

Cysteamine의 첨가배양이 돼지 난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

이 경 본 · 한 만 희[†]

충남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

Effect of Cysteamine on *In Vitro* Maturation of Porcine Oocytes and Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Lee, K. B. and M. H. Han[†]

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

ABSTRACT

The present study was carried out to examine the effect of cysteamine *in vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes and development of porcine IVM/IVF Embryos.

The results were summarized as follows :

1. The rates of nuclear maturation, penetrated oocytes, pronuclear formation, polyspermic oocytes and mean numbers of the penetrated sperm were not different in NCSU23 maturation medium with 0, 25, 50 and 100 μ M cysteamine ($P>0.05$).
2. The rates of blastocyst formation at day 7 after *in vitro* fertilization in 0, 25, 50 and 100 μ M cysteamine were 17.9 ± 6.1 , 17.4 ± 6.3 , 24.2 ± 1.9 and $16.9\pm 2.0\%$, respectively. And the total cells were 30.7 ± 2.4 , 34.9 ± 2.8 , 39.6 ± 2.3 and 36.8 ± 3.6 , respectively. Fifty μ M cysteamine group was significantly higher than those of any other treatment groups ($P<0.05$).
3. The ratios of ICM/total cells in 20~40% category were 20.5, 41.6, 19.5 and 31.8%, respectively. Twenty five μ M cysteamine group was higher than those of other groups.
4. The rates of blastocyst formation at day 7 in the NCSU-23 culture medium of porcine IVF-produced embryos with 0, 25, 50, and 100 μ M cysteamine were 16.0 ± 0.2 , 13.6 ± 1.7 , 25.0 ± 0.8 and $15.7\pm 4.5\%$, respectively. And the total cells were 27.0 ± 3.7 , 36.1 ± 4.8 , 34.0 ± 3.8 and 25.2 ± 4.4 , respectively. Fifty μ M cysteamine group was significantly higher than those of any other treatment groups ($P<0.05$).
5. The ratios of ICM/total cells in 20~40% category were 53.8, 30.0, 16.6 and 11.1%, respectively. The addition groups of cysteamine were lower than those of control group.

In conclusion, these results suggested that the addition of 50 μ M cysteamine in the IVM medium and 25~50 μ M cysteamine in IVC medium were effective on the blastocyst formation

[†] Corresponding author : Division of Animal Science & Resources, College of Agriculture Life & Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, E-mail: hanmh99@hanmail.net

and total cells of blastocysts.

(Key words : Porcine, Oocytes, Embryo, IVM, IVF, Cysteamine)

I. 서론

최근 가축번식학 분야에서는 난포란을 이용한 체외수정란의 생산, 수정란의 성관별, 형질전환동물의 작출, 핵치환 등의 기법을 통한 복제동물의 작출, 인공장기 생산을 위한 동물의 작출 및 배아주세포의 확립 등의 각종 첨단 생명공학적인 연구가 활발히 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 이용하고자 하는 실험이 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 Edwards(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양하므로써 제2성숙분열 중기(metaphase-II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래, Motlik과 Fulka(1974)가 체외성숙과 체외수정을 최초로 시도하였고, Iritani 등(1978)이 체외수정을 처음으로 성공하였고, Cheng 등(1986)에 의하여 성공적인 체외성숙 및 수정에 대한 실험법이 제시되었으며, Mattioli 등(1989)이 최초로 산자를 보고하였다.

그러나 돼지 난포란의 체외배양에 관한 연구는 타가축에 비하여 핵성숙과 세포질성숙을 포함한 난포란의 체외성숙이 불완전하며, 체외수정시 높은 다정자침입률과 불완전한 응성전핵형성 등으로 인한 수정률의 저하, 초기배 발달시 4-세포기에서 발달이 지연되거나 정지되는 체외발육능정지현상(*in vitro cell block*)을 초래하는 등 다른 축종보다

양질의 수정란을 생산하는 것이 어려운 것으로 보고되었다.

한편, Johnson과 Nasr-Esfahani(1993)는 이러한 불완전한 체외배양조건은 필수적인 조건이 갖추어지지 않았거나, 부적합한 조건 및 불필요한 것들이 존재하기 때문이라고 설명하고, 그 주요한 원인으로서는 첫째, 난포란의 체외성숙시 세포내 산화환원에 관여하는 glutathione(GSH)의 합성이 미비하고 체외수정란의 초기배 발달시 체내조건보다 높은 산소조건에 노출됨으로서 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 발생되며, 이들 유리산소기들은 'oxidative stress'를 초래하여 미토콘드리아의 호흡작용억제, 세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA·RNA의 손상을 초래하는 등 난포란의 성숙 및 체외발달시에 중요한 저해요인으로 작용한다고 보고하였다. 이와 같이 난세포질내 GSH의 합성과 체외배양조건하에서 발생하는 유리산소기를 제거하여 난포란을 이용한 체외배양 체계를 개선시키고자 하는 연구의 일환으로 최근 저분자황화합물의 일종인 cysteamine(β -mercaptoethanolamine, C_2H_5NS)이 주목받고 있다.

