

## 항산화제와 Growth Factor 혼합첨가가 돼지 체외수정란의 체외배양에 미치는 영향

최영진 · 박춘근 · 정희태 · 김정익 · 박동현 · 장현용 · 장원경<sup>1</sup> · 박진기<sup>1</sup> · 양부근<sup>†</sup>  
강원대학교 동물자원과학대학

## Effect of Antioxidants Plus Growth Factors on *In Vitro* Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Choi, Y. J., C. K. Park, H. T. Cheong, C. I. Kim, D. H. Park,  
H. Y. Jang, W. K. Chang<sup>1</sup>, J. K. Park<sup>1</sup> and B. K. Yang<sup>†</sup>

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

### ABSTRACT

Antioxidants(N-acetyl-l-cysteine, ebselen and glutathione) and growth factors(EGF, PDGF) were studied as a mean of increasing the development of porcine embryos produced by *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization(IVF).

Porcine embryos developed to the 2~8 cell stage after IVF were cultured for 6 to 7 days at 38.5°C in NCSU 23 medium containing antioxidants plus growth factors. Cell numbers of blastocysts were counted by fluorescence staining method.

The developmental rate beyond morula stages in NCSU 23 containing NAC(1mM) or NAC(1mM) plus EGF(100ng/ml) or PDGF(5ng/ml) were 28.1, 32.3 and 35.3%, respectively. NAC plus PDGF group was slightly higher than control group(P>0.05). The developmental capacity in NCSU 23 containing ebselen(10 μM) or ebselen(10 μM) plus EGF(100ng/ml) or PDGF(5ng/ml) were 17.8, 36.9 and 40.3%, respectively. Ebselen plus growth factor groups were significantly higher than control group(P<0.05). The developmental capacity in NCSU 23 containing glutathione(100 μM) or glutathione(100 μM) plus EGF (100ng/ml) or PDGF(5ng/ml) were 24.1, 30.5 and 27.7%, respectively. There were not difference in all experimental groups(P>0.05). In all experimental groups, there was no significantly differences on the cell number of blastocysts, but ebselen plus growth factor groups were significantly higher than control group.

These studies indicate that antioxidants plus growth factors can increase the proportion of embryos that developed beyond morulae stage.

(Key words : Antioxidant, Growth factor, Porcine embryo)

돼지 체외수정란의 체외배양시 4세포기에 발생  
하는 체외발육억제현상은 초기배 수정란의 genome

### I. 서 론

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

<sup>1</sup> 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, R.D.A.)

을 활성화시키는 체내의 난관과 자궁의 조건을 체외에서 만들지 못하며, 체외수정란의 세포발육에 유해한 영향을 미치는 요인을 제거하지 못하기 때문에 일어나는 것으로 보고되고 있다(Corsby 등, 1988; Jarrell 등, 1991; Li 등, 1993; Schoenbeck 등, 1992).

체외발육억제현상의 한 원인으로 제시되고 있는 free radical은 체외수정란의 체외배양시 발생하는 높은 산소농도에 의해 생성되며 체외수정란에 oxidative stress를 미쳐 체외발육을 저하시킨다. 체외배양액내에서 형성되는 free radical을 제거하기 위한 방법으로는 항산화제의 첨가배양, 성선자극호르몬과 성호르몬의 첨가배양 및 성장인자의 첨가 배양 등이 폭 넓게 이용되고 있으며 체외발육을 증진시키는 것으로 보고되고 있다(Caamano 등, 1996; Nagai, 1994).

Superoxide radical의 dismutation에 의해 생성된 hydroxyl radical을 제거하는 glutathione peroxidase의 기질로서 작용하는 glutathione(GSH)은 thiol 화합물로서 세포분화와 아미노산의 수송 및 DNA와 단백질의 합성 등 세포내에서 중요한 생물학적 기능을 가지고 있으며 산화반응에서 세포를 보호하는 항산화제로 작용하여 체외수정란의 체외발육을 증진시킨다 (Lafleur 등, 1994; Meister와 Anderson, 1983; Sagara 등, 1993). NAC는 돼지의 원시생식세포의 체외배양시 항산화작용을 하는 것으로 보고되고 있으나 (Lee 등, 2000), 체외수정란의 체외발육에는 보고된 적이 없다. 목재로부터 추출한 ebselen의 경우 소 체외수정란의 체외발육에도 효과적이었다고 보고되었으나(장 등, 2002), 돼지 체외수정란의 체외발육에는 검토된 적이 없다.

