

## 비특이 면역증강제 Barodon-FX<sup>®</sup> 첨가 TCM199에서 생쥐 및 소 초기배의 체외 배반포 발달에 관한 연구

정영채<sup>†</sup> · 나광빈 · 김창근<sup>1</sup> · 류재원<sup>1</sup> · 최수일<sup>2</sup> · 전경수<sup>2</sup> · 류범룡<sup>3</sup>  
중앙대학교 유전공학연구소

### ***In-Vitro* Development of Early Stage Mouse and Bovine Embryos to Blastocysts in TCM 199 Supplemented with Nonspecific Immunostimulator Barodon-FX<sup>®</sup>**

Chung, Y. C.<sup>†</sup>, K. B. Luo, C. K. Kim<sup>1</sup>, J. W. Ryu<sup>1</sup>, S. I. Choi<sup>2</sup>, K. S. Jeon<sup>2</sup> and B. Y. Ryu<sup>3</sup>  
Genetic Engineering Institute, Chung-Ang University

#### ABSTRACT

This experiment was designed to evaluate effects of nonspecific immunostimulator(NIS) Barodon-FX<sup>®</sup>, anionic alkali mineral complex and far-infrared radiation solution on *in vivo*-produced mouse and *in vitro*-produced bovine embryos to blastocyst development. Proportion of mouse embryos developing into blastocyst was not greater in BSA- and Barodon-added medium than in BSA-control, but there was significantly different( $P < 0.05$ ) in hatching and hatched blastocyst development between 0.25% Barodon- and PVP-contained medium(54.7%) than PVP-control(32.5%). BOEC and GC resulted in higher proliferation rate(24~40% and 17~22%, respectively) in 0.25~0.5% Barodon-added medium than in controls, but proliferation of GC and CC greatly decreased in 1~2% Barodon-added medium. Effect of Barodon on cell proliferation greatly varied among somatic cells.

Proportion of early bovine embryos developing into morula and blastocyst was significantly greater( $P < 0.05$ ) in 0.5% Barodon-added medium(50% and 63.6%) than in control(31.6% and 27.4%) under co-culture with BOEC and GC, but developmental rate was not different between other Barodon treatments and control.

These data indicate that effect of Barodon on cell proliferation significantly varied between somatic cells and that addition of 0.5% Barodon in BOEC-coculture system may further improve blastocyst development in early bovine embryos.

(Key words : Barodon-FX<sup>®</sup>, Blastocyst, Cell proliferation, Embryo development, Somatic cells)

본 연구는 바로돈-에스에프(주)의 연구비로 수행되었음.

<sup>†</sup>Corresponding author : College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansung, Kyunggi 456-756, Korea, Tel : (031) 670-3025, Fax : (031) 675-9002, E-mail : ycchung2@post.cau.ac.kr

<sup>1</sup> 중앙대학교 동물자원과학과(Dept. of Animal Science and Technology, Chung-Ang University)

<sup>2</sup> 바로돈-에스에프(주) 생명과학에너지연구소(Life Science Energy Institute, Barodon-S.F Corp.)

<sup>3</sup> 서울대학교 의학연구원(Medical Research Center, Seoul National University)

## I. 서론

가축 체외수정란의 체외배양에서 체세포와의 공동배양 또는 체세포유래 conditioned medium을 이용함으로써 배반포 발달율이 크게 향상되어 왔다(Eyestone과 First, 1989). 이때 체세포의 기능은 배발달 촉진물질의 분비, 세포분화 촉진조건의 형성 및 배양액내의 유해물질의 완화 또는 제거효과 등과 관련이 있는 것으로 추측되고 있다(Kane, 1987). 이들 기능 중에서도 최근에 배양액 중에 있는 유해물질의 제거효과에 대한 관심이 높아져 왔다.

특히 배발달율의 저하 또는 중지의 원인이 활성 산소(reactive oxygen species, ROS)와 관련이 있으며(Noda 등, 1991) 산화스트레스와도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Caamano 등, 1996). 또한 초기배는 산화스트레스에 더욱 민감하며(Nars-Esfahani 등, 1990; Gardiner와 Reed, 1994), 배양중 유해성분의 제거가 없는 조건이고 동시에 다른 배양조건도 부적절한 경우 산화스트레스에 더 민감한 반응을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Ellis, 1990).

