

韓國家畜繁殖學會誌 27(2) : 115~123 (2003)
Korean J. Animal Reprod.

산소조건 및 Catalase가 돼지난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

한만희^{1†} · 이경본 · 천행수 · 박병권² · 이경광³ · 이규승 · 서길웅
충남대학교 동물자원학부

Effect of Oxygen Concentrations with Catalase on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes and *In Vitro* Development of Porcine IVM/IVF Embryos

Han, M. H^{1†}., K. B. Lee, H. S. Cheon, B. K. Park², K. K. Lee³, K. S. Lee and K. W. Seo
Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University

ABSTRACT

The present study was carried out to examine the effect of catalase (CAT) on *in vitro* maturation (IVM) of porcine follicular oocytes and oxygen concentration with CAT on *in vitro* development (IVD) of porcine IVM/IVF embryos.

The results were summarized as follows :

1. The rates of nuclear maturation, penetrated oocytes, pronucleus formation rates, polyspermic oocytes and mean numbers of the penetrated sperm were significantly lower in oocytes matured with 100, 500 and 1,000 units/ml CAT than those of control groups ($P>0.05$).
2. The rates of blastocyst formation and total cell numbers of blastocyst at day 7 after *in vitro* fertilization were significantly lower in CAT treatment groups than those of the control groups ($P>0.05$).
3. There were not significant difference in the blastocyst development and total cell numbers of blastocyst on *in vitro* culture of NCSU-23 media with 0, 100, 500 and 1000 units/ml CAT under the 5% and 20% O₂ concentrations.

These results suggested that the addition of CAT was not helpful for porcine oocyte maturation and further development, also the rates of blastocyst formation and total cell numbers of blastocyst at day 7 of porcine IVM/IVF embryos were not significantly different in the NCSU-23 culture medium under the 5% and 20% O₂ concentrations.

(Key words : Porcine embryos, IVM, IVF, Catalase, O₂ concentration)

* 이 논문은 2002년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

† Corresponding author: Tel : 063-620-3512, E-mail: hanmh@rda.go.kr

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

² 공주대학교 영상보건대학 특수동물학과(Dept. of Laboratory & Companion Animal, Kong-Ju University).

³ 한국생명공학연구원 (Korea Research Institute Bioscience and Biotechnology [KRIBB]).

I. 서 론

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 있어서는 Cheng 등(1986)에 의하여 난포란의 성공적인 체외성숙과 수정에 대한 실험법이 제시되었으며, Mattioli 등(1989)이 최초로 산자를 보고하였다.

그러나 돼지난포란을 이용한 체외수정란의 생산에는 최초단계인 체외성숙이 불완전하여, 체외수정시 높은 다정자침입률과 불완전한 응성전핵형성 및 초기배발달시 초래되는 체외발육능정지현상(*in vitro cell block*) 등의 어려움 때문에 아직도 다른 축종보다 다수의 양질수정란을 생산하는 것이 어려운 것으로 보고되었고, 최근의 고부가가치 단백질을 생산하는 형질전환동물이나 장기이식동물의 생산 등 여러 가지 첨단생명공학적 기법을 돼지에 접목하는데 하나의 장해요인으로 대두되고 있다.

최근 포유동물의 체외배양시스템에 효율을 제고하고자 여러 가지 항산화제 중에 효소계 항산화제의 일종인 catalase(CAT)를 이용한 연구가 일부 보고되고 있다. CAT는 주요한 활성산소(ROS)의 일종인 과산화수소(H_2O_2)가 Hydroxyl 유리기 생성에 관여하지 못하도록 H_2O_2 를 H_2O 및 O_2 로 대사시켜주는 항산화제의 한 종류이다($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). Harvey 등(1995)은 체외발육능 정지현상의 주요 원인물질을 활성산소에 초점을 모으고 쥐와 소의 수정란과 난관의 체세포에서 각종 항산화제의 mRNA를 조사한 결과, 모든 세포에서 CAT의 mRNA의 존재가 확인되어 포유동물의 수정란 및 난관내에는 활성산소에 대한 방어기전의 일환으로 CAT가 존재함을 보고하였고, Murray 등(1990)은 포유류 수정란의 체외배양시 세포의 독성물질인 free radical을 제거하기 위하여 CAT, superoxide dismutase(SOD), α -tocopherol(vit. E) 및 ascorbic

acid(vit. C) 등과 같은 항산화제를 첨가하여 수정란의 발육을 증진시킬 수 있다고 보고하였다.