세포의 증식과 분화, morphogenesis 및 조직의 hemeostasis의 유지에 중요한 역할을 수행 하는 성장인자 중 epidermal growth factor(EGF)는 세포의 DNA합성을 자극하며 포유동물 난포란의 핵성숙을 자극하고 fibroblasts, keratinocytes 및 epithelial cells 등의 세포증식을 자극하는 것으로 알려져 있다(Carpenter와 Cohen, 1979; Ding과 Foxcroft, 1994). 또한, Platelet derived growth factor(PDGF)는 소 난관상피세포와 난관액에서 검출되며 섬유

모세포의 증식, 단구세포와 호중구의 chemotactic agent로 작용하며 소 체외수정란의 체외발육을 증가시킨다고 보고되고 있다(Eckerter와 Niemann, 1996; Eriksen 등, 1993; Gandolfi 등, 1991).

본 연구는 돼지의 미성숙 난포란의 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8세포기 수정란에 항산화제(NAC, ebselen 및 GSH)와 성장인자(EGF, PDGF)의 혼합첨가배양이 체외수정란의 체외발육에 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 µg/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 실제현미경하에서 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 (Sigma) 및 10 IU/ml hCG(Sigma)를 첨가하여 성숙 배양액을 제조한 후 미성숙 난포란을 22시간 동안 1차 성숙배양을 실시한 다음, 호르몬이 첨가되지 않은 성숙배양액 소적내에서 22시간 동안 2차 체외성숙배양을 유도하였다.

체외수정용 기본 배양액으로는 modified Tris Buffer Medium(mTBM)에 2mg/ml의 Bovine Serum Albumin(BSA; Sigma)을 첨가하여 실험에 사용하였다. 성숙난포란은 체외수정 배양액으로 세척하여 체외

수정 소적(50  $\mu$ l)에 옮겨 넣었다. 체외수정을 위한 정자의 준비는 0.5ml의 동결정액을 37°C에서 용해시킨 후 1mg/ml의 BSA와 10  $\mu$ l/ml의 Antibiotic antimiotic용액(ABAM; Gibco)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

체외수정 후 생산된 2~8세포기 체외수정란을 체외배양액인 NCSU23 배양액에 일정량의 항산화제인 N-acetyl-l-cysteine(NAC, Sigma) 1mM, Ebselen (Sigma) 10  $\mu$ M 및 Glutathion(GSH, Sigma) 100  $\mu$ M에 EGF(Sigma) 100ng/ml 및 PDGF(R&D) 5ng/ml를 혼합첨가하여 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.

### 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 배양액 내에서 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 만든 후 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 Package를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 최소 유의차 검정(least significant different test ; LSD test)을 실시하여 통계처리하였다.

## III. 결 과

돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 생산된 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 NCSU 23 배양액에 NAC와 성장인자(EGF, PDGF)를 혼합첨가하여 체외배양시킨 후 얻은 체외발육 성적과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 1에 요약하였다.

NCSU 23 배양액에 NAC 1mM과 NAC에 EGF

**Table 1. The combine effect of NAC plus growth factors on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos**

Treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos (%)			Morulae plus blastocysts (%)	Aver. cell no. of blasto. (Mean±S.E)
			Pre-morulae	Morulae	Blastocysts		
NAC <sup>1</sup>	180	96(53.3)	69(71.9)	20(20.8)	7(7.3)	27(28.1)	30.6±5.3
NAC+EGF <sup>2</sup>	180	96(53.3)	65(67.7)	25(26.0)	6(6.3)	31(32.3)	30.3±7.0
NAC+PDGF <sup>3</sup>	180	102(56.7)	66(64.7)	29(28.4)	7(6.9)	36(35.3)	29.1±6.4

<sup>1</sup> N-acetyl-l-cysteine 1.0 mM.

