

## 항산화제와 Growth Factors 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

최영진 · 박춘근 · 정희태 · 김정익 · 박동현 · 장현용 · 양부근<sup>†</sup>

강원대학교 동물자원과학대학

### Effect of Antioxidants and Growth Factors on the Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Choi, Y. J., C. K. Park, H. T. Cheong, C. I. Kim, D. H. Park,  
H. Y. Jang and B. K. Yang<sup>†</sup>

Division of Animal Resource Science, College of Animal Resource Science, Kangwon National University

#### ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the effects of antioxidants and growth factors on early development of porcine follicular oocytes fertilized *in vitro*.

The embryos without cumulus cells were transferred into NCSU 23 medium and cultured for 5~6 days. The proportions of embryos developed to morula and blastocyst stages were significantly higher ( $P<0.05$ ) in medium with 1.0(21.1%) and 2.0mM(22.3%) NAC than in control (14.7%) and 0.5mM NAC (12.2%). When the embryos were cultured in medium with ebselen, the highest proportion(36.9%) of embryos developed to morula or blastocyst stages was obtained in medium with 10  $\mu$ M ebselen. Higher proportions of embryos were developed to morula and blastocyst stages during culture with 100  $\mu$ M than control, 50 and 200  $\mu$ M glutathione.

The EGF and PDGF were evaluated as growth factors supplemented to the culture medium for *in vitro* development of porcine embryos. The proportions of embryos developed to morular and blastocyst stages were significantly higher ( $P<0.05$ ) in medium with 100ng/ml EGF than control, 10 and 50ng/ml EGF. However, the proportions of embryos developed to morular and blastocyst stages were not significantly different among concentrations of PDGF.

In conclusions, these results indicate that NAC, ebselen and glutathione or EGF and PDGF can increase the proportion of embryos that develop beyond morula stage.

(Key words: NAC, Ebselen, Glutathione, EGF, PDGF, Porcine embryos)

#### I. 서론

대부분 포유동물의 체내 또는 체외수정란의 체

외배양은 일정한 발달단계까지 발달한 후 발육지  
연이나 정지가 되는 체외 발육억제현상(*in vitro* cell  
block)이 나타나기 때문에 정상적인 수정란의 확보  
에 많은 어려움이 있고, 산자 생산이 극히 제한되

이 논문은 2001년도 강원대학교 우당 학술진흥재단 연구비에 의하여 연구되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : Tel : 033-250-8623, E-mail : bkyang@kangwon.ac.kr

고 있는 실정이다. 돼지에서는 수정란의 체외 발육 억제현상이 4세포기에서 일어난다(Jarrell 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992).

체외 발육억제현상은 체내의 난관 또는 자궁에서 분비되는 알려지지 않은 인자와 난관과 자궁의 조건 및 세포 발육에 유해한 영향을 미치는 요인을 제거하지 못하기 때문에 발생되며, 이로 인하여 체외배양율이 저하되는 것으로 보고되고 있다(Bigger, 1987; Li 등, 1993; Riger 등, 1991).

이러한 체외 발육억제현상을 극복하거나, 체외 발육율을 증가시키기 위한 연구의 일환으로 단백질원의 첨가, 가스 농도, 각종 호르몬의 첨가 및 성장인자를 첨가하여 체외 배양율을 증가시키기 위한 연구가 많은 연구자들에 의해 시행되어 왔다. 그 중 체외배양시 배양액에 발생하는 것으로 생각되는 free radical을 제거하기 위하여 각종 항산화제의 첨가실험이 최근에 많이 시도되어 좋은 결과를 얻고 있다.

세포배양시 첨가되는 항산화제의 일종으로는 N-acetyl-L-cysteine(NAC),  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteamine, SOD, catalase 및 cysteine등이 있으며,  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteamine은 세포가 증식되는 동안 glutathione의 합성에 기질로서 작용하는 cysteine의 이용성을 증가시켜 세포내 glutathione의 감소를 막아주므로서 free radical로부터 체외수정란을 보호하는 항산화제 작용을 수행한다(Sagara 등, 1993; Tetsuro 등, 1981).