일반적으로 포유류 세포는 자체의 항산화 방어 기구를 가지고 있으나 불완전하며 조직 또는 세포에 따라 방어기구의 구성에 많은 차이가 많은 것으로 알려져 있다(Chubatsu와 Meneghini, 1993 ; Halliwell과 Gutteridge, 1999). 이러한 연구결과들에 근거하여 체외배양액에 항산화 기능을 갖는 물질 또는 유해성분 제거물질들의 첨가실험에서 초기배의 배발달율이 크게 향상되고 있다(McLaugh

lin 등, 1990 ; Takahashi 등, 1993 ; Caamano 등, 1996 ; Lim 등, 1998).

최근 원적외선이 그 작용기전은 아직 불명하지만 생체의 생리에너지가 되며 또한 물의 정수기능을 갖는 것으로 소개되었고(남, 1997) Inoue와 Kabaya(1989), 丹羽 등(1991)은 백혈구 기능을 더욱 활성화시켜 항체생산과 면역기능이 증진됨을 보고한 바 있다. 특히 Park 등(1998)은 귀금속과 천연무기물의 복합광물질 용액이며 원적외선과 다가음이온 효과를 갖는 알칼리 적외선 방사체 조성물 Barodon<sup>®</sup> 용액이 비특이적 세포면역증강(nonspecific immunostimulator)의 기능이 있는 것으로 보고하였다. 한편 이 용액은 생체의 활성화 에너지원으로서 세포내의 산화방지와 신진대사의 활성화 기능을 갖는 것으로 추측되고 있다.

본 연구는 동물세포에 대해 이러한 여러 기능을 갖는 Barodon-FX<sup>®</sup>을 생쥐와 소의 초기배 체외배양시 첨가될 때 세포증식과 배반포 발달율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시된 Barodon-FX<sup>®</sup>의 첨가

Barodon-FX<sup>®</sup>(이하 Barodon)원액은 귀금속 및 천연무기물(규소, 나트륨, 칼슘, 금, 은, 유황 등)을 함유한 복합 광물질 용액으로서 다가음이온( $\text{SiO}_4^{4-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3^{3-}$  등)을 갖는 고농축 음이온 알칼리 적외선방사체 조성물이다. 체외배양액에 Barodon의 첨가수준은 기본배양액(TCM199 + 10% FCS)에, 0, 0.25, 0.5, 1.0 및 2.0%였으며 각 첨가수준별 배양액의 pH와 삼투압은 Table 1과 같다.

Table 1. pH and osmolarity in TCM 199 + 10% FCS supplemented with different Barodon-FX<sup>®</sup> concentrations

	Barodon-FX <sup>®</sup> in medium(%)				
	0	0.25	0.5	1.0	2.0
pH	7.42	7.41	7.49	7.62	7.94
Osmolarity (mOsmol)	297.3	301.3	303.7	309.7	319.0

## 2 생쥐 수정란의 채란과 체외배양

Barodon 첨가농도의 유해 여부와 최적 첨가수준을 결정하기 위하여 생쥐 수정란으로 먼저 배양 실험을 실시하였다. ICR계 성숙 생쥐의 과배란 유도를 위하여 5~10IU PMSG를 복강내 주사 후 48시간 뒤에 5~10IU hCG 주사와 동시에 수컷과 합사하였고 hCG 주사 후 27~28시간에 수정란을 난관으로부터 채란하였다.

체외배양은 0.4% BSA 또는 0.4% PVP(polyvinylpyrrolidone)가 함유된 기본 M16 배양액에 각각 5개 수준(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0%)의 Barodon를 첨가한 체외배양액에서 6일간 배양하였다.

## 3. 공배양 체세포의 채취와 계대배양

체외수정란의 공동배양을 위한 소의 난관상피세포(bovine oviduct epithelial cells, BOEC)는 도출된 소의 난관으로부터 채취하였으며, 과립막세포(granulosa cells, GC)와 난구세포(cumulus cells, CC)는 도출된 소 난소의 난포(직경 2~6mm)로부터 채취하였다.