<sup>2</sup> N-acethyl-l-cysteine 1.0 mM + EGF 100 ng/ml.

<sup>3</sup> N-acethyl-l-cysteine 1.0 mM + PDGF 5 ng/ml.

100ng/ml 및 PDGF 5ng/ml를 각각 혼합첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 각각 28.1%, 32.3% 및 35.3%로서 NAC와 PDGF 혼합처리구가 대조구와 NAC와 EGF 혼합처리구보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈으나, 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ ).

한편, 2~8세포기 체외수정란을 5~6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수는 각각  $30.6\pm 5.3$ ,  $30.3\pm 7.0$  및  $29.1\pm 6.4$ 로서 각 처리구간에 커다란 차이가 인정되지 않았다.

체외배양액인 NCSU 23 배양액에 ebselen과 성장인자(EGF, PDGF)를 혼합첨가하여 체외배양한 후 얻은 체외발육성과 배반포기 수정란의 세포수를 Table 2에 요약하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이 NCSU 23 배양액에 ebselen  $10\mu\text{M}$ 과 ebselen에 EGF 100ng/ml 및 PDGF 5ng/ml를 각각 혼합첨가하여 체외발육율을 조사한 결과, 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외발육율은 각각 17.8%, 36.9% 및 40.3%로서 ebselen과 성장인자의 혼합처리구가 ebselen 단독처리구보다 통계적으로 유의하게 높은 체외발육율을 나타냈다( $P<0.05$ ).

배반포기 수정란의 세포수는 ebselen과 EGF 혼합처리구 및 ebselen과 PDGF 혼합처리구가 각각  $68.0\pm 6.1$  및  $66.8\pm 8.5$ 로서 ebselen 단독처리구의  $25.7\pm 10.8$ 보다 통계적으로 유의하게 많은 세포수를 나타냈다( $P<0.05$ ).

를 나타냈다( $P<0.05$ ).

NCSU 23 배양액에 GSH  $100\mu\text{M}$ 과 GSH에 EGF 100ng/ml 및 PDGF 5ng/ml를 각각 혼합첨가배양하여 체외수정란의 체외발육율과 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과를 Table 3에 요약하였다.

Table 3에 나타난 바와 같이 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외발육율은 각각 24.1%, 30.5% 및 27.7%로 GSH와 EGF 혼합처리구가 여타구보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈지만 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ ).

배반포기 수정란의 세포수는 각각  $26.6\pm 7.6$ ,  $30.0\pm 7.2$  및  $33.2\pm 8.3$ 로 GSH와 PDGF 혼합처리구가 여타구보다 약간 많은 세포수를 나타냈으나 통계적으로 유의성이 인정되지 않았다.

#### IV. 고 찰

본 연구는 돼지의 미성숙 난포란의 체외에서 성숙, 수정시킨 후 체외배양액에 항산화제(NAC, ebselen 및 glutathione)와 성장인자(EGF, PDGF)를 혼합첨가하여 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

포유동물 수정란의 체외배양시 산소의 유해한 조건으로부터 수정란의 보호하는 세포내 GSH는 세포의 증식, 아미노산의 수송, disulfide 결합의 환원 및 DNA의 합성 등 많은 생물학적 기작에 있어

**Table 2. The combine effect of ebselen plus growth factors on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos**

Treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos (%)			Morulae plus blastocysts (%)	Aver. cell no. of blasto. (Mean±S.E)
			Pre-morulae	Morulae	Blastocysts		
EB <sup>1</sup>	180	90(50.0)	74(82.2)	13(14.4) <sup>b</sup>	3(3.3) <sup>b</sup>	16(17.8) <sup>b</sup>	25.7 <sup>b</sup> ±10.8
EB+EGF <sup>2</sup>	180	111(61.7)	70(63.1)	31(27.9) <sup>ab</sup>	10(9.0) <sup>a</sup>	41(36.9) <sup>a</sup>	68.0 <sup>a</sup> ± 6.1
EB+PDGF <sup>3</sup>	198	124(62.6)	74(59.7)	42(33.9) <sup>a</sup>	8(6.5) <sup>ab</sup>	50(40.3) <sup>a</sup>	66.8 <sup>a</sup> ± 8.5

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

<sup>1</sup> Ebselen  $10\mu\text{M}$ .