Epithelial growth factor(EGF)는 난포에서 sex steroid 합성 억제인자, 난포세포의 증식 촉진인자로 작용하며, 난자의 성숙을 통하여 난구세포의 확장에 관여하고, fibroblasts, keratinocytes, epithelial cells 등의 증식을 자극하는 것으로 알려져 있다(Carpenter와 Cohen, 1979).

Platelet derived growth factor(PDGF)는 소 난관 상피세포(Eriksen 등, 1993) 및 난관액(Gandolfi 등, 1991)에서 검출되며, 소의 체내유래난자에서 배반포단계를까지 PDGF 수용체의  $\alpha$ -subunit-mRNA의 발현이 확인되었다(Watson 등, 1992).

본 연구는 돼지 체외 수정란의 체외배양체계의 확립에 대한 기초 자료를 확립하기 위하여 돼지의

체외수정란의 체외발육시 체외발육율을 증진시키기 위하여 항산화제(NAC, ebselen, glutathione)와 성장인자(EGF, PDGF)등을 체외배양액에 첨가하여 돼지 체외수정란의 체외 발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채취

본 실험에 사용된 난포란은 성숙 모돈에서 적출한 난소를 도살 직후 100IU/ml의 penicillin G(Sigma)와 100  $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma)가 첨가된 생리식염수에 침지시켜 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 난소를 18 gauge의 주사바늘이 부착된 주사기를 이용하여 난포란을 채취하였다.

채취한 난포란은 Dubelcco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS, Gibco)에 0.1% Polyvinyl-alcohol (PVA, Sigma)이 첨가된 배양액(D-PBS-PVA)과 희석시켜 실험현미경하에서 난포란을 회수하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙과 체외수정

난포란의 체외성숙과 체외수정은 박 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 간략하게 요약하면, 난포란은 NCSU 23(North carolina state university 23) 배양액을 체외성숙용 기본배양액으로 하여 0.57mM의 cysteine, 10% 돼지난포액, 10 IU/ml eCG 및 10 IU/ml hCG 호르몬을 각각 첨가하여 성숙 배양액을 제조한 후, 100  $\mu$ l의 소적내에 15~20개의 미성숙 난포란을 넣어 22시간 1차 성숙배양을 실시하고, hCG와 eCG 호르몬이 첨가되지 않은 성숙배양액 소적내에서 22시간 동안 2차 체외성숙배양을 유도하였다. 체외성숙 배양액에 첨가된 난포액은 직경이 3~5mm인 액상난포에서 채취한 난포액을 -20 $^{\circ}$ C에서 사용 전까지 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

체외수정용 기본 배양액으로는 modified Tris Buffer Medium(mTBM)에 2mg/ml의 Bovine serum albumin(BSA, Sigma)를 첨가하여 실험에 사용하였다. 성숙난포란을 0.1%의 hyaluronidase(Sigma)

가 첨가된 성숙배양액 내에서 반복 pipetting 방법으로 난구세포의 일부를 제거한 후, 체외수정 배양액으로 세척하여 체외수정 소적(50  $\mu$ l)에 각각 15개의 성숙난포란을 옮겨 넣었다. 체외수정을 위한 정자의 준비는 0.5 ml의 동결정액(1 straw)을 37°C에서 용해시킨 후 1mg/ml의 BSA와 10  $\mu$ l/ml의 Antibiotic antimiotic용액(ABAM, Giboco)이 첨가된 D-PBS배양액과 혼합, 원심분리로 세척하여 정자의 농도가  $2.0 \times 10^6$  정자/ml가 되도록 조정하여 정자 부유액을 준비하였다. 준비된 정자 부유액 50  $\mu$ l을 미리 준비된 성숙 난포란이 옮겨진 체외수정 소적에 50  $\mu$ l을 삽입하여 체외수정을 실시하였다. 체외수정을 실시한 후 40~44시간 동안 체외 배양을 실시하여 생산된 2~8세포기의 체외 수정란을 실험에 사용하였다.

