

돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 항산화제와 BSO의 효과

최영진 · 박춘근 · 김정익 · 정희태 · 박동현 · 장현용 · 장원경¹ · 박진기¹ · 양부근[†]
강원대학교 동물자원과학대학

Effect of Antioxidants and Buthionine Sulfoximide on the Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Choi, Y. J., C. K. Park, C. I. Kim, H. T. Cheong, D. H. Park,
H. Y. Jang, W. K. Chang¹, J. K. Park¹ and B. K. Yang[†]

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

ABSTRACT

This study was carried out to examine the effects of antioxidants and buthionine sulfoximide(BSO) on the development of porcine *in vitro* maturation(IVM) and *in vitro* fertilization(IVF) oocytes.

Cumulus cell free embryos derived from porcine IVM/IVF oocytes were cultured NCSU23 medium with antioxidants or BSO under an atmosphere of 5% CO₂ and 5% O₂ at 38.5°C for 5~6 days.

The embryos cultured in medium with BSO showed a significantly(P<0.05) lower rates(8.4~15.7%) of the development to the morulae and blastocyst stage than control group(35.9%). When the embryos were cultured with NAC, ebselen, glutathione and BSO, the proportions of embryos beyond morulae and blastocysts were significantly(P<0.05) higher in medium with NAC(40.5%), ebselen(44.2%) and glutathione(36.0%) than BSO(10.9%).

In conclusions, these results indicate that NAC, ebselen and glutathione as a antioxidants can increase the proportion of embryos that develop beyond morulae stage. BSO, intracellular glutathione inhibitors, is suppressed the development of porcine embryos derived from IVM/IVF.

(Key words : Buthionine sulfoximide, N-acetyl cysteine, Ebselen, Glutathione, Porcine embryos)

I. 서론

돼지 난포란을 회수하여 체외수정시킨 후 생산된 초기배 수정란의 체외발육을 위한 체외배양 체계의 확립은 수정란 이식, 핵이식에 의한 복제 동물 생산 및 유전자 이식등과 같은 새로운 기술의 실용화와 체외배양 성적에 영향을 미치는 여러 가지 요인들을 규명하기 위한 필수적 연구과제이다.

수정란의 체외배양체계가 체내와 상이한 조건 중에 한가지로 체외수정란의 체외배양 조건은 체내에서 발육되는 것보다 산소 농도가 높기 때문에 배양액 내에는 free radical의 생성이 많은 것으로 알려져 있다. 이와 같은 free radical은 포유동물의 모든 세포에서 세포막 지질의 과잉산화, 효소의 불활성화, DNA와 RNA 손상 등을 입게 하며(Loven, 1988), 노화와 발암 등과 같은 질환과 생체내 지질 및 단백질 등 주요 물질의 변성과 파괴의 원인이

[†] Corresponding author : Tel : 033-250-8623, E-mail : bkyang@kangwon.ac.kr

¹ 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, R.D.A.)

되며(Gerschman 등, 1954), 특정한 발육 단계에서 수정란의 발육을 억제하는 체외 발육억제 현상의 한 요인으로 지적되고 있다. 세포구성물들의 산화는 세포기능을 손상시키는 가장 중요한 요소로서, 세포내 체계에서 산화에 의한 유해한 효과는 대사 작용에서 활성산소(reactive oxygen species ; ROS)에 대비한 buffer로써 작용하는 amino acids, vitamins, thiol 화합물 뿐만 아니라 superoxide dismutase(SOD), taurine 및 catalase 등과 같은 항산화물질에 의해 제거될 수 있으나(Akanmu 등, 1991 ; Cadenas, 1989 ; Reed, 1990), 체외에서는 이와 같은 항산화물질이 배양액내에 첨가되지 않아 세포의 성장에 유해한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Mayes, 1990).

한편 수정란의 세포내 glutathione은 체외배양시 산소의 유해한 조건으로부터 수정란을 보호하며, 세포의 증식, amino acid의 수송, 단백질과 DNA의 합성 촉진, disulfide 결합의 환원, 17 β -estradiol, prostaglandins, leukotrienser 같은 내인성 구성물들의 대사작용 및 cysteine의 저장과 운반 등 많은 생물학적 기작에 있어 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Takahashi 등, 1993 ; Yoshida 등, 1993). 체외수정란의 체외배양시 세포내 유리 thiol 화합물질인 glutathione의 첨가배양은 체외수정란의 체외발육율이 증가되는 것으로 보고되고 있어, 세포내 glutathione 농도는 체외발육을 증가와 밀접한 관계가 있다(Yoshida, 1993).