CAT의 첨가배양에 관한 보고로서는 마우스(Legge와 Sellens, 1991; Payne 등, 1992; Johnson과 Nasr-Esfahani, 1993), 토끼(Li 등, 1993; Lindenau와 Fischer, 1994), 소(양 등, 1997b) 및 돼지(Park 등, 1996)에서 보고되었으나, 체외배양에 항산화제를 첨가하는 연구는 선행적으로 생리적인 난관의 체내조건인 저분압의 산소조건(40~60mmHg)을 충족시킨 상태에서 수행되어야 하며, 축종별 결과도 상이한 면이 많이 있는 것으로 알려져 있다(Johnson과 Nasr-Esfahani, 1993). 특히, 돼지난포란을 이용한 체외성숙과 배발달에 이러한 항산화제 및 산소농도가 미치는 영향에 관한 연구는 보고자에 따라 서로 다른 결과들을 제시하고 있고, 그 논지도 일치하지 않아서 이에 대한 종합적인 연구가 절실히 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 위와 같이 돼지에 있어서 명확히 구명이 되지 않은 CAT와 산소농도가 돼지난포란의 체외성숙 및 체외발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경산돈으로부터 적출하여 75ug/ml penicillin G와 50ug/ml streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 후 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고 재차 신선 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

공시난포란의 채란은 18-gauge 주사침이 장착된 10ml 주사기로 직경이 2~5mm의 포상난포로 부터 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 폐트리접시에 넣고 1mg/ml PVA(Sigma,

USA)가 첨가된 TL-Hepes와 희석하여 실체현미경(Nikon, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 붙고 세포질의 균일한 난포란만을 선별하여 난포란을 회수한 후 체외성숙 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙배양

본 연구에 이용되는 시약은 대부분 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 North Carolina State University(NCSU)-23(Petters와 Wells, 1993)을 기본배양액으로 하여 10% 돼지난포액(porcine follicular fluid, PFF), 0.9mM cysteine, 10IU/ml Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG), 10IU/ml human Chorionic Gonadotropin(hCG)와 10ng/ml의 EGF를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6mm 이상 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 3,000rpm, -4°C의 저온하에서 30분간 원심분리하고, 0.8um 필터로 여과·멸균한 후, -20°C 냉동고에 냉동보관하며 사용전 용해하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish(Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well당 500ul의 난자 성숙용 NCSU-23 배양액을 넣어 전배양을 실시하였다. 회수한 양질의 미성숙난자는 TL-Hepes 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 미성숙 난자는 각 well당 40~50개씩 넣어 38.8°C, 5% CO₂ 및 포화습도로 조정된 탄산가스배양기 내에서 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고, 이어서 호르몬이 첨가되지 않은 체외성숙 배양액에서 22시간 추가배양하여 총 44시간 동안 체외성숙을 유도하였다.

3. 체외수정

1) 난포란의 준비

체외수정용 배양액은 mTBM(Abeydeera와 Day, 1997)을 기본 배양액으로 2.5mM caffeine과 0.1% BSA(A7888)가 함유된 mTBM용액을 사용하였고(Abeydeera 등, 1997), 정액의 세정액으로는 DPBS에 0.1% BSA가 첨가된 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU-23에 넣어 연속적인 피

펫팅으로 난구세포를 제거하고, 2.5mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 용액으로 3회 세정하였다. 세정 후 미리 48시간 전배양을 실시한 90ul 수정용 배양액 소적에 30~40개의 성숙난자를 넣고 매정시까지 배양기 내에서 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 수정능획득

정액은 인공수정용 액상정액으로 사용 직전까지 17°C 항온고에서 최대 4일간 보존하여 사용하였다. 보존된 정액은 사용 직전에 정액세정액(DP-BS)과 함께 1 : 1 비율로 15ml falcon tube에 넣고 450g에서 3분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하는 세정과정을 3회 실시하였다. 마지막으로 하단에 남은 정자 침전물에 정자 세정용 배양액을 넣어 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기 내에서 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 1.2×10^5 sperm/ml이 되도록 매정한 다음 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스배양기 내에서 5~6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

3) 체외수정의 판정

각각의 처리구별 5~6시간 동안 체외수정배양액에서 정자와 수정을 유기한 후, pipetting 및 배발달 배양액으로 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 염색을 실시하여 핵성숙, 정자의 침입, 자·웅전핵형성 등의 수정 여부를 확인하였다.

4. 체외수정된 난포란의 체외배양

돼지 체외수정란의 배양에는 0.4% BSA(A0281)가 함유된 NCSU-23을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대부착정자를 제거한 다음 0.4% BSA가 첨가

된 NCSU-23 배양액으로 각각의 처리구별로 작성된 배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)에 각 well 당 500ul의 배발달 배양액을 넣고 well당 40~50개씩 적하하여 20% 산소조건(39°C, 5% CO₂ 및 포화습도) 및 5% 산소조건(39°C, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ 및 포화습도)의 배양기 내에서 각각 배양하여 배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할률을 조사하였고, 6일 및 7일째 배반포형성을 조사하였다. 이상과 같은 모든 실험은 37°C로 조정된 현미경가온판에서 실시하였다.