### 3. 체외수정란의 체외배양

체외수정후 생산된 2~8세포기 체외수정란만을 선별하여 체외배양액인 NCSU 23배양액에 일정량의 항산화제인 NAC, ebselen과 glutathione 첨가배양 및 성장인자인 EGF(Sigma)와 PDGF(R & D, U.S.A)를 첨가배양하여 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 1) 항산화제의 첨가배양

체외수정후 생산된 2~8세포기 체외수정란을 체외배양액인 NCSU 23 배양액에 0, 0.5, 1.0 및 2.0 mM의 NAC을 첨가배양, ebselen을 0, 5, 10 및 25  $\mu$ M을 첨가배양 및 glutathione 0, 25, 50 및 100  $\mu$ M을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>와 5% O<sub>2</sub> 및 38.5°C의 온도조건에서 6~7일간 체외 배양을 실시한 후 체외 발육 성적을 조사하였고, 일부의 배반포기 수정란은 형광염색법으로 세포수를 조사하였다.

#### 2) Growth factor의 첨가배양

체외수정후 생산된 2~8세포기 체외수정란을 0, 10, 50 및 100ng/ml의 EGF를 첨가배양과 0, 1, 5 및 10ng/ml의 PDGF를 첨가배양하여 상기방법과 동일한 조건으로 체외 배양을 실시한 후 체외발육 성적을 조사하였으며, 체외 배양후 생산된 일부의

배반포기 수정란은 형광염색법으로 세포수를 조사하였다.

### 4. 체외 수정란의 세포수 조사

체외수정란의 세포수 검사는 Long 등(1999)의 염색방법을 수정 보완하여 조사하였다. 간단하게 요약하면 체외수정란을 10%의 Triton X-100과 2%의 paraformaldehyde가 첨가된 D-PBS 배양액내에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 고습도 배양조건으로 한시간 동안 고정한 후 D-PBS로 2~3회 세척을 실시하였다.

20%의 glycerol, 2  $\mu$ g/ml의 hoechst 33342 (Sigma) 및 100  $\mu$ g/ml의 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane (DABCO, Sigma)가 첨가된 D-PBS액을 slide glass 위에 20  $\mu$ l의 소적을 만들어 수정란 2~3개를 넣은 후 cover glass로 덮고 매니큐어로 봉입하여 4~5분간 염색을 실시한 후 형광현미경(Zeiss, Germany)에서 배반포기 수정란의 세포수를 조사하였다.

### 5. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS package을 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 최소 유의차 검정(least significant different test; LSD test)을 실시하여 통계 처리하였다.

## III. 결 과

### 1. 항산화제 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 NCSU 23 배양액에 NAC, ebselen 및 glutathione을 첨가 배양하여 체외발육시킨 후 생산된 체외수정란의 체외발육 성적과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 1, Table 2 및 Table 3에 요약하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이 NCSU 23 배양액에 NAC을 0, 0.5, 1.0 및 2.0mM을 첨가, 체외배양을 실시한 결과 상실배까지 발육된 체외발육성적은 6.0%, 11.3%, 15.8% 및 17.9%로써 NAC 1.0mM과 2.0mM 첨가구가 대조구와 NAC 0.5mM을 첨가구보다 높은 성적을 나타냈으며, 상실배 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 14.7%, 12.2%, 21.1% 및 23.3

**Table 1. Effect of N-acetyl-L-cysteine on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos**

NAC (mM)	No. of oocytes examined	No. of embryos (%)				Morulae plus blastocysts(%)	Total cell no. of blastocysts
		2~4 cells	8~16 cells	Morulae	Blastocysts		
0	116	43(37.1)	56(48.3)	7( 6.0) <sup>b</sup>	10(8.6) <sup>a</sup>	17(14.7) <sup>ab</sup>	31.2±8.0
0.5	115	36(31.3)	65(56.5)	13(11.3) <sup>ab</sup>	1(0.9) <sup>b</sup>	14(12.2) <sup>b</sup>	34.0±0.0
1.0	114	34(29.8)	56(49.1)	18(15.8) <sup>a</sup>	6(5.3) <sup>ab</sup>	24(21.1) <sup>ab</sup>	26.7±6.5
2.0	112	29(25.9)	58(51.8)	20(17.9) <sup>a</sup>	5(4.5) <sup>ab</sup>	25(22.3) <sup>a</sup>	26.0±5.8

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within columns are significantly different, P<0.05.