<sup>2</sup> Ebselen  $10\mu\text{M}$  + EGF 100 ng/ml.

<sup>3</sup> Ebselen  $10\mu\text{M}$  + PDGF 5 ng/ml.

**Table 3. The combine effect of glutathione plus growth factors on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos**

Treatment	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved(%)	No. of embryos(%)			Morulae plus blastocysts (%)	Aver. cell no. of blasto. (Mean±S.E)
			Pre-morulae	Morulae	Blastocysts		
GSH <sup>1</sup>	199	116(58.4)	88(75.9)	20(17.2) <sup>b</sup>	8(6.9)	28(24.1)	26.6±7.6
GSH+EGF <sup>2</sup>	201	118(58.7)	82(69.5)	33(29.0) <sup>a</sup>	3(2.5)	36(30.5)	30.0±7.2
GSH+PDGF <sup>3</sup>	200	119(59.5)	86(72.3)	28(23.5) <sup>a</sup>	5(4.2)	33(27.7)	33.2±8.3

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

<sup>1</sup> Glutathione 100  $\mu$ M.

<sup>2</sup> Glutathione 100  $\mu$ M + EGF 100 ng/ml.

<sup>3</sup> Glutathione 100  $\mu$ M + PDGF 5 ng/ml.

중요한 역할을 수행한다(Takahashi 등 1993; Yoshida 등, 1993).

수정란에서 GSH의 농도는 난포란이 성숙되고 발육되는 동안 증가하며 난포란에서 GSH의 축적은 체외수정시 수정율을 향상시키고 착상전까지 수정란의 발육을 촉진시키는 것으로 보고되었다(Crupen 등, 1995 ; Takahashi 등, 1993).

난포의 성스테로이드 합성에는 억제인자로 작용하며 난포세포의 증식에는 촉진인자로 작용하는 EGF는 난포란의 핵성숙을 자극하며, 소 체외수정란의 체외발육율을 증진시킨다고 보고되었다(Carpenter와 Cohen, 1979; Thibodeaux 등, 1993). PDGF는 난관상피세포 및 난관액에서 검출되며 자궁내막과 자궁근층의 유사분열을 촉진하고 체외수정란의 체외발육율을 증가시킨다(Eriksen 등, 1993; Yang 등, 1993).

Cysteine의 유도체인 NAC는 세포내 GSH 농도를 증가시키는 항산화제로서 Lee 등(2000)은 돼지의 원시생식세포의 체외배양시 2mM의 NAC의 첨가배양은 세포괴사현상을 억제시키며 세포의 생존율을 증진시킨다고 보고하였다. 본 실험의 결과에서는 NAC에 성장인자를 혼합첨가한 처리구에서 상설배 이상 발육된 체외발육율은 NAC와 PDGF 혼합처리구가 대조구보다 다소 높은 체외발육율을 나타내 돼지 체외수정란의 체외배양시 NAC의 첨가배양은 체외발육율을 증가시킬 수 있는 항산화

제로서 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Se를 함유하고 있는 ebselen은 돼지의 심장조직의 체외배양시 aldehydic 화합물을 감소시키는 반면 hydroxy 지방산을 증가시켜 glutathione peroxidase의 활성발현에 관여하고 있다는 것이 보고되었다(Batna 등, 1997).

본 실험의 결과를 볼 때 돼지 체외수정란의 체외배양시 ebselen과 성장인자의 혼합첨가는 체외수정란의 체외발육율을 증가시키며 배반포기 수정란의 세포수도 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 돼지 체외수정란의 체외배양시 ebselen은 항산화제로서 이용될 수 있다는 것이 증명되었다. GSH에 성장인자를 혼합첨가한 처리구에서 체외수정란의 체외발육율은 각 처리구간에 커다란 차이가 없었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 돼지 체외수정란의 체외배양에 있어 항산화제와 성장인자(EGF 및 PDGF)의 혼합첨가는 체외발육율을 것으로 나타났다.