Barodon가 체세포에 미치는 영향을 먼저 알기 위하여 이들 세 종류의 체세포를 TCM199에 넣고 원심분리(1,500rpm, 5분)로 2회 세척한 다음 각 수준의 Barodon이 첨가된 기본배양액으로 각각 1회 추가 원심분리 후 일정한 체세포농도( $6\sim 8 \times 10^3$ /ml)로 5ml씩 재부유하였다. 체세포부유액(5ml)은 50ml, 25cm<sup>2</sup> 배양 flask에서 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 39°C 조건의 배양기에서 연속 3세대 계대배양한 다음 8일간 추가 배양하면서 Barodon의 첨가수준별 체세포 증식효과를 비교하였다.

계대배양(5~7일) 및 최종 세포증식(8일)후 세포분리는 배양 flask 바닥에 세포의 합류상태가 이뤄질 때 배양액을 제거하고 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 제거 PBS로 세척한 다음 0.25% trypsin과 0.2% EDTA가 첨가된 PBS에서 3~10분간 CO<sub>2</sub> 배양기내에 방치후 분리하였다.

## 4. 소 체외수정란의 체외배양

체외수정란을 얻기 위하여 먼저 도살우의 난소로부터 채란된 미성숙 난포란을 체외성숙배양액

(TCM199에 10% FCS, 1  $\mu$ l/ml FSH, 1  $\mu$ l/ml hCG, 1  $\mu$ l/ml estradiol-17 $\beta$ , 항생제 첨가)에서 과립막세포( $1.0 \times 10^6$ /ml)와 공배양하면서 22-24시간 체외성숙 시켰다.

체외수정은 동결 용해한 소정액을 1mM caffeine이 함유된 BO액으로 원심 분리하여 2회 세척한 다음 5mM caffeine과 5% heparin 함유 BO액으로 재차 원심분리 후 체외수정 배양액 내에 정자농도  $2.5 \times 10^6$ /ml의 정자부유액을 만들고 체외성숙난자 10~15개가 들어 있는 50  $\mu$ l 소적 내에 넣어서 체외수정시켰다.

약 20시간의 체외수정 후 난자 주위의 난구세포를 제거한 다음 2~4세포기 수정란을 5개 수준의 Barodon(0, 0.25, 0.5, 1, 2%)이 첨가된 TCM199+10%FCS의 소적내에서 소 난관상피세포(BOEC) 또는 과립막세포(GC)와 공동배양하였으며 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다. 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 39°C에서 9일간 배양 후 배반포기까지의 배 발달을 조사하였다.

## III. 결 과

### 1. 생쥐 초기배의 배반포 발달을

Barodon 첨가가 초기배에 미치는 유해 여부를 조사한 실험에서 BSA 함유 배양액에서는 0.25%와 0.5% Barodon첨가에서 모두 배반포 발달율은 대조구와 차이가 없었다. 그러나 1.0~2.0% 첨가에서 현저히 감소하였으며 부화과정 이후의 배반포율은 0.5%에서도 현저히 감소하였다(Table 2).

BSA대신 PVP 첨가 배양액에서는 전체 배반포 발달율이 BSA 첨가 배양액과 동일한 경향을 나타냈다. 그러나 0.5% 첨가시 부화과정 이후의 배반포가 대조구의 32.5%보다 훨씬 높은 54.7%를 보였으며, 1.0% 이상 첨가에서는 현저히 감소하였다(Table 3).