%로서 2.0mM 첨가구가 여타구보다 다소 높은 성적을 나타냈다.

체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과, 배반포기 수정란의 세포수는 대조구, NAC 0.5mM, 1.0mM 및 2.0mM 첨가구에서 각각 31.2±8.0, 34.0±0.0, 26.7±6.5 및 26.0±5.8로서 NAC 1.0mM 처리구가 여타구보다 다소 많은 세포수를 나타냈으나, 통계적 유의성은 인정되지 않았다(P>0.05).

Table 2에서 보는 바와 같이 NCSU 23 배양액에 ebselen을 0, 5, 10 및 25 μM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 상실배기 이상 발육된 체외발육성은 각각 17.9%, 22.5%, 36.9% 및 10.8%로서 ebselen 10 μM 첨가구가 여타구보다 높은 성적은 얻었으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다 (P>0.05). 배반포기 수정란으로 발육된 체외발육율은 ebselen 10 μM를 첨가배양한 첨가구가 25 μM보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 얻었으며 (P<0.05), 10 μM첨가구가 대조구와 5 μM 첨가구보다

다소 높은 체외발육율을 나타냈지만 통계적 유의성은 인정되지 않았다(P>0.05).

체외수정란후 생산된 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과, 배반포기 수정란의 세포수는 대조구, ebselen 5 μM, 10 μM 및 25 μM 첨가구에서 각각 32.4±4.0, 33.9±6.5, 38.5±7.6 및 34.0±0.0로서 ebselen 10 μM 처리구에서 여타구보다 다소 많은 세포수를 나타냈으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(P>0.05).

NCSU 23 배양액에 glutathione을 0, 50, 100 및 200 μM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과(Table 3), 상실배기 이상 발육된 체외수정란의 체외 발육율은 대조구, glutathione 50 μM, 100 μM 및 200 μM 첨가구에서 각각 21.8%, 17.4%, 28.3% 및 15.8%로서 glutathione 100 μM을 첨가한 처리구가 여타구보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈지만 통계적 유의성은 인정되지 않았다(P>0.05).

체외수정 후 체외배양하여 생산된 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과, 배반포기 수정란의

**Table 2. Effect of ebselen on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos**

Ebselen (μM)	No. of oocytes examined	No. of embryos (%)				Morulae plus blastocysts (%)	Total cell no. of blastocysts
		2~4 cells	8~16 cells	Morulae	Blastocysts		
0	162	47(29.0)	86(53.1)	22(13.6)	7( 4.3) <sup>ab</sup>	29(17.9)	32.4±4.0
5	160	34(21.3)	90(56.3)	22(13.8)	14( 8.8) <sup>ab</sup>	36(22.5)	33.9±6.5
10	160	34(21.3)	67(41.9)	42(26.3)	17(10.6) <sup>a</sup>	59(36.9)	38.5±7.6
25	160	47(29.4)	83(51.9)	29(18.1)	1( 0.6) <sup>b</sup>	30(10.8)	34.0±0.0

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within columns are significantly different, P<0.05.

**Table 3. Effect of glutathione on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos**

Glutathione ( $\mu$ M)	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved (%)	No. of embryos (%)				Morulae plus blastocysts (%)	Total cell no. of blastocysts
			2~4cells	8~16cells	Morulae	Blastocysts		
0	94	55(58.5)	15(27.3)	28(50.9)	7(12.7)	5( 9.1) <sup>a</sup>	12(21.8)	30.7 <sup>a</sup> ±2.4
50	94	46(48.9)	14(30.4)	24(52.2)	8(17.4)	0( 0) <sup>b</sup>	8(17.4)	-
100	94	60(63.8)	13(21.7)	30(50.0)	8(13.3)	9(15.0) <sup>a</sup>	17(28.3)	38.3 <sup>b</sup> ±6.3
200	95	57(60.0)	17(29.8)	31(54.4)	9(15.8)	0( 0) <sup>b</sup>	9(15.8)	-

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within columns are significantly different, P<0.05.