이에 관한 연구보고로서는 lymphocytes(Franger 등, 1970)와 embryonic carcinoma cells(Oshima, 1978; Rizzino와 Sato, 1978) 등의 세포활력(cell viability)을 증가시키고, 세포반응(cell reactions)을 촉진시킨다는 보고가 있었고, 난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하고자 하는 연구에 있어서는 헵스터(Kito와 Bavister, 1997), 소(Takahashi 등, 1993; Matos 등, 1995, 1996; 양 등, 1997; Yamauchi와 Nagai, 1999; Bing 등, 2000; Gaspanini 등, 2000) 및 돼지(Gruppen 등, 1995; Bing 등, 2001) 등에서 수행되어 왔다. 그러나 돼지 난포란을 이용한 체외성숙과 배발달에 cysteamine이 미치는 영향에 관한 연구는 보고자에 따라 서로 다른 결과들을 제시하고 있고, 그 논지도 일치하지 않아서 이에 대한 종합적인 연구가 절실히 필요한 실정이다.

이에 본 연구는 돼지 미성숙난포란의 체외성숙

과 체외수정된 수정란의 배발달에 미치는 cysteamine의 영향을 구명하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경산돈(체중 120 kg내외)으로부터 적출하여 75 µg/ml penicillin G와 50 µg/ml streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 멸균생리식염수로 2회 세척한 후 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고 재차 신선 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 100ml 비이커에 넣어 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10ml 주사기로 직경이 2~5mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡인하여 15ml 원심분리관에 옮겨 38°C로 조정된 정온대에 10분간 정치, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 87×15mm 페트리접시에 넣고 1mg/ml PVA가 첨가된 TL-Hepes와 희석하여 실체현미경하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질의 균일한 난포란만을 선별하여 회수한 후, 체외성숙에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

본 연구에 이용되는 시약은 대부분 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 North Carolina State University(NCSU)-23(Petters와 Wells, 1993)을 기본배양액으로 하여 10% 돼지난포액, 10IU/ml PMSG, 10IU/ml hCG와 10ng/ml의 EGF를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6mm 이상 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 3,000 rpm, -4°C의 저온하에서 30분간 원심분리하고, 0.2 µm 필터로 여과·멸균한 후, -20°C 냉동고에 냉동보관하여 사용직전 용해하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well당 500 µl의 난자 성숙용 NCSU-23

배양액을 넣어 전배양을 실시하였다. 회수한 양질의 미성숙난자는 TL-Hepes 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 미성숙난자는 각 well당 40~50개씩 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기에서 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고, 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에서 22시간 추가배양하여 총 44시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

1) 난포란의 준비

체외수정용 배양액은 mTBM(Abeydeera와 Day, 1997)을 기본배양액으로 2.5mM caffeine (Sigma, USA)과 0.1% BSA(A7888, Sigma, USA)가 함유된 mTBM용액을 사용하였고(Abeydeera 등, 1997), 정액의 세정액으로는 DPBS에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU-23 배양액에 넣어 연속적인 피펫팅으로 난구세포를 제거하고, 2.5mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 용액으로 3회 세정하였다. 세정 후 미리 48시간 전배양을 실시한 90 µl 수정용배양액 소적에 30~40개의 성숙난자를 넣고 매정시까지 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 수정능획득

정액은 인공수정용 액상정액으로 사용직전까지 17°C 항온고에서 최대 4일간 보존하여 사용하였다. 보존된 정액은 사용직전에 정액세정액(DPBS)과 함께 1 : 1 비율로 15ml 튜브에 넣고 450g에서 3분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하는 세정과정을 3회 실시하였다. 마지막으로 하단에 남은 정자 침전물에 정자 세정용배양액을 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기에서 10분간 정치하였다. 운동성을 가진 부유된 정자들을 회수하여 450g에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 체외수정용 배양액으로 재차 희석하였다. 희석된 정자는 성숙난자가 들어 있는 소적에 최종농도가 1.3×10^5 sperm/ml이 되도록 각각 10

μ 씩 주입한 후 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기에서 5~6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

3) 체외수정의 판정

각각의 처리구별 5~6시간 동안 체외수정용 배양액에서 정자와 수정을 유기한 후, 피펫팅 및 배발달배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거하였다. 그리고 배발달 배양액에 옮겨 추가로 배양한 다음, 수정후 10~12시간에 1-세포기의 수정란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하여 수정 여부를 판단하였다. 염색방법을 요약하면 0.3% hyaluronidase(Sigma, USA)용액에 성숙이 유기된 난자를 옮겨 1분간 vortexing을 통하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 1% BSA가 함유된 TL-Hepes로 3회 세척하였다. 그리고 slide glass위에 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 검경하여 정자의 침입, 자·웅전핵형성 등의 여부를 확인하였다.