### 2. 체세포의 증식을

Barodon 첨가가 공배양 세포증식에 미치는 영향을 조사한 실험에서 난관상피세포(BOEC)와 과립막세포(GC)의 경우 0.25~0.5% Barodon 첨가에

**Table 2. Effect of Barodon-FX<sup>®</sup> in M16+0.4% BSA on *in vitro* development of 2- to 4-cell mouse embryos to blastocyst stages for 6 days**

Concentration of Barodon(%)	No. of embryos*		No.(%) of embryos developed to blastocyst	
	Cultured	Degenerated	Total	Hatching+hatched
0	74	3	70(94.6) <sup>a</sup>	53(71.6) <sup>a</sup>
0.25	72	1	64(95.8) <sup>a</sup>	54(75.0) <sup>a</sup>
0.5	75	1	69(93.2) <sup>a</sup>	40(53.3) <sup>b</sup>
1.0	73	4	58(79.5) <sup>b</sup>	26(35.6) <sup>bc</sup>
2.0	69	16	36(52.2) <sup>c</sup>	15(21.7) <sup>c</sup>

\* Embryos : collected from superovulated mouse.

<sup>a,b,c</sup> P < 0.05.

**Table 3. Effect of Barodon-FX<sup>®</sup> in M16+0.4% PVP on *in vitro* development of 2- to 4-cell mouse embryos to blastocyst stages for 6 days**

Concentration of Barodon(%)	No. of embryos*		No.(%) of embryos developed to blastocyst	
	Cultured	Degenerated	Total	Hatching+hatched
0	77	1	66(85.7) <sup>a</sup>	25(32.5) <sup>b</sup>
0.25	75	0	70(93.3) <sup>a</sup>	41(54.7) <sup>a</sup>
0.5	79	0	68(86.1) <sup>a</sup>	18(22.9) <sup>b</sup>
1.0	77	4	56(72.7) <sup>b</sup>	1(13.0) <sup>c</sup>
2.0	72	72	0( 0 ) <sup>c</sup>	0( 0 ) <sup>c</sup>

\* Embryos : collected from superovulated mouse.

<sup>a,b,c</sup> P < 0.05.

서 세포증식이 무첨가보다 각각 24~41%와 17~22% 더 크게 향상되었다. 그러나 난구세포(CC)에서는 증식효과가 없었다. 또한 GC와 CC에서는 1%이상 첨가시 세포증식이 크게 억제되었다(Table 4).

### 3. 소 초기배의 배반포 발달율

0.5% Barodon 첨가시 상실배+배반포 발달율이 BOEC(50.0%)와 GC(63.6%)에서 모두 대조구(31.6%와 27.4%)보다 월등히 높았다(Table 5). 그러나 배반포 발달율은 BOEC에서는 0.5~1.0% 첨가, GC는 0.5% 첨가구에서 각각 다소 높았으나 대조구와 차이가 없었다. 한편 2% 첨가에서는 배반포 발달율이 크게 저하되지 않았다. 이는 생쥐에서 나

타난 것과는 다른 결과였다(Table 6).

## IV. 고 찰

생쥐 초기배 배양에서 BSA첨가시 0.25% Barodon의 효과가 없었으나 BAS대신 PVP 첨가에서는 0.25% Barodon에서 크게 부화 배반포 발달율이 향상되었다. 또한 BSA와 PVP 첨가에서 모두 2% Barodon 첨가에서 부화 배반포 발달율 크게 저하되었다.

초기배 발달에 BSA의 중요성이 이미 보고되어 왔는데(Kane, 1987) BSA에서보다 PVP에서 0.25% 첨가 때 배반포 발달율이 향상된 것은 BSA와 유사한 효과가 Barodon에 의해 나타난 결과로 사료

**Table 4. Proliferation of bovine somatic cells in TCM199 supplemented with different Barodon-FX<sup>®</sup> concentrations for 9 days**

Concentration of Barodon(%)	No.(%) of somatic cells*(10 <sup>4</sup> /ml)		
	BOEC	GC	CC
0	18.1±2.9(100) <sup>b**</sup>	31.7± 9.5(100) <sup>ab</sup>	25.5±9.6(100) <sup>a</sup>
0.25	22.5±6.9(124) <sup>ab</sup>	38.7±12.3(122) <sup>a</sup>	26.6±9.2(104) <sup>a</sup>
0.5	25.5±5.2(141) <sup>a</sup>	37.1± 7.4(117) <sup>ab</sup>	21.2±4.7( 83) <sup>ab</sup>
1.0	23.6±4.2(130) <sup>ab</sup>	27.1±10.2( 86) <sup>b</sup>	21.5±6.9( 84) <sup>ab</sup>
2.0	20.0±5.3(112) <sup>b</sup>	28.1±14.3( 89) <sup>b</sup>	19.2±4.4( 75) <sup>b</sup>

\*BOEC : bovine oviduct epithelial cells. \*\*Mean±SD.