세포수는 대조구와 glutathione 100  $\mu$ M 첨가구가 각각 30.7±2.4와 38.3±6.3으로서 glutathione 100  $\mu$ M 첨가구가 대조구보다 통계적으로 유의하게 많은 세포수를 나타냈다(P>0.05).

**2. Growth factors 첨가배양이 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과**

돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 NCSU 23 배양액에 EGF와 PDGF를 첨가하여 체외발육시킨 후 생산된 체외 수정란의 체외발육 성적과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 4와 Table 5에 요약하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이 NCSU 23 배양액에 성장인자인 EGF를 0, 10, 50 및 100ng/ml을 첨가

**Table 4. Effect of EGF on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryo**

EGF (ng/ml)	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos (%)				Morulae plus blastocysts (%)	Total cell no. of blastocysts
			2-4cells	8-16cells	Morulae	Blastocysts		
0	238	142(59.7)	41(28.9)	73(51.4)	24(16.9) <sup>b</sup>	4( 2.8) <sup>b</sup>	28(19.7) <sup>b</sup>	27.0±6.6
10	238	131(55.0)	32(24.4)	61(46.6)	31(23.7) <sup>ab</sup>	7( 5.3) <sup>b</sup>	38(29.0) <sup>b</sup>	25.3±8.1
50	238	158(66.4)	44(27.9)	72(45.6)	31(19.6) <sup>ab</sup>	11( 7.0) <sup>ab</sup>	42(26.6) <sup>b</sup>	29.0±8.5
100	238	151(63.5)	33(21.9)	57(37.8)	41(27.2) <sup>a</sup>	20(13.3) <sup>a</sup>	61(40.4) <sup>a</sup>	32.5±7.9

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within columns are significantly different, P<0.05.

**Table 5. Effect of PDGF on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos**

PDGF (ng/ml)	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos (%)				Morulae plus blastocysts (%)	Total cell no. of blastocysts
			2~4cells	8~16cells	Morulae	Blastocysts		
0	180	118( 65.6)	37(31.4)	55(46.6)	19(16.1)	7(5.9) <sup>ab</sup>	26(22.0) <sup>ab</sup>	28.4±5.1
1	180	125(69.44)	41(32.8)	57(45.6)	22(17.6)	5(4.0) <sup>ab</sup>	27(21.6) <sup>ab</sup>	25.2±5.8
5	180	118( 65.6)	28(23.7)	50(42.4)	30(25.4)	10(8.5) <sup>a</sup>	40(33.9) <sup>a</sup>	26.2±4.2
10	180	113( 62.8)	42(37.2)	53(46.9)	15(13.3)	3(2.7) <sup>b</sup>	18(15.9) <sup>b</sup>	27.3±3.1

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within columns are significantly different, P<0.05.

하여 체외배양한 결과, 수정란으로 발달된 분할율은 각각 59.7%(142/238), 55.0%(131/238), 66.4%(158/238) 및 63.5%(151/238)로서 EGF 50과 100ng/ml 첨가구가 다소 높은 성적을 나타냈다. 한편 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육율은 대조구 10, 50 및 100ng/ml EGF 첨가구에서 각각 19.7%, 29.0%, 26.6% 및 40.4%로써 EGF 100ng/ml 첨가구가 여타구보다 통계적으로 유의하게 높은 체외발육율을 나타냈다.

체외수정 후 생산된 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과, 배반포기 수정란의 세포수는 대조구, EGF 10ng, 50ng 및 100ng/ml을 처리한 구에서 각각 27.0±6.6, 25.3±8.1, 29.0±8.5 및 32.5±7.9을 나타내어 EGF 100ng/ml 처리구가 대조구보다 다소 많은 세포수를 나타냈으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(P>0.05).

Table 5에서 보는 바와 같이 NCSU 23 배양액에 성장인자인 PDGF을 0, 1, 5 및 10ng/ml을 첨가하여 체외 배양시킨 결과, PDGF 5ng/ml 첨가구가 상실배, 배반포기까지 발육된 체외발육율이 여타구보다 다소 높았으며, 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육율은 각각 22.0%, 21.6%, 33.9% 및 15.9%로써 PDGF 5ng/ml을 첨가구가 10ng/ml 첨가구보다 통계적으로 유의하게 높은 체외발육율을 나타냈으며(P<0.05), PDGF 5ng/ml 처리구가 대조구와 PDGF 1ng/ml 처리구보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈지만 통계적 유의성은 인정되지 않았다(P>0.05).