4. 체외수정된 난포란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양은 0.4% BSA(A0281, Sigma)가 함유된 NCSU-23을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 피펫팅 및 배발달배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거한 후, 각각의 처리구별로 4-well dish(Nunc, Denmark)에 500 μ l/well의 배발달 배양액을 넣고 well당 40~50개의 수정란을 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기 내에서 각각 배양하여 체외배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할률을 조사하였고, 6일

및 7일째 배반포발달률을 조사하였다. 이상과 같은 모든 실험은 37 °C로 조정된 현미경가온판(Tokai Hit, Japan)위에서 실시하였다.

5. 배반포의 이중형광염색

체외수정을 실시하여 생산한 돼지 수정란은 내부세포피(inner cell mass, ICM)세포와 영양배엽(trophectoderm, TE)세포를 구별하기 위해서 Machaty 등(1998)의 이중형광염색방법을 사용하였다. 간단히 요약하면, 수정란의 투명대를 0.5% pronase에 처리하여 용해시킨 후, TL-Hepes-PVA 배양액에서 3회 세척하였다. 이들 수정란은 rabbit anti-pig whole serum이 1 : 5로 희석된 TL-Hepes 용액에서 1시간 처리한 후, TL-Hepes-PVA 용액으로 5분간 3회 세척하였으며, 10 μ g/ml Hoechst 33342와 10ug/ml propidium iodide(1 : 1)이 함유된 Guinea pig complement가 함유된 TL-Hepes(1 : 10)-PVA에서 1시간 처리하였다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란은 slide glass위에 3 μ l mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 수정란을 투여한 후, cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경하(200×)에서 세포수를 조사하였다.

6. 실험 구성

Cysteamine의 첨가배양이 돼지 미성숙난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 규명하기 위하여 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 10%의 난포액과 0.9mM의 cysteine을 첨가하고 cysteamine을 각각 0, 25, 50 및 100 μ M을 첨가하여 체외성숙에 미치는 영향을 핵성숙률, 자웅전핵형성률 및 배발달에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, cysteamine이 초기배발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 성숙을 유기한 후, 체외수정용 배양액인 mTBM배양액에 정자와 같이 6시간동안 공배양을 통하여 체외수정을 유도한 후, 생산된 수정란을 cysteamine이 각각 0, 25, 50 및 100 μ M이 첨가된 배발달배양액에 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기에 배양하면서 배양 2일후에 난할률을, 6일 및 7일에 배발달률 및 이중형광염색을 통한 ICM세포 및 TE세포수

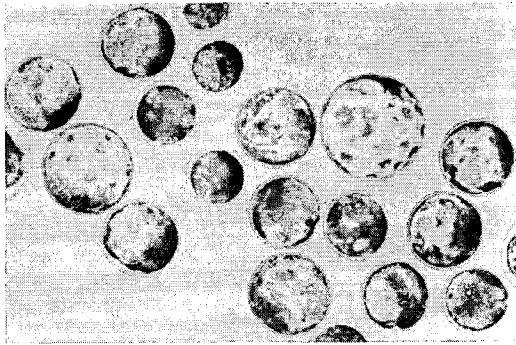


Fig. 1. IVM/IVF-derived porcine blastocysts at day 7 (200×).

를 조사하였다.

7. 통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 4회 이상 반복실험을 실시하였으며, 얻어진 모든 실험결과와 통계처리는 SAS/STAT를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후, Duncan's 다중검정(DMRT)에 의하여 처리구간 유의성을 검정하였으며, $P < 0.05$ 이하의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

III. 결과 및 고찰

돼지 난포란의 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 cysteamine을 각각 0, 25, 50 및 100 μM 첨가하여 44시간동안 성숙을 유기한 다음, 수정배양액인 mTBM에 6시간 동안 정자와 함께 체외수정을