본 연구는 돼지 체외 수정란의 체외배양체계의 확립에 대한 기초 자료를 확립하기 위하여 돼지의 체외수정란의 체외발육시 체외발육율을 증진시키기 위하여 항산화제(NAC, ebselen, glutathione)와 세포내 glutathione 합성 억제제인 buthionine sulfoximide(BSO)을 체외배양액에 첨가하여 돼지 체외수정란의 체외 발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취, 체외성숙 및 체외수정

난포란의 채취, 체외성숙 및 체외수정은 박 등

(2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 간략하게 요약하면, 도축 직후, 성숙 모돈에서 적출한 난소로부터 난포란을 채취하였다. 도살직 후 적출한 난소를 100 IU/ml의 penicillin G(Sigma)와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma)가 첨가된 멸균 생리식염수가 담긴 보온병에 침지시켜 2시간 이내에 실험실로 운반하였다.

미성숙 난포란의 채취는 18 gauge의 주사바늘이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 난포내의 미성숙 난포란을 흡입, 채취한 후 Dubelcco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS ; Gibco, USA)에 0.1% Polyvinyl-alcohol(PVA ; Sigma, USA)이 첨가된 배양액(D-PBS-PVA)과 희석시켜 실체현미경(Nikon, Japan) 하에서 난포란을 회수하였다.

난포란은 NCSU23(North Carolina State University 23) 배양액을 체외성숙용 기본배양액으로 하여 0.57 mM의 cysteine, 10% 돼지난포액, 10 IU/ml eCG와 10 IU/ml hCG 호르몬을 각각 첨가하여 성숙 배양액을 제조하여 배양 2~3시간 전에 5% CO₂, 38.5 $^{\circ}$ C와 고습도의 배양조건 상태에서 평형시킨 후 100 μ l의 소적내에 15~20개의 미성숙 난포란을 넣어 22시간 1차 성숙배양을 실시한 후, hCG와 eCG 호르몬이 첨가되지 않은 성숙배양액 100 μ l을 상기방법으로 평형시킨 후 소적내에서 22시간 동안 2차 체외성숙배양을 유도하였다.

체외수정용 기본 배양액으로는 modified Tris Buffer Medium (mTBM)에 2 mg/ml의 소혈청알부민(Bovine serum albumin, BSA; Sigma)를 첨가하여 사용하였다.

체외에서 44~46시간동안 성숙배양된 난구세포가 균일하게 확장된 성숙난포란을 0.1%의 hyaluronidase(sigma)가 첨가된 성숙배양액 내에서 반복 pipetting 방법으로 난구세포의 일부를 제거한 후, 체외수정 배양액으로 3회 세척하여 성숙배양액과 동일한 방법으로 평형이 완료된 체외수정 소적(50 μ l)에 각각 15개의 성숙난포란을 옮겨 넣었다.

체외수정을 위한 정자의 준비는 0.5 ml의 동결정액(1 straw)을 용해시킨 후 1 mg/ml의 BSA와 10 μ l/ml의 antibiotic antimiotic용액(ABAM ; Gibco)이 첨가된 D-PBS배양액과 혼합, 원심분리(900 \times g,

5분)로 2회 세척하여 정자의 농도가 2.0×10^6 정자/ml가 되도록 조정하였다. 상기 방법으로 준비된 정액을 2 mM의 caffeine(sigma)이 첨가된 mTBM으로 희석시켜 정자 부유액을 준비하여 미리 준비된 성숙 난포란이 옮겨진 체외수정 소지에 50 μ l을 삽입하여 체외수정을 실시하였다.

체외수정을 실시한 후 40~44시간 동안 체외 배양을 실시하여 생산된 2~8세포기의 체외 수정란을 실험에 사용하였다.

2. 체외수정란의 체외배양

체외수정 후 40~44시간 체외배양시킨 후 생산된 2~8세포기 체외수정란을 세포내 glutathione 합성 억제제인 BSO를 0, 1 및 5 mM을 체외배양액에 첨가하여 6~7일 동안 5% CO₂, 5% O₂와 38.5°C의 조건에서 체외배양시킨 후 체외발육율을 조사하여 BSO가 돼지 체외수정란의 체외배양에 미치는 영향을 검토하였다.

또한 체외 배양액 내에 생성되는 free radical이 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 항산화제인 NAC 1.0 mM, ebselen 10 μ M, glutathione 100 μ M과 세포의 glutathione 합성 억제제인 BSO 1.0 mM을 체외배양액에 첨가하여 상기 방법으로 체외배양후 체외발육 성적을 조사하였으며, 체외에서 생산된 일부의 배반포기 수정란을 형광 염색법으로 세포수를 조사하였다.