체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과, 배반포기 수정란의 세포수는 대조구, PDGF 1ng, 5ng 및 10ng/ml을 첨가한 구에서 각각 28.4±5.1, 25.2±5.8, 26.2±4.2 및 27.3±3.1로 처리구간에 배반포기 수정란의 세포수는 커다란 차이가 인정되지 않았다(P>0.05).

#### IV. 고 찰

Free radical로부터 세포를 보호하는 항산화제는 생체에서 free radical을 사전에 막는 system I 과 이미 생성된 free radical을 포착하여 제거하는 sys-

tem II로 나누어지며, system I에는 catalase, glutathione peroxidase, lactoferrin 및 transferrin 등이 있으며, system II에는 superoxide dismutase, reduced glutathione, ascorbate, vitamin C 및 vitamin E 등이 존재한다(Fridovich, 1983). 세포의 체외배양시 세포내 독성물질로 작용하는 과산화물(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)은 항산화 물질에 의해 제거되는데, 체내에서와는 달리 이와 같은 항산화제가 배양액 내에 존재하지 않을 경우 세포의 성장을 억제한다(Murray 등, 1990).

Lee 등(2000)은 돼지의 원시생식세포의 체외 배양시 항산화제로서 2mM NAC의 첨가는 세포괴사 현상을 억제시키고, 세포성장에 유의한 영향을 미쳐 세포의 생존율을 증진시킨 결과를 보고하였다. 본 실험의 결과, 돼지 2~8세포기 체외수정란을 NCSU 23 배양액에 NAC을 0, 0.5, 1.0 및 2.0mM을 첨가 체외배양한 처리구에서 상실배까지 발육된 체외발육성적은 6.0%, 11.3%, 15.8% 및 17.9%로써 NAC 첨가구가 대조구보다 높은 성적을 얻어 Lee 등(2000)의 결과와 비슷한 경향을 나타냈다. 본 실험의 결과로 볼 때 체외배양액에 NAC의 첨가는 배양액내에 야기되는 free radical을 제거시켜 돼지 체외수정란의 체외발육율을 증가시키는 것으로 나타나, NAC는 돼지 체외수정란의 체외배양시 체외발육율을 증가시킬 수 있는 항산화제로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Ebselen을 NCSU 23 배양액에 0, 5, 10 및 25 μM을 첨가 체외배양한 처리구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육성적은 각각 17.9%, 22.5%, 36.9% 및 10.8%로서 ebselen 10 μM 첨가구가 여타구보다 다소 높은 성적은 얻었으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다(P>0.05). 본 실험의 결과로 볼 때, Se이 함유된 ebselen 첨가배양은 돼지 체외수정란의 체외발육을 증진시켜, 돼지 체외수정란의 발육성적에 유의한 효과를 미치는 항산화제로 작용하는 것으로 입증되었다.

포유동물의 세포내 존재하는 glutathione은 아미노산의 수송, 단백질의 합성과 DNA의 deoxyribonucleotide 전구물질 합성에 관여하며, free radical과 반응산소화합물에 대한 세포의 보호작용 등 많은 생물학적 기작에 있어 중요한 역할을 수행하

고 있으며, 체외배양액에 glutathione 첨가는 oxidative stress에 의해 일어나는 발육억제 현상으로부터 수정란을 보호한다(Takahashi와 First, 1992). 본 실험에서는, glutathione을 0, 50, 100 및 200  $\mu\text{M}$ 을 첨가 체외배양한 결과, 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육율은 각각 21.8%, 17.4%, 28.3% 및 15.8%로써 glutathione 100  $\mu\text{M}$  첨가구가 여타구보다 다소 높은 체외발육을 나타냈지만 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ ).