실시하여 핵성숙률, 정자침투율, 자웅전핵형성률, 다정자침투율 및 평균정자침투율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Cysteamine을 첨가하지 않은 대조구와 처리구간 모든 항목에서 유의성이 인정되지 않는 결과를 나타냈다. 이와 같은 결과는 Yamauchi와 Nagai(1999)가 돼지의 미성숙난포란을 난구세포를 제거하고 TCM-199배양액에 cysteamine을 0, 25, 50, 150, 250, 375 및 500 μM 첨가하여 성숙을 유기하였을 때, 핵성숙률은 처리구(60~70%)간 유의성이 인정되지 않았고, 오히려 375~500 μM 의 과량 첨가시는 핵성숙을 억제한다는 보고와 Matos 등(1995)이 소의 미성숙난포란을 TCM-199에 cysteamine을 각각 0, 25, 50 및 100 μM 첨가하였을 때, 체외성숙률은 유의성이 인정되지 않았다는 보고 등과는 일치하는 결과였다. 그러나, Yamauchi와 Nagai(1999)가 옹성전핵형성률이 cysteamine처리구(80.3 \pm 3.0%)가 무처리구(16.4 \pm 0.5%)보다 유의적($P < 0.05$)으로 높았다는 보고와 Hamster의 미성숙난자를 체외성숙시 200 μM 의 cysteamine첨가구에서 정자침투율과 MPN형성율에 있어서 유의적으로 높은 성적을 보고한 내용과는 일치하지 않는 결과이다.

본 실험에서는 체외성숙 기본배양액을 0.9mM cysteine이 첨가된 NCSU-23 배양액을 실험에 사용하였다. 따라서, 일정량의 cysteine을 돼지 난포란의 체외성숙시 첨가하였을 때 GSH 합성량을 증가시켜 MPN 형성을 증가시킨다는 보고(Yoshida 등, 1993; Wang 등, 1997; Abeydeera 등, 2000)를 통하여 볼 때, cysteine과 cysteamine의 병용첨가로 인

Table 1. Effects of different cysteamine concentrations during IVM on *in vitro* fertilization of porcine follicular oocytes

Concentration of cysteamine (μM)	No. of examined oocytes	% (mean \pm SE) of oocytes			No.(%) of polyspermic oocytes (Mean \pm SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean \pm SE)
		Matured	Penetrated	With male and female pronuclei		
0	51	96.0 \pm 3.9 (49)	71.2 \pm 9.6 (36)	91.2 \pm 1.3 (43)	61.4 \pm 8.7 (23)	1.9 \pm 0.2
25	57	98.1 \pm 1.8 (56)	74.2 \pm 2.1 (42)	84.6 \pm 15.3 (36)	58.3 \pm 9.1 (24)	1.5 \pm 8.9
50	60	98.2 \pm 1.7 (59)	67.1 \pm 8.9 (40)	97.7 \pm 2.2 (39)	55.3 \pm 9.8 (23)	2.1 \pm 0.2
100	61	98.5 \pm 1.4 (60)	60.5 \pm 5.8 (36)	97.2 \pm 0.1 (35)	69.7 \pm 4.1 (25)	1.9 \pm 0.1

하여 정자침투율, MPN형성률 등에서 대조구와 첨가구간 유의성이 없이 높은 결과를 나타낸 것으로 판단된다.

NCSU-23을 기본배양액으로 cysteamine을 각각 0, 25, 50 및 100 μ M을 첨가하여 성숙·수정 시킨 다음, 배발달배양액인 0.4mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23에 7일간 배발달을 유기한 결과는 Table 2, 3 및 4와 같다.

수정후 48시간째 난할률은 처리구간 65.2 ± 11.8

%에서 $73.2 \pm 16.6\%$ 로서 유의성이 인정되지 않았으나, 배반포기 도달률에 있어서는 배발달 6일째 각각 15.9 ± 6.0 , 15.9 ± 5.9 , $22.0 \pm 1.4\%$ 및 $16.1 \pm 1.4\%$, 배발달 7일째 각각 17.9 ± 6.1 , 17.4 ± 6.3 , 24.2 ± 1.9 및 $16.9 \pm 2.0\%$ 로서 50 μ M 첨가구가 유의적($P < 0.05$)으로 높은 배반포 도달률을 나타냈다. 또한, 배발달 7일째의 배반포기 수정란의 내부세포괴(inner cell mass, ICM)세포, 영양배엽(trophctoderm, TE)세포 및 총세포수를 조사한 결과, 내부

Table 2. Effects of different cysteamine concentrations during IVM on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Concentration of cysteamine (μ M)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes cleaved	% (mean \pm SE) of embryos developing to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	240	73.2 \pm 16.6 (180)	15.9 \pm 6.0 (39) ^b	17.9 \pm 6.1 (44) ^b
25	223	70.6 \pm 14.7 (158)	15.9 \pm 5.9 (39) ^b	17.4 \pm 6.3 (43) ^b
50	256	68.8 \pm 12.0 (179)	22.0 \pm 1.4 (55) ^a	24.2 \pm 1.9 (62) ^a
100	204	65.2 \pm 11.8 (137)	16.1 \pm 1.4 (33) ^b	16.9 \pm 2.0 (34) ^b

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly ($P < 0.05$).