5. 배반포의 이중형광염색

체외수정을 실시하여 생산된 돼지수정란은 내부세포괴(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. 이를 수정란은 rabbit anti-pig whole serum이 1 : 5로 희석된 TL-Hepes 용액에서 1시간 처리한 후, TL-Hepes-PVA 용액으로 5분간 3회 세척하였으며, 10ug/ml Hoechest 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 3ul mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 수정란을 투여한 후, cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경 하(200×)에서 세포수를 조사하였다.

6. 실험 구성

CAT 및 산소조건이 체외성숙 및 배발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 CAT를 각각 0, 100, 500 및 1000Unit를 첨가하여 체외성숙 및 배발달에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 CAT 및 산소조건이 체외배발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 NCSU-23 배양액으로 성숙을 유도한 후, 정해진 방법으로 체외수정을 실시한 후, 생산된 수정란을 CAT가 각각 0, 100, 500 및 1000Unit가 첨가

된 배발달배양액에 넣어 각각의 배양기 내에서 배양하면서 배양 2일후에 난할률을, 6일 및 7일에 배발달률 및 이중형광염색을 통한 ICM세포 및 TE세포수를 조사하였다.

7. 통계분석

본 연구에서는 각 처리구에 대하여 4회 이상 반복실험을 실시하였으며, 도출된 모든 실험결과의 통계처리는 SAS/STAT 6.03 package를 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

돼지난포란을 체외성숙배양액인 0.9mM cysteine이 함유된 NCSU-23 배양액에 CAT를 각각 0, 100, 500 및 1000units/ml 첨가하여 성숙을 유기한 후, 체외수정용 배양액인 mTBM 배양액에 6시간 동안 체외수정을 실시한 결과는 Table 1과 같다. 즉, 핵성숙률은 대조구와 처리구에서 93.7±6.2% vs. 54.1±4.1~77.0±3.6%, 정자침입률은 75.0% vs. 69.4±12.3~69.7±15.9%로서 처리구가 유의적으로 낮은 결과를 나타냈고(P>0.05), 반면에 다정자침입률에 있어서는 39.2±10.7% vs. 42.2±0.6~59.6±18.0%로서 처리구가 유의적(P<0.05)으로 높은 결과를 나타내어 체외성숙시 CAT첨가는 체외수정에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 생각된다.

또한, 체외수정을 실시한 후 1-세포기수정란을 0.4% BSA가 함유된 NCSU-23 배양액으로 7일 동안 배발달을 유기한 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다. 배반포형성을은 25.2±6.0% vs. 9.1±0.4~15.4±1.8%, 총세포수에 있어서 43.3±5.1개 vs. 35.5±7.7~37.7±8.1개로서 처리구가 유의적(P>0.05)으로 낮은 결과를 조사되어 CAT를 첨가하여 체외성숙을 유기하여 수정란을 생산할 경우, 초기배발달에 있어서 무첨가군보다 배반포형성을 및 세포수에 있어서 좋지 않은 것으로 조사되어 효과가 없는 것으로 판단된다.

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

Concentration of CAT (U)	No. of oocytes examined	% (mean±SE) of oocytes			Percentage of polyspermic oocytes (Mean±SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean±SE)
		Matured	Penetrated	with male and female pronuclei		
0	62	93.7±6.2 (44) ^a	75.0± 0 (33) ^a	95.8± 4.1 (32)	39.2±10.7 (12) ^b	1.4±0.1
100	74	77.0±3.6 (32) ^{ab}	69.4±12.3 (21) ^b	95.8± 4.1 (20)	59.6±18.0 (12) ^a	2.4±0.5
500	54	54.1±4.1 (22) ^b	69.5±10.7 (15) ^b	91.0± 9.1 (13)	58.5±12.5 (9) ^a	2.0±0.1
1000	76	69.2±0.8 (27) ^b	69.7±15.9 (19) ^b	89.2±10.7 (18)	42.2± 0.6 (8) ^{ab}	1.8±0.3

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

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

Concentration of CAT (U)	Total no. of putative embryos	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	221	73.2± 3.1 (79) ^a	23.3±4.1 (25) ^a	25.2±6.0 (27) ^a
100	243	66.3±11.8 (60) ^{ab}	13.3±0.3 (12) ^{ab}	15.4±1.8 (14) ^{ab}
500	241	50.7± 3.0 (42) ^b	9.6±0.5 (8) ^b	10.9±1.9 (9) ^b
1000	268	55.7± 3.8 (61) ^b	8.3±1.2 (9) ^b	9.1±0.4 (10) ^b