난포 내에 존재하는 과립막 세포는 체외배양시 EGF와 FGF의 작용으로 과립막 세포의 증식이 촉진된다. 또한 체외수정란은 외래성장인자가 부족한 배양액에서도 발달될 수 있으나, 총세포수, 세포 내 생화학적 구성, 이식 후 생존성 등에 있어서 체내수정란에 비하여 질이 떨어지며, 특정성장인자가 배양액에 존재해야만 적정하게 발달된다는 보고가 있다(Kane 등, 1992).

본 실험의 결과는 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 NCSU23 배양액에 성장인자인 EGF를 0, 10, 50 및 100ng/ml을 첨가하여 체외 배양된 처리구에서 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육율은 각각 19.7%, 29.0%, 26.6% 및 40.4%로 EGF 100ng/ml 첨가구가 여타구보다 통계적으로 유의하게 높은 체외발육율을 나타내( $P<0.05$ ), Larson 등(1992)과 Thibodeaux 등(1993)이 소 체외수정란의 체외배양액에 EGF의 첨가가 체외 발육율을 증진시킨다고 보고한 결과와 본 실험의 결과가 일치하는 경향을 보였다.

포유동물 수정란의 체외발육에 관한 PDGF의 효과에 대해서 Eckert와 Niemann(1996)과 Yang 등(1993)은 체외배양액에 PDGF 첨가는 소 수정란의 체외발육을 증가시킨다고 하였으나, Larson 등(1992)은 insulin-like-growth factor(IGF)-1, transforming growth factor(TGF)- $\beta$  및 bFGF와 함께 첨가된 PDGF는 오히려 소 체외수정란의 16세포기 이상의 발육을 감소시킨다고 보고하였다. NCSU23 배양액에 성장인자인 PDGF를 0, 1, 5 및 10ng/ml을 첨가배양된 처리구에서 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육율은 각각 22.0%, 21.6%, 33.9% 및 15.9%로 PDGF 5ng/ml 첨가구가 여타구보다

높은 체외발육율을 나타냈다( $P>0.05$ ). 본 실험의 결과는 Eckert와 Niemann(1996)과 Yang 등(1993)의 결과와 유사한 결과를 나타내, 체외배양액에 PDGF 첨가는 돼지 체외수정란의 체외발육율을 증가시키는 것으로 나타났다.

## V. 요약

본 연구는 돼지의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 생산된 체외수정란을 NCSU23 체외배양액에 항산화제(NAC, ebselen 및 glutathione)와 성장인자(EGF와 PDGF)의 첨가가 돼지 체외수정란의 체외 발육에 미치는 영향을 검토하였다.

NAC을 0, 0.5, 1.0 및 2.0mM 첨가하여 체외배양한 결과, 상실배기 이상 발육된 체외발육성적은 1.0mM과 2.0mM 첨가구가 여타구보다 높은 체외발육성적을 나타냈다. 한편, ebselen을 0, 5, 10 및 25  $\mu\text{M}$ 을 첨가하여 배양한 경우 상실배 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 17.9, 22.5, 36.9 및 10.8%로서 ebselen 10  $\mu\text{M}$  첨가구가 여타구에 비해 다소 높은 체외발육성적을 얻었으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다( $P>0.05$ ). 또한 glutathione을 0, 50, 100 및 200  $\mu\text{M}$  첨가시 상실배기 이상 발육된 체외발육성적은 각각 21.8, 17.4, 28.3 및 15.8%로서 100  $\mu\text{M}$  처리구가 여타구보다 다소 높은 체외발육성적을 얻었으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다( $P>0.05$ ).

돼지 체외수정란의 체외배양시 체외배양액에 growth factor의 첨가배양이 돼지수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토한 결과, NCSU 23배양액에 EGF를 0, 10, 50 및 100ng/ml 첨가시 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 19.7, 29.0, 26.6 및 40.4%로서 EGF 100ng/ml 처리구가 여타구보다 통계적으로 유의하게 높은 체외발육 성적을 나타냈으며( $P<0.05$ ), PDGF를 0, 1, 5 및 10ng/ml 첨가하여 배양한 경우 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 22.0, 21.6, 33.9 및 15.9%로서 PDGF 5ng/ml 처리구가 여타구에 비해 높은 체외발육성적을 얻었다.