Table 3. Effects of different cysteamine concentrations during IVM on mean cell number of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentration of cysteamine (μ M)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (Mean \pm SE)	No. of TE cells (Mean \pm SE)	Total cell no. of blastocysts (Mean \pm SE)
0	34	12.4 \pm 2.0 ^a	18.2 \pm 1.6 ^b	30.7 \pm 2.4 ^b
25	36	10.5 \pm 1.4 ^a	24.4 \pm 2.8 ^{ab}	34.9 \pm 2.8 ^{ab}
50	41	12.2 \pm 1.6 ^a	27.3 \pm 2.3 ^a	39.6 \pm 2.3 ^a
100	22	12.1 \pm 1.5 ^a	25.0 \pm 3.0 ^a	36.8 \pm 3.6 ^{ab}

^{a,b,c} Values with different superscripts within the same columns are different significantly ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of different cysteamine concentrations during IVM on proportion of porcine IVF/IVD derived blastocysts according to ratio of ICM/total cells

Concentration of cysteamine (μ M)	No. of blastocysts	Ratio of ICM/total cells			
		< 20%	20~40 %	40~60 %	> 60 %
0	34	35.2 (12)	20.5 (7)	23.5 (8)	20.5 (7)
25	36	27.7 (10)	41.6 (15)	16.6 (6)	13.8 (5)
50	41	51.2 (21)	19.5 (8)	9.7 (4)	19.5 (8)
100	22	31.8 (7)	31.8 (7)	22.7 (5)	13.6 (3)

세포괴세포는 처리구간 10.5±1.4에서 12.4±2.0개로서 유의성이 인정되지 않았으나, 영양배엽세포는 처리구간 각각 18.2±1.6, 24.4±2.8, 27.3±2.3 및 25.0±3.0개로서 대조구보다 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 수를 나타냈으며, 또한 총세포수에 있어서 각각 30.7±2.4, 34.9±2.8, 39.6±2.3 및 36.8±3.6개로서 50 μM 처리구가 가장 많은 세포수로 조사되었다. 그리고 배반포기의 총세포수에 대한 내부세포괴세포의 비율(ratio of ICM/total cells)을 조사한 결과, 20~40%의 범주에 해당하는 비율은 각각 20.5, 41.6, 19.5 및 31.8%로 25 μM 첨가구에서 높게 나타났다.

따라서, 돼지 난포란을 체외성숙시 cysteamine의 첨가배양은 핵성숙률이나 자·응전핵형성률에는 영향을 미치지 않았으나, 6~7일동안 배발달을 유기한 결과, 50 μM 첨가구에서 배반포도달률 및 총세포수에서 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타내어 체외성숙시에 적합한 것으로 조사되었다.

돼지 미성숙난포란을 기본배양액인 NCSU-23배양액에 체외성숙·수정을 유기한 후, 배발달배양액인 0.4mg/ml BSA가 함유된 NCSU-23 배양액에 cysteamine을 0, 25, 50 및 100 μM 첨가하여 배발달을 유기한 결과는 Table 5, 6 및 7과 같다.

체외수정 후, 48시간째 난할률을 조사한 결과 71.6±5.2에서 80.1±0.1%로서 유의적인 차이가 인정되지 않았으나, 초기배발달에 있어서는 체외배발달 6일째 배반포기 도달률은 각각 15.0±0.7, 13.8±0.3, 20.8±0.2 및 14.7±5.0%, 배발달 7일째는 각각 16.0±0.2, 13.6±1.7, 25.0±0.8 및 15.7±4.5

개로서 50 μM 첨가구가 유의적(P<0.05)으로 높은 배발달률을 나타냈다. 처리구별 배반포기의 ICM, TE 및 총세포수에 있어서 ICM세포는 각각 5.6±1.3, 12.8±4.6, 6.5±2.2 및 3.6±1.0개로서 25 μM 처리구가, TE세포는 각각 21.8±3.0, 23.3±4.6, 27.5±3.7 및 21.5±3.9개로서 50 μM 처리구가, 총세포수에서는 각각 27.0±3.7, 36.1±4.8, 34.0±3.8 및 25.2±4.4개로서 25 μM 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 세포수를 갖는 것으로 나타났다. 또한 총세포수에 대한 ICM세포의 비율은 20~40% 범위에서 각각 53.8, 30.0, 16.6 및 11.1%로서 처리구가 오히려 낮은 경향을 나타내었다. 따라서, 돼지 체외수정란을 체외배양할 때 25~50 μM의 cysteamine의 첨가배양은 배반포에 이르는 초기배발달 및 세포수에 효과적으로 작용하는 것으로 조사되었다.