3. 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 한시간 동안 고정한 후 D-PBS로 2~3회 세척을 실시하였다.

20%의 glycerol, 2 μ g/ml의 Hoechst 33342(Sigma) 및 100 μ g/ml의 DABCO가 첨가된 D-PBS액을 slide glass 위에 20 μ l의 소적을 만든 후 세척된 수정란 2~3개를 넣은 후 cover glass로 덮고 매니큐어로 봉입하여 4~5분간 염색을 실시한 후 형광현미경(Zeiss, Germany)에서 배반포기 수정란의

세포수를 조사하였다.

4. 통계처리

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

III. 결 과

1. BSO 첨가배양이 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 NCSU 23 배양액에 glutathione 합성억제제인 BSO를 첨가배양하여 각각 6~7일 동안 5% CO₂와 5% O₂ 농도에서 체외발육시킨 후 생산된 체외 수정란의 체외발육성적을 Fig. 1에 나타냈고 체외배

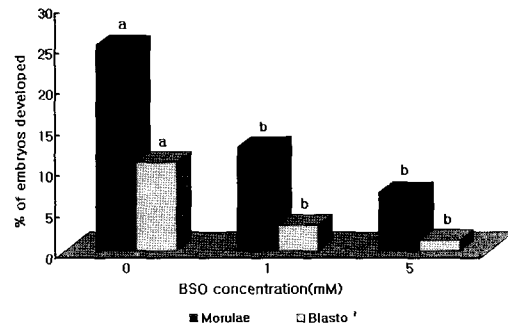


Fig. 1. Effect of BSO on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos. ^{a,b} Values with different letters between development stages are significantly differ, P<0.05. Blastocyst¹ : Blastocysts

Table 1. Number of total cell of porcine IVM/IVF embryos in NCSU23 supplemented with buthionine sulfoximine (BSO)

BSO (mM)	No. of blastocysts	Total cell no. of blastocysts
0	21	27.0±8.1
1.0	5	25.6±9.1
5.0	2	24.0±2.8

양후 생산된 배반포기 세포수를 Table 1에 요약하였다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 NCSU 23 배양액에 BSO을 0, 1.0 및 5.0 mM을 첨가한 구에서 상실배 이상 발육된 체외발육성적은 각각 35.9%(70/195), 15.7%(25/159) 및 8.4%(13/154)로서 BSO 5.0 mM 첨가구가 대조구보다 통계적으로 유의하게 낮은 체외발육율을 나타냈으며($P < 0.05$), BSO 5.0 mM 첨가구는 BSO 1.0 mM 첨가구보다 다소 낮은 체외발육율을 나타냈지만 통계적으로 유의성은 인정되지 않았다($P > 0.05$).

2~8세포기 체외수정란을 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수를 조사한 결과, 대조구, BSO 1.0 mM 첨가구 및 BSO 5.0 mM 첨가구에서 각각 27.0 ± 8.1 , 25.6 ± 9.1 및 24.0 ± 2.8 로서 BSO 1.0과 5.0 mM 처리구에서 대조구보다 다소 적은 세포수를 나타냈으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다.

2. 항산화제와 BSO 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

돼지 체외수정후 생산된 2~8세포기 수정란의 체외발육 성적을 조사하기 위하여 체외배양액에 일정량의 항산화제인 NAC, ebselen 및 glutathione 과 세포내 glutathione 합성 억제제인 BSO을 첨가하여 6~7일 동안 배양시킨 결과를 Fig. 2에 요약하였다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 NCSU 23 배양액에 항산화제인 NAC 1.0 mM, ebselen $10 \mu\text{M}$ 및 glutathione $100 \mu\text{M}$ 과 BSO 1.0 mM을 각각 첨가한 구에서 상실배 이상 발육된 체외발육성적은 각각 40.5%(47/116), 44.2%(57/129), 36.0%(41/114) 및 10.9%(12/110)로써 NAC 1.0 mM, ebselen $10 \mu\text{M}$ 및 glutathione $100 \mu\text{M}$ 첨가구가 BSO보다 체외발육율이 높게 나타나, 항산화 처리구가 BSO 처리구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$).