GC : granulosa cells in ovarian follicle.

CC : cumulus cells in ovarian follicle.

<sup>a,b</sup> p < 0.05.

**Table 5. Effect of Barodon-FX<sup>®</sup> in BOEC co-culture system on *in vitro* development of IVM/IVF bovine embryos to morula(M)/blastocyst(BL) stages**

Concentration of Barodon(%)	No. of embryos* cultured	No.(%) of embryos developed to			
		8~16 cells	M	BL	M+BL
0	57	21	10	8(14.0) <sup>a</sup>	18(31.6) <sup>b</sup>
0.25	69	21	15	10(14.5) <sup>a</sup>	25(36.2) <sup>b</sup>
0.5	66	16	17	16(22.7) <sup>a</sup>	33(50.0) <sup>a</sup>
1.0	58	16	7	15(25.9) <sup>a</sup>	22(37.9) <sup>b</sup>
2.0	64	14	5	8(12.5) <sup>a</sup>	13(20.3) <sup>b</sup>

\* Embryos : 2 to 4-cell stages after *in vitro* fertilization.

<sup>a,b</sup> P < 0.05.

**Table 6. Effect of Barodon-FX<sup>®</sup> in GC co-culture system on *in vitro* development of IVM/IVF bovine embryos to morula(M)/blastocyst(BL) stages**

Concentration of Barodon(%)	No. of embryos* cultured	No.(%) of embryos developed to			
		8~16 cells	M	BL	M+BL
0	62	19	10	7(11.3) <sup>a</sup>	17(27.4) <sup>b</sup>
0.25	67	24	17	10(14.9) <sup>a</sup>	27(40.3) <sup>b</sup>
0.5	77	10	19	20(26.0) <sup>a</sup>	49(63.6) <sup>a</sup>
1.0	80	18	19	15(18.8) <sup>a</sup>	34(42.5) <sup>b</sup>
2.0	78	15	12	11(14.1) <sup>a</sup>	23(29.5) <sup>b</sup>

\* Embryos : 2 to 4-cell stages after *in vitro* fertilization.

<sup>a,b</sup> P < 0.05.

되었다. 또한 Ellis(1990)이 지적한 것처럼 체외배양 초기배가 체외배양조건에 매우 민감한 상태이지만 Barodon에 의해 크게 완화된 것으로 사료되었다.

그러나 BSA와 PVP에서 모두 1~2% Barodon은 유해한 수준이었고 배반포 발달이 크게 억제 또는 중지되었는데 그 원인은 본 연구에서 확인할 수는 없었다. 일반적으로 생쥐 초기배는 pH와 삼투압에 대한 적응범위(6.0~7.8과 200~354mOsm)가 상당히 높는데(Brinster, 1965) 본 배양액도 이 범위에 속했기 때문에 pH와 삼투압 이외의 다른 요인과 관련이 있을 것으로 생각되며 더욱 연구되어야 할 부분이다.

Barodon 첨가에 따른 체세포 증식율이 BOEC에서 현저히 높았으나 GC와 CC에서는 1% 이상 첨가시 증식율이 크게 저하되었던 결과에서 Barodon 효과가 세포에 따라 다른 것으로 사료되었다. 난소 세포에서 1~2% 첨가시 세포증식이 억제된 결과는 배양액의 pH, 삼투압 및 이온변화 증가에 기인된 세포증식의 억제가 상피세포보다 훨씬 컸던 것으로 사료되었다. Halliwell과 Getteridge(1999)도 세포내 이온균형에 대한 세포기능의 변화가 세포간에 차이가 크며 세포의 항산화 방어기능에도 조직과 세포간에 차이가 매우 큼을 지적한 바 있다. 항산화 성질이 높은 세포에서 Nagata 등(1996)은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 손상이 적다고 보고하였다. 한편 Chubatsu와 Meneghini(1993)는 햄스터 난소세포에는 Ag<sup>+</sup> 등 중금속이온을 가지며 -SH group이 높고 항산화제 성질을 가진 metallothionin 단백질이 많기 때문에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 손상에 대한 저항성이 높다고 하였다. 난소세포에서의 이러한 결과로 볼 때 본 연구의 GC와 CC에서 세포증식이 억제되었던 것은 Barodon 첨가농도와 밀접한 관계가 있었던 것으로 사료되었다.