체외성숙·수정후 배발달에 미치는 영향에 관한 보고로서는 Takahashi 등(1993)이 소 미성숙 난자를 TCM-199배양액에 cysteamine을 각각 0, 10 및 50 μM첨가하여 성숙·수정시킨 후 배반포기도달률을 조사하였을 때 각각 7.1, 18.9 및 29.4%로서 50 μM에서 유의적으로 높은 배발달률을 나타냈다는 보고, 양 등(1997)이 0, 25, 50 및 75 μM을 첨가하여 성숙·수정시킨 후 배발달을 조사한 결과 상실배 및 배반포도달률이 각각 42.9±1.8, 40.4±0.8, 60.0±2.3 및 59.2±2.2%로서 50과 75 μM 첨가구에서 유의적으로 높은 배발달률을 나타냈다는 보고 및 Gasparini 등(2000)이 소에서 0, 50, 100 및 200 μM 첨가하여 성숙·수정시킨 후 배반

Table 5. Effects of different cysteamine concentrations on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Concentration of cysteamine (μM)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes cleaved	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	212	80.1±0.1 (170) ^a	15.0±0.7 (32) ^b	16.0±0.2 (34) ^b
25	221	74.0±7.8 (165) ^a	13.8±0.3 (30) ^b	13.6±1.7 (30) ^b
50	195	78.9±2.2 (154) ^a	20.8±0.2 (40) ^a	25.0±0.8 (48) ^a
100	203	71.6±5.2 (145) ^a	14.7±5.0 (30) ^b	15.7±4.5 (31) ^b

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly (P<0.05).

Table 6. Effects of different cysteamine concentrations on mean cell number of porcine IVM/IVF derived embryos

Concentration of cysteamine (μM)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (Mean \pm SE)	No. of TE cells (Mean \pm SE)	Total cell no. of blastocysts (Mean \pm SE)
0	13	5.6 \pm 1.3 ^b	21.8 \pm 3.0 ^b	27.0 \pm 3.7 ^b
25	10	12.8 \pm 4.6 ^a	23.3 \pm 4.6 ^{ab}	36.1 \pm 4.8 ^a
50	12	6.5 \pm 2.2 ^b	27.5 \pm 3.7 ^a	34.0 \pm 3.8 ^{ab}
100	9	3.6 \pm 1.0 ^b	21.5 \pm 3.9 ^b	25.2 \pm 4.4 ^b

^{a,b} Values with different superscripts within the same columns are different significantly ($P < 0.05$).

Table 7. Effects of different cysteamine concentrations on proportion of porcine IVM/IVF derived blastocysts according to ratio of ICM/total cells

Concentration of cysteamine (μM)	No. of blastocysts	Ratio of ICM/total cells			
		< 20 %	20~40 %	40~60 %	> 60 %
0	13	38.4 (5)	53.8 (7)	7.6 (1)	-
25	10	40.0 (4)	30.0 (3)	20.0 (2)	10.0 (1)
50	12	58.3 (7)	16.6 (2)	8.3 (1)	16.6 (2)
100	9	77.7 (7)	11.1 (1)	11.1 (1)	-

포기 도달률은 각각 14.9 \pm 6.8, 22.6 \pm 4.0, 15.7 \pm 3.1 및 13.0 \pm 3.1%로서 50 μM 첨가구가 유의적으로 높다는 보고와는 일치하는 결과였다. 그러나, Grupen 등(1995)이 돼지 난포란을 TCM-199배양액에 0, 50 및 500 μM 첨가하여 성숙·수정시킨 후, 배반포도달률이 각각 1, 3 및 17%로서 500 μM 이 좋다는 보고, Matos 등(1995)이 소 미성숙난자를 TCM-199에 0, 25, 50 및 100 μM 첨가하여 성숙·수정시킨 후 배반포도달률이 각각 14.0 \pm 2.0, 20.0 \pm 4.0, 21.0 \pm 3.0 및 25.0 \pm 2.0%로서 100 μM 첨가구가 좋다는 보고와 Bing 등(2000)이 소에서 대조구보다 100 μM 첨가구가 배반포도달률이 좋다는 보고와는 상반된 결과였다.

돼지 배반포기 수정란의 세포구성에 관한 연구 보고로서 Giles와 Foote(1995)는 배반포의 ICM세포는 태아로 발달하고 TE세포는 태반을 형성하여 자궁내막에 착상하는데 관여하게 된다고 보고하였다. 따라서, 배반포로의 발달능력을 측정하는 하나의 지표로서 ICM, TE 및 총세포수 등을 들 수 있다. 또한, ICM/total cells의 비율은 장차 착상과 태아발달에 영향을 미치므로 수정란의 질을 평가하

는 하나의 수단이 될 수 있다고 보고하였다. 따라서, 총세포수에 대한 내부세포외세포의 비율은 김(2001)에 따르면 체내(*in vivo*)생산 배반포의 경우 100%가 20~40% 범주에 들어가 수정란의 질이 좋은 경우, 이 범주에 속할 때라고 판단되나, 실제적으로 체외수정을 통하여 생산된 배반포기 수정란일 경우 Machaty 등(1998)의 보고에 따르면 비율이 50%일 경우에도 53.8 \pm 15.3마리의 착상률을 보고하여 추가실험을 해봐야 할 것으로 판단된다.