Table 2에서 나타난 바와 같이, 배반포기 수정란의 세포수는 NAC 첨가구, ebselen 첨가구, glutathione 첨가구 및 BSO 첨가구에서 각각 27.0 ± 6.5 , 40.6 ± 6.4 , 34.8 ± 5.9 및 21.0 ± 4.2 로서 NAC 첨가구, ebselen 첨가구, glutathione 첨가구가 BSO 첨가구

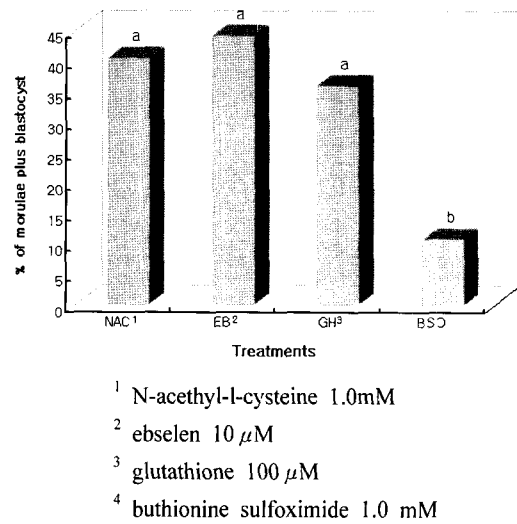


Fig. 2 Effect of antioxidants or BSO on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos. ^{a,b} Values with different letters are significantly differ, $P < 0.05$.

Table 2. Number of total cell of porcine IVM/IVF embryos in NCSU23 supplemented with antioxidant or BSO for *in vitro* culture

Treatment	No. of blastocysts	Total cell no. of blastocysts
NAC ¹	6	$27.0^b \pm 6.5$
Ebselen ²	13	$40.6^a \pm 6.4$
Glutathione ³	4	$34.8^b \pm 5.9$
BSO ⁴	2	$21.0^c \pm 4.2$

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

¹ N-acethyl-l-cysteine 1.0mM

² Ebselen $10 \mu\text{M}$

³ Glutathione $100 \mu\text{M}$

⁴ Buthionine sulfoximide 1.0 mM

보다 통계적으로 유의하게 높은 세포수를 나타냈으며($P < 0.05$), 처리구중 Ebselen첨가구는 여타구보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈다($P < 0.05$).

IV. 고 찰

본 연구는 돼지의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 체외수정란의 체외배양시 체외발육에 미치는 요인을 검토하기 위하여 항산화제(NAC, ebselen 및 glutathione)와 세포내 glutathione 합성 억제제인 BSO를 체외배양액에 첨가하여 돼지 체외수정란의 체외 발육에 미치는 영향을 검토하였다.

돼지 수정란의 체외성숙 또는 체외배양시 세포내 glutathione 합성의 증가는 세포발육에 중요한 요인 중의 하나이며, r-glutamyl cysteine synthetase의 억제에 의해 세포내 glutathione 합성을 억제하는 BSO는 세포배양이나 조직배양시 glutathione을 고갈시키기 위하여 많이 이용하고 있다(Yoshida, 1993; Griffith와 Meister, 1979). 또한 Yoshida(1993)은 돼지 난포란의 체외 성숙배양시 BSO의 첨가는 대조구에 비해 유의적으로 낮은 체외성숙율을 나타내 돼지 난포란의 체외성숙에도 세포내 glutathione 농도가 중요한 요인임을 보고하였다. Takahashi 등(1993)은 돼지 체외수정란의 체외배양에 BSO의 첨가는 세포내 glutathione의 합성을 억제하여 체외수정란이 체외발육에 유해한 영향을 미친다고 보고하였다. 본 실험의 결과, 돼지 체외수정란을 NCSU 23 배양액에 BSO를 0, 1.0 및 5.0 mM을 첨가한 구에서 상실배 이상 발육된 체외발육성적은 각각 35.9%, 15.7% 및 8.4%로써 BSO 첨가구가 대조구보다 낮은 체외발육율을 나타내($P < 0.05$), 본 실험의 결과와 Takahashi(1993)의 결과와 일치하는 경향을 나타냈으며, 이 결과는 체외 배양액에 BSO의 첨가는 돼지 체외수정란의 세포내 glutathione 농도를 감소시킴으로 체외배양율이 저하되는 것을 간접적으로 입증하였다.

NCSU 23 배양액에 NAC 1.0 mM, ebselen 10 μ M, glutathione 100 μ M 및 BSO 1.0 mM을 각각 첨가한 구에서 상실배 이상 발육된 체외발육성적은 각각 40.5%, 44.2%, 36.0% 및 10.9%로써 항산화제인 NAC 1.0 mM과 ebselen 10 μ M 및 glutathione 100 μ M 첨가구가 BSO보다 체외발육율이 통계적

