined medium Gamete. *Rse.* 12:255-263.
9. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro* *J. Reprod. Fertil.* 98:179-185.
10. Funahashi, H., T. T. Stumpf, S. L. Terlouw, T. C. Cantley, A. Rieke and B. N. Day. 1994. Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocytes glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 51:633-639.
11. 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
12. Grupen, C., H. Nagashima and M. B. Nottle. 1995. Cystamine affects *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 53:173-178.
13. Kito, S. and B. D. Bavister. 1996. Maturation of hamster oocytes under chemically defined conditions and sperm penetration through the zona pellucida. *Zygote* 4:199-210.
14. 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. Fertil.* 98:162-167
15. Lu, L. H., H. F. MacDonnell and J. Gordon. 1989. Birth of calves after *in vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes *Theriogenology* 31 Abstract 222
16. Matsuyama, K. and Y. Fukui. 1994. Effects of oxygen concentration and free-radical scavengers on the *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Devel.* 40:73-79
17. Motlik, J., N. Grozet and J. Fulka. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicle *J. Reprod.*

- Fretil. 72:323-328
18. Murry, R. K., D. K. Granner., P. A. Mayes and V. W. Rodwell. 1990. Lipid peroxidation is of free radicals *in vitro*. Harpers Biochem (eds). pp. 142-143
  19. Nagai, T., J. Ding and R. M. Moor. 1993. Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes J. Exp. Zool. 266:146-151
  20. Nagai, T., K. Niwa & A. Iritani. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 70:271-275
  21. Naito, K., F. P. Dean 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
  22. Picus, G. and E. V. Enzmann. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 62:665-675
  23. Shihabi, Z. K., H. O. Goodman, R. P. Holmes and M. L. O'connor. 1989. The taurine content of avian erythrocytes and its roles in osmoregulation. Comp. Biochem. Physiol 92A:545-549
  24. 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.
  25. Tesuro, I., S. Bannai and Y. Sugita. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by -mercaptoethanol *in vitro*. J. Biol. Chemistry 256(23) :12387-12392.
  26. Thibault, C. and M. Gerd. 1973. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*. Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique 13(supplement)145-156
  27. Umaoka, Y., Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori. 1992. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos Mol. Reprod. Devel. 31:28-33
  28. Yoshida, M., Y. Ishizaki, H. Kawagishi, K. Bamba and Y. Kojima. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J. Reprod. Fert. 95:481-488
  29. Yoshida, M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Anim. Reprod. 35:34-37
  30. Yoshida, M., K. Ishigaki, T. Nagai, M. Chikyu and V. G. Pursel. 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.
  31. Zhang, X., J. Rutledge and D. T. Armstrong. 1991. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium Mol. Reprod. Dev. 28 :292-296
- (접수일자 : 1999. 8. 27. / 채택일자 : 1999. 9. 21.)