## V. 요약

본 연구는 일정량의 항산화제(NAC, ebselen 및 GSH)와 성장인자(EGF, PDGF)의 혼합첨가가 돼지 체외수정란의 체외배양에 미치는 영향을 검토하였다.

1. NCSU 23 배양액에 NAC 1mM과 NAC에 EGF 100ng/ml 및 PDGF 5ng/ml를 각각 혼합 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 상실배기 이상 발육된 체외발육율은 각각 28.1%, 32.3% 및 35.3%로서 NAC와 PDGF 혼합처리구가 대조구보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈으나 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ ).
2. NCSU 23 배양액에 ebselen 10  $\mu$ M과 ebselen에 EGF 100ng/ml 및 PDGF 5ng/ml를 각각 혼합첨가하여 체외발육율을 조사한 결과, 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외발육율은 각각 17.8%, 36.9% 및 40.3%로 ebselen과 성장인자의 혼합처리구가 대조구보다 통계적 유의하게 높은 체외발육율을 나타냈다( $P<0.05$ ).
3. NCSU 23 배양액에 GSH 100  $\mu$ M과 GSH에 EGF 100ng/ml 및 PDGF 5ng/ml를 각각 혼합첨가배양하여 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외발육율은 각각 24.1%, 30.5% 및 27.7%로 GSH와 EGF 혼합처리구가 여타구보다 다소 높은 체외발육율을 나타냈지만 통계적 유의성은 없었다( $P>0.05$ ).
4. 모든 처리구에서 배반포기 수정란의 세포수는 커다란 차이가 인정되지 않았으나( $P>0.05$ ), 체외배양액에 ebselen과 성장인자를 혼합첨가하여 체외배양한 처리구에서는 대조구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 세포수를 나타냈다( $P<0.05$ ).

## Ⅵ. 사 사

본 연구를 수행하는데 도움을 주신 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

## V. 인용문헌

1. Batna, A., Fuchs, C. and Spittler, G. 1997. Lipid peroxidation in presence of ebselen. *Chem. Phys. Lipids*, 87:149-58.
2. Caamano, J. N., Ryoo, Z. Y. and Youngs, C. R. 1996. Beneficial effects of cysteine and  $\beta$ -mercaptoethanol on development of bovine IVM/IVF embryos in a cell-free, serum-free culture system. *Theriogenology*, 45:1(abstr.).
3. Carpenter, G. and Cohen, S. 1979. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.*, 48:193-216.
4. Corsby, I. M. and Gandolfi, F. 1988. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*, 82:769-775.
5. Crupen, C. G., Nagashima, H. and Nottle, M. B. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 52:1296-1301.
6. Ding, J. and Foxcroft, G. R. 1994. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
7. 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.
8. 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.).
9. Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Modena, S. and Lauria, A. 1991. Detection and characterization of a growth factor in bovine oviduct secretions. *J. Reprod. Fert.*, 7:6(abstr.).
10. 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.
11. Lafleur, M. V. M., Hoorweg, J. J., Westmijze, E. J. and Retel, J. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free. Radic. Res.*, 21:9-17.
12. Lee Chang-Kyu., Weeks, 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.
13. Li, J., Foote, R. H. and Simkin, M. E. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. Biol. Reprod., 48:33-39.
  14. 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.
  15. Meister, A. and Anderson, M. E. 1983. Glutathione. Annu. Rev. Biochem., 52:711-760.
  16. Nagai, T. 1994. Current status and perspectives in IVM/IVF of porcine oocytes. Theriogenology, 41:73-78.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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.
  22. Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M. and Pursel, V. G. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes ; Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Bio. Reprod., 49:89-94.
  23. 박기은, 박춘근, 김정익, 정희태, 박동현, 양부근. 2001. Nitric oxide 화합물 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과. 한국가축번식학회지. 25:63-69.
  24. 장현용, 박기은, 김정익, 박춘근, 정희태, 양부근. 2002. 한우 수정란의 체외발육에 있어 aesculetin과 O<sub>2</sub>의 농도의 영향. 한국가축번식학회지. 26:61-68.
- (접수일자: 2002. 4. 29. / 채택일자: 2002. 7. 1.)