으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$). Glutathione을 비롯한 항산화제는 세포의 redox 상태를 유지시켜주는데 중요한 역할을 하며, 또한 배양액내에 야기되는 oxidative stress에 대한 유해한 효과로부터 세포를 보호하는 작용을 한다. Glutathione은 superoxide radical에 의해 생성된 hydroxyl radicals 제거하기 위하여 glutathione peroxidase의 기질로 작용해 세포에 대한 oxidative 손상을 최소화한다(Yoshida, 1993; Chance 등, 1979; Meister, 1983). 세포 또는 수정란의 체외배양시 야기되는 것으로 보고되고 있는 free radical을 제거하기 위하여 SOD, catalase, glutathione, NAC 및 ebselen 등이 이용되어 좋은 결과를 보고하고 있다(장 등, 2002; Takahashi 등, 1993; Lee 등 2000). 본 실험의 결과로 보아 glutathione 합성 억제제인 BSO의 첨가는 체외수정란의 체외발육율을 저하시키는데 이는 수정란내 glutathione의 합성을 저해시키기 때문이라고 생각되며(Takahashi 등, 1993), 항산화제의 첨가는 배양액내에 free radical을 제거하여 체외발육율을 증가시키는 것으로 나타났다(장 등, 2002).

본 실험의 결과를 요약해 보면 돼지 체외수정란의 체외발육에 NAC, ebselen 및 glutathione은 항산화제로서 작용하여 체외발육율을 증가시킨 반면, BSO의 첨가배양은 상실배 이상 체외발육율을 유의하게 저하시켜 돼지 체외수정란의 체외발육에 세포내 glutathione 농도가 직접적인 관련이 있음이 입증되었다.

V. 요 약

본 연구는 돼지의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 생산된 체외수정란을 NCSU 23 체외배양액에 항산화제(NAC, ebselen 및 glutathione)와 BSO의 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

Glutathione 합성억제제인 BSO가 돼지수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토한 결과 0, 1.0 및 5.0 mM의 BSO를 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육성적은 각각 35.9, 15.7 및 8.4%로서 BSO 첨가구가 대조구에 비해 통계적으로 유의

하게 낮은 체외배율성적을 나타냈으며($P < 0.05$), NAC 1.0 mM, ebselen 10 μ M 및 glutathione 100 μ M과 BSO 1.0 mM을 첨가하여 배양한 결과 상실 배 이상 발육된 체외발육율은 40.5, 44.2, 36.0 및 10.9%로서 항산화제 첨가구가 BSO 첨가구보다 통계적으로 유의하게 높은 체외발육성적을 나타냈다($P < 0.05$).

체외수정후 생산된 배반포기 수정란의 세포수는 BSO 농도(0, 1 및 5 mM)에 따른 차이는 인정되지 않았으나, 항산화제를 첨가한 경우에는 ebselen, NAC 및 glutathione 첨가구가 BSO 첨가구보다 유의하게 높은 세포수를 나타냈다($P < 0.05$).

VI. 인용문헌

1. Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I. and Halliwell, B. 1991. The antioxidant action of ergothioneine. *Archs. Biochem. Biophys.*, 288: 10-16.
2. Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 58:79-110.
3. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59:527-605.
4. Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S. W., Dwyer, P. and Fenn, W. O. 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation; a mechanism in common. *Science*, 199:623.
5. Griffith, O. W. and Mester, A. 1979. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximide, *J. Biol. Chem.*, 254: 7558-7560.
6. Lee, C. K., Weeks, R. L., Johnson, G. A., Bazer, F. W. and Piedrahita, J. A. 2000. Effects of protease inhibitors and antioxidants on *in vitro* survival of porcine primordial germ cells. *Biol. Reprod.*, 63:887-897.
7. 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.
8. Loven, D. P. 1988. A role for reduced oxygen species in heat induced cell killing and the induction of thermotolerance. *Med. Hypotheses*, 26:39-50.
9. 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.
10. Meister, A. 1983. A selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220:472-477.
11. Reed, D. J. 1990. Chemical mechanism of drug-induced liver injury. In : Zakim D., Boyer T. D.(eds) *Hepatology : A textbook of liver disease*. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 737-753.
12. Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N. and A. Okano. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 49:228-232.
13. 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. *Biol. Reprod.*, 49:89-94.
14. Yoshida, M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:76-81.
15. 박기은, 박춘근, 김정익, 정희태, 박동현, 양부근. 2001. Nitric oxide 화합물 첨가가 돼지 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과. *한국가축번식학회지*, 25:63-69.
16. 장현용, 박기은, 박춘근, 김정익, 정희태, 양부근. 2002. 한우 수정란의 체외발육에 있어서 Aesculetin과 O₂농도의 영향. *한국가축번식학회지*, 26:61-68.

(접수일자: 2002. 4. 29. / 채택일자: 2002. 7. 1.)