체외성숙시 cysteamine을 첨가하여 초기배발달을 유지하여 세포수를 조사한 보고로서는 Grupen 등(1995)이 0, 50 및 500 μM 처리구에서 각각 18.0, 24.8 \pm 3.1 및 36.5 \pm 3.6개로서 첨가량에 따라 총세포수도 증가한다고 하며, 50 μM 이상 처리시 감소하는 양상과 상이한 결과를 나타냈고, 또한 양 등(1997)이 소에서 0, 25, 50 및 75 μM 첨가배양시 세포수에는 영향을 미치지 않았다는 보고와도 합치점을 찾을 수 없는 결과였다.

한편, Yamauchi와 Nagai(1999)는 체외성숙시 첨가하는 cysteamine은 cystine과 같은 thiol을 환원하여 cysteine과 같은 GSH 합성전구물질 등을 활성화

화시키고 방사관세포 및 난구세포와 난황막과의 연결통로인 gap junction을 통하여 난세포질내 GSH 함량을 증가시켜 음성전핵형성률을 증가시킨다고 하였다.

돼지 체외수정란의 초기배발달시 cysteamine의 첨가 효과에 대해서는 직접적인 연구보고는 없으나, Dumolin 등(1992)과 Reed 등(1992)이 hypotaurine과 taurine은 초기수정란의 배발달에 좋은 영향을 미치는데, cysteamine은 hypotaurine의 전구물질이라고 보고하였다(Huxtable, 1992). 따라서, cysteamine은 황화합물로서 GSH를 합성하고, 자체적으로 항산화기능을 수행함으로써 'Redox state'를 유지하여 수정란의 배발달을 증가시킬 것으로 판단된다. 특히, 본 실험에서 배반포기 발달률은 50 μ M의 처리구, 총세포수에 있어서는 25 μ M의 cysteamine 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 한(2001)이 화학적 구조와 생리적 기능이 유사한 β -mercaptoethanol을 첨가하여 실험했을 때, 25 μ M 처리구가 배반포기 발달률에 유의적인 효과가 있음을 보고한 바, 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 또한, 총세포수에 대한 내부세포괴세포(ICM/total cells)가 20~40% 범주내에 드는 비율은 처리구가 대조구보다 낮은 결과를 나타냈는데, 이 또한 추가적인 실험이 필요하다고 판단된다.

IV. 요약

본 연구는 돼지 난포란의 체외배양액과 배발달 배양액에 저분자량의 황화합물인 cysteamine을 각각 0, 25, 50 및 100 μ M 첨가배양함으로써 cysteamine이 돼지 난포란의 체외성숙과 체외배발달에 미치는 영향을 규명하고자 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 돼지 난포란을 체외성숙배양액인 0.9mM CySH가 함유된 NCSU-23 배양액에 cysteamine을 각각 0, 25, 50 및 100 μ M 첨가배양하여 성숙을 유기한 다음, 체외수정을 실시한 결과, 모든 처리구에서 핵성숙률, 정자침투율, 음성전핵형성률, 다정자침입률 및 평균침입정자수에

- 서 유의적(P>0.05)인 차이가 인정되지 않았다.
2. 체외수정을 실시한 후, 배발달배양액인 NCSU-23에 7일간 배양한 결과, 배반포형성률은 각각 17.9 \pm 6.1, 17.4 \pm 6.3, 24.2 \pm 1.9 및 16.9 \pm 2.0%로서 50 μ M의 cysteamine 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈고, 총세포수에 있어서는 각각 30.7 \pm 2.4, 34.9 \pm 2.8, 39.6 \pm 2.3 및 36.8 \pm 3.6개로서 50 μ M의 cysteamine 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈다.
 3. 작성된 배반포기 수정란의 총세포수에 대한 내부세포괴세포(ICM/total cells)가 20~40% 범주에 드는 비율은 각각 20.5, 41.6, 19.5 및 31.8로서 25 μ M 처리구가 가장 높은 성적을 나타냈다.
 4. 체외에서 생산된 초기 수정란을 배발달배양액인 NCSU-23에 cysteamine을 각각 0, 25, 50 및 100 μ M 첨가하여 7일간 배양한 결과, 배반포기 발달률은 각각 16.0 \pm 0.2, 13.6 \pm 1.7, 25.0 \pm 0.8 및 15.7 \pm 4.5%로서 50 μ M의 cysteamine 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈고, 총세포수에 있어서는 각각 27.0 \pm 3.7, 36.1 \pm 4.8, 34.0 \pm 3.8 및 25.2 \pm 4.4개로서 25 μ M의 cysteamine 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타냈다.
 5. 작성된 배반포기 수정란의 총세포수에 대한 내부세포괴세포(ICM/total cells)가 20~40% 범주에 드는 비율은 처리구가 대조구보다 낮은 결과를 나타냈다.