한편 Barodon의 효과가 세포간에 차이를 나타낸 결과는 동물 초기배의 체외 배발달율을 높이기 위하여 이용되고 있는 공동배양 체세포의 기능촉진을 위해서 Barodon 첨가시 체세포의 선택도 주요 고려사항이 됨을 보여주었다. 또한 BOEC에서

더 좋았던 결과가 세포 자체의 항산화 기능과 Barodon간에 어떤 관계가 있는지에 대해서는 앞으로 더 연구가 이뤄져야 할 것이다.

소 초기배에서 상실배 이후로의 배발달율이 BOEC와 GC 체세포 공동배양조건에서 0.5% Barodon 첨가시 크게 향상되었고 한편 배반포 발달율에서는 모든 첨가 수준에서 대조구와 차이가 없는데 이는 0.5% Barodon이 초기배 체외배양에서 초기배의 발달중지현상을 극복하는데 다소 유리하게 작용한 것으로 사료되었다. 또한 1~2% Barodon의 조건에서 생쥐의 배반포 발달율이 크게 저하되었으며(Table 3과 4) BOEC의 세포증식율이 크게 증가되었던 것(Table 5)으로 보아 Barodon의 영향이 공동배양세포인 체세포에서 더 유리하게 작용하며 그 결과 높은 농도에 대한 불리한 조건이 이들 공동세포에 의해 다소 완화되었던 것으로 사료되었다.

가축 초기배의 발생을 위한 최적 pH의 범위가 아직 잘 알려져 있지 않지만 일반적으로 10% FCS 첨가 배양액의 pH와 삼투압이 7.1~7.4와 280~306mOsm (Bavister, 1987)인 것으로 보아 1~2% Barodon 첨가에 따른 pH와 삼투압의 상승이 배발달에 불리한 조건으로 작용했던 것으로 사료되었다.

한편 0.5% Barodon 첨가에서 배발달율이 증가된 원인의 하나로 Barodon의 항산화 기능이 일부 작용한 것으로 추측되었으며, 또한 원적외선 방사물이 물의 알칼리화, 비증증가 효과 및 세포의 기능활성화 작용(Inoue와 Kabaya, 1989 ; 丹羽 등, 1991 ; 남, 1997)과 관련이 있다고 보고된 점으로 보아 그러한 효과도 관여된 것으로 사료되었다. Park 등(1998)은 Barodon 급여 돼지에서 면역관련 세포의 기능증가 효과를 보고한 바 있다. Caannuno 등(1996)도 항산화제  $\beta$ -mercaptoethanol의 첨가로 배반포 발달율의 증가를 보고하였다. BOEC와 GC와의 공배양시 0.5% 첨가수준에서 유사한 결과를 얻었는데 이는 공배양 체세포간에 배발달율의 차이가 없었던 Goto 등(1992)의 결과와 같았다.

## V. 요약

생쥐 초기배의 배반포 발달율이 BSA첨가 배양액에 Barodon-FX<sup>®</sup> 첨가로 증가되지 않았으나 PVP 첨가 배양액에 0.25% 첨가에서는 부화배반포 발달율이 54.7%로 대조구(32.5%)보다 크게 향상되었다( $P < 0.05$ ). 1~2% Barodon 첨가는 배발달을 월등히 저하시켰다.

Barodon 첨가에 따른 체세포 증식율은 BOEC와 GC의 경우 0.25~0.5%에서 대조구보다 각각 24~40%와 17~22% 더 크게 증가되었다( $P < 0.05$ ). 그러나 GC와 CC에서는 1%이상 첨가시 세포증식이 크게 억제되었다( $P < 0.05$ ). Barodon의 효과는 체세포간에 큰 차이가 있었다.