본 실험에서 체외수정후 생산된 배반포기 수정

란의 세포수는 처리구간 커다란 차이는 인정되지 않았다.

## VI. 인용문헌

1. Bigger, J. D. 1987. Pioneering mammalian embryo culture. In : The mamalian preimplantation embryo. Bavister B. C(ed), : Plenum press New York : 1-22.
2. Carpenter, G and Cohen, S. 1979. Epidermal growth factor. Annu. Rev. Biochem., 48:193-216.
3. Ding, J. and Foxcroft, G. R. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. Mol. Reprod. Dev., 39:30-40.
4. Eckert, J. and Niemann, H. 1996. Effects of platelet-derived growth factor(PDGF) on the *in vitro* production of bovine embryos in protein-free media. Theriogenology, 46:307-320.
5. Eriksen, T., Terkelsen, O., Hyttrel, P., Mollgard, K. and Greve, T. 1993. Regional morphology and localization of PDGF in bovine oviduct epithelium. Theriogenology, 39:15(abstr.).
6. Fridovich, I. 1983. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. Photobiol., 28:733-741.
7. Gandolfi, F., Brevini, T. A., Modina, S. and Lauria, A. 1991. Detection and characterization of a growth factor in bovine oviduct secretions. J. Reprod. Fertil., 7:6(abstr.).
8. Jarrell, V. L., Day, B. N. and Printher, R. S. 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *sus scrofa* : quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. Biol. Reprod., 44:62-68.
9. Kane, M. T., Carney, E. W. and Ellington, J. E. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. Theriogenology, 38:297-313.
10. Larson, R. C., Ignatz, G. G. and Currie, W. B. 1992. Platelet derived growth factor stimulates development of bovine embryos during the forth cell cycle. Development, 115:821-826.
11. Lee, Chang-Kyu., Weaks. R. L., Johnson. G. A., Bazer, F. B. and Piedrahita, J. A. 2000. Effects of protease inhibitors and antioxidant on *in vitro* survival of porcine primordial germ cell. Biol. Reprod., 63:887-897.
12. Li, J., Foote, R. H. and Simkin, M. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. Biol. Reprod., 48:33-37.
13. Long, C. R., Dovrinsky, J. R. and Johnson, L. A. 1999. *In vitro* production of pig embryos : comparisons of culture media and boars. Theriogenology, 51:1375-1390.
14. May, J. V., Frost, J. P. and Schomberg, D. W. 1988. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell DAN synthesis and cell proliferation. Endocrinology, 123:168-179.
15. Mayes, P. A. 1990. Lipid peroxidation is a source of free radicals *in vivo*. Murray, R. K. et al.(eds.) In : Harper's Biochem., 142-143.
16. Riger, D., Loskutoff, N. M. and Betteridge, K. J. 1991. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro* J. Reprod. Fertil., 95:585-595.
17. Rose, R., Raines, E. W. and Bowen-Pope, D. F. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. Cell, 46:155-169.
18. Sagara, J., Miura, K. and Bannai, S. 1993. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. J. Neurochem., 61:1667-1671.
19. Schoenbeck, R. A., Peter. M. S., Rickords. L.



- F., Stumpf, T. T. and Prather, R. S. 1992. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryo. *Biol. Reprod.*, 47:1118-1125.
20. Takahashi, Y. and First, N. L. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos : influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.
21. Tetsuro, I., Bannai, S. and Sugita, Y. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by  $\beta$ -mercaptoethanol *in vitro*. *J. Biol. Chemistry*, 256(23):12387-12392.
22. Thibodeaux, J. K., Del Vecchio, R. P. and Hansel, W. 1993. The role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 98:61-66.
23. Watson A. J., Hogan, A., Hahhel, K. E. and Wiemer, G. A. 1992. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:87-95.
24. Yang, B. K., Yang, X. and Foote, R. H. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 40:521-530.
25. 박기은, 박춘근, 김정익, 정희태, 박동현, 양부근. 2001. Nitric oxide 화합물 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는효과. *한국가축번식학회지*. 25:63-69.  
(접수일자: 2002. 4. 7. / 채택일자: 2002. 4. 30.)