결론적으로 돼지난포란을 이용하여 체외성숙을 유기할 때 효과적인 cysteamine의 농도는 50 μ M이 적당하며, 초기배발달을 유기할 때의 효과적인 cysteamine의 농도는 25~50 μ M인 것으로 판단된다.

V. 인용문헌

1. Abeydeera, L. R. and Day, B. N. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and

- calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
2. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Canteley, T. C., Rieke, A., Murphy, C. N., Prather, R. S. and Day, B. N. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing eidermal growth factor. *Theriogenology*, 54:787-797.
 3. Bing, Y. Z., Nagai, T. and Martinez, H. R. 2001. Effects of cysteamine, FSH and estradiol-17 β on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*, 55:867-876.
 4. Bing, Y. Z., Hirao, Y., Takenouchi, N., Che, L., Nakamura, H., Yodoi J. and Nagai, T. 2000. Effects of redox state on production of cattle embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 62 (Suppl.):319.
 5. Byun, T. H., Lee, S. H. and Song, H. B. 1991. Development of a rapid staining method of the oocytes from domestic animal. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
 6. Cheng, W. T. K., Polge C. and Moor, R. M. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. *Theriogenology*, 25:146(abstr.).
 7. Dumoulin, J. C. M., Evers, J. L. H., Bras, M., Pieters, M. H. E. C. and Geraedts, J. P. M. 1992. Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 94:373-380.
 8. Edwards, R. G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-352.
 9. Franger, M. W., Hart, D. A. and Wells, J. V. 1970. Enhancement by reducing agent of the transformation of human and rabbit peripheral lymphocytes. *J. Immunol.*, 105:1043-1045.
 10. Gasparrini, B., Neglia, G., Di Palo, R., Campanile, G. and Zicarelli, L. 2000. Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, 54:1537-1542.
 11. Giles, J. R. and Foote, R. H. 1995. Rabbit blastocyst: allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm. *Mol. Reprod. Dev.*, 41(2):204-211.
 12. Grupen, C. G., Nagashima, H. and Nottle, M. B. 1995. Cysteamine enhance *in vitro* development of IVM-IVF porcine oocytes. *Theriogenology*, 43:226(abstr.).
 13. Huxtable, R. J. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.*, 72(1):101-163.
 14. Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:379-383.
 15. Johnson, M. H. and Nasr-Esfahani, M. H. 1993. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian-embryos *in vitro*? *BioEssays*, 16(1):31-38.
 16. Kito, S. and Bavister, B. D. 1997. Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J. Reprod. Fert.*, 110:35-46.
 17. Machaty, Z., Day, B. N. and Prather, R. S. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 59:451-455.
 18. Matos, D. G. D., Furnus, C. C., Moses, D. F. and Baldassarre, H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 42:432-436.
 19. Matos, D. G. D., Furnus, C. C., Moses, D. F., Martinez, A. G. and Matkovic, M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.*, 45:451-457.
 20. Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeati, G. and

- Seren, E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1209.
21. Motlik, J. and Fulka, J. 1974. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 36:235-237.
22. Oshima, R. 1978. Stimulation of the clonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cells by β -mercaptoethanol. *Differentiation*, 11:149-155.
23. Petters, R. M. and Wells, K. D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fert.,(suppl.)* 48:61-73.
24. Pincus, G. and Enzmann, E. V. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 62:655-657.
25. Reed, M. L., Illera, M. J. and Petters, R. M. 1992. *In vitro* culture of pig embryos. *Theriogenology*, 37:95-109.
26. Rizzino, A. and Sato, G. 1978. Growth of embryonal carcinoma cells in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 75(4):1844-1848.
27. SAS Insitute. 1996. SAS/STAT[®] user's guide, release 6.12 edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
28. Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N. and Okano, A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 49:228-232.
29. Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Cantley, T. C. and Day, B. N. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos or produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fert.*, 111:101-108.
30. Yamauchi, N. and Nagai, T. 1999. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.*, 61:828-833.
31. Yoshida, M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:76-81.
32. 김하나. 2001. 돼지 수정란 및 배반포발달에 영향을 미치는 체외수정 조건. 전남대학교 석사학위논문.
33. 양부근, 박동현, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1997. Thiol 화합물과 항산화제 첨가배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 효과 : I. β -Mercaptoethanol과 Cysteamine 첨가가 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione농도 변화에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 21(4):335-343.
34. 한만희. 2001. 항산화제와 산소조건이 돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배발달에 미치는 영향. 충남대학교 박사학위논문.
(접수일자 : 2002. 1. 9. / 채택일자 : 2002. 2. 8.)