소 초기배에서 상실배이상의 배발달율은 BOEC와 GC 공배양조건에서 Barodon 0.5% 첨가에서 대조구보다 크게 향상되었다( $P < 0.05$ ). 그러나 다른 처리수준에서는 배발달율이 대조구와 차이가 없었다.

결론적으로 Barodon의 세포증식효과는 세포종류에 따라 차이가 많았으며 0.5% 수준의 첨가는 소 초기배의 배반포발달율을 향상시킬 수 있었다.

## VI. 인용문헌

1. Bavister, B. D. 1987. Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. In : The mammalian Preimplantation Embryo (Bavister, B.D.ed.) Regulation of growth and differentiation *in vitro*. New York, Plenum Press. pp. 219~249.
2. Brinster, R. L. 1965. Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. I - the effects of osmolarity and hydrogen ion concentrations. J. Exp. Zool., 158:59~68.
3. Caamano, J. N., Ryoo, Z. Y., Thomas J. A. and Youngs, C. R. 1996.  $\beta$ -mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. Biol. Reprod., 55:1179-1184.
4. Chubatsu, L. S. and Meneghini, R. 1993. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. Biochem. J., 291:193-199.
5. Ellis, I. C. 1990. Free radicals in tissue culture : Part II. Sources of free radicals. Art to Sci., 9:1-2, 4-6.
6. Eyestone, W. H. and First, N. L. 1989. Co-culture of early embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fertil., 85:715-720.
7. Gardiner, C. S. and Reed, D. J. 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryos. Biol. Reprod., 51:1307-1314.
8. Goto, K., Iwai, N., Takuma T. and Nakanishi, Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. J. Anim. Sci., 70:1449-1453.
9. Halliwell, B and Gutteridge, J. M. C. 1999. Antioxidant defences. In : Free Radicals in Biology and Medicine(3rd ed.), Oxford Univ. Press. pp. 105-245.
10. Inoue, S. and Kabaya, M. 1989. Biological activities caused by far-infrared radiation. Int. J. Biometeorol., 33:145-150.
11. Kane, M. T. 1987. *in vitro* growth of preimplantation embryos. In : The Mammalian Preimplantation Embryo(Bavister, B.D. ed.). Regulation of growth and differentiation *in vitro*. New York. Plenum Press. pp. 193-217.
12. Lim, J. M. and Hansel, W. 1998. Improved development of *in vitro*-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell coculture system. Mol. Reprod. Dev., 50:45-53.
13. McLaughlin, K. J., McLean, D. M., Stevens, G., Ashman, R. A., Lewis, P. A., Bartsch, B. D. and Scamark, R. F. 1990. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic

- oviduct fecid medium. *Theriogenology*, 33:1191-1199.
14. Nagata, Y. et al. 1996. Reaction of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma : the role of peroxidase and LCAT. *Arch. Biochem. Biophys.*, 329:24-27.
  15. Nars-Esfahani, M. H., Aitken, J. R. and Johnson, M.H. 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* and *in vivo*. *Development*, 109:501-507.
  16. Noda, Y., Matsumoto H., Umaoka, Y., Tsumi, K., Kishi J. and Mori, T. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:356-360.
  17. Park, J. H., Woo, H. J., Rhee, J. C., Han, J. H., Chai, S. I., Yoo, B. W., Hohn, K. S. and Kim, K. Y. 1998. *Enhancement of host immune responses by addition of nonspecific immunostimulator(Barodon) in animal feed.* Seoul Univ. J. Vet. Sci. 23:37-46.
  18. Takahashi, M. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 49:228-232.
  19. 丹羽靱負, 小室俊夫. 1991. 遠赤外線放射体ブラチナ電磁波纖維ヒト白血球機能および過酸化脂質形成反應への影響. *炎症* 11:135-141.
  20. 남원우. 1997. 물, 생명과 건강의 과학, 지식산업사. 서울. pp. 1-312.  
(접수일자: 2001. 4. 2. / 채택일자: 2001. 4. 30.)