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

Table 3. Effects of different CAT concentrations during IVM on mean cell number of porcine blastocysts

Concentration of CAT (U)	No. of blastocysts	No. of ICM cells (Mean±SE)	No. of TE cells (Mean±SE)	Total cell no. of blastocysts (Mean±SE)
0	17	3.3±0.8 ^b	40.0±4.4 ^a	43.3±5.1 ^a
100	38	7.7±1.4 ^a	27.9±5.1 ^b	35.6±5.1 ^{ab}
500	25	4.3±1.4 ^b	33.3±7.4 ^{ab}	37.7±8.1 ^{ab}
1000	23	5.0±1.0 ^b	30.5±6.7 ^b	35.5±7.7 ^b

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

돼지 난포란을 9mM cysteine이 함유된 NCSU-23 배양액을 이용하여 성숙을 유기한 후, 체외수정을

실시하고 0.4% BSA가 함유된 NCSU-23 배양액에 CAT를 각각 0, 100, 500 및 1000units/ml 첨가하고

Table 4. Effects of O₂ with CAT concentrations on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

O ₂ (%)	Culture conditions	CAT (U)	Total no. of putative embryos	% oocytes cleaved (Mean±SE)	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
					Day 6	Day 7
5		0	57	63.6±5.6 (36)	26.6±4.0 (15) ^a	26.6±4.0 (15) ^a
		100	70	54.2±2.8 (38)	14.2±2.8 (10) ^{ab}	19.9±5.7 (14) ^{ab}
		500	71	67.5±7.5 (48)	23.8±3.8 (17) ^{ab}	26.6±3.8 (19) ^a
		1000	70	60.8±3.1 (42)	9.5±1.5 (7) ^b	15.5±4.4 (10) ^b
20		0	58	59.3±9.3 (35)	18.9±0.2 (11) ^{ab}	18.9±0.2 (11) ^{ab}
		100	70	62.8±2.8 (44)	22.8±8.6 (16) ^{ab}	24.2±7.1 (17) ^a
		500	66	57.7±2.2 (38)	9.4±3.9 (6) ^b	10.8±2.4 (7) ^b
		1000	74	71.9±1.1 (53)	11.8±3.5 (8) ^b	14.8±4.4 (10) ^{ab}
Overall total or means						
5			268	61.5±2.6 (164)	18.5±2.8 (49) ^A	22.1±2.4 (58) ^A
20			268	62.9±2.8 (170)	15.7±2.7 (41) ^A	17.2±2.5 (45) ^B
		0	115	61.4±4.6 (71)	22.7±2.7 (26) ^A	22.7±2.7 (26) ^A
		100	140	58.5±2.9 (82)	18.5±4.4 (26) ^{AB}	22.1±3.9 (21) ^{AB}
		500	137	62.6±4.2 (86)	16.6±4.7 (23) ^{BC}	18.7±4.9 (26) ^{AB}
		1000	144	66.3±3.4 (95)	10.6±1.6 (15) ^C	15.1±2.5 (20) ^B

^{a,b} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($P<0.05$).

^{A,B,C} Main effect means within columns with different superscripts differ ($P<0.05$).

5% 및 20% 산소농도하에서 7일간 배양을 실시하여 배발달을 유기한 결과는 Table 4 및 Table 5와 같다. 산소농도에 의해서는 대조구와 처리구간 유의적인 차이가 인정되지 않았으며, CAT 첨가에 따른 배발달률과 총세포수에 있어서도 처리구가 대조구보다 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다 ($P>0.05$).

이와 같은 결과는 양 등(1997)이 소 체외수정란을 CR1aa 배양액에 250units/ml의 CAT를 첨가하여 배양하였을 때 대조구(45.1%)보다 처리구(62.3%)가 유의적으로 배반포형성률을 증가시킨다는 보고와는 합치점을 찾을 수 없는 결과이었고, Legge와 Sellens(1991)가 마우스수정란을 HTF 배양액에 5400units/ml의 CAT를 첨가하여 배양하였을 때 5% 및 20% 산소조건 모두에서 2-cell block 극복을 하지 못하였다는 보고와 Payne 등(1992)이 1-

세포기의 마우스수정란에 1000units/ml의 CAT를 세포질내 미세주입했을 경우에도 효과가 없다고 보고와 일치하였다. 그리고 Lindenau와 Fischer(1994)가 토끼 초기수정란의 배양에 BSM II-PVP 배양액에서 CAT 5400units/ml을 첨가하여 배양하였을 때 20% 산소조건하에서는 오히려 해로운 역할을 수행하는 것으로 보고하였으며, Li 등(1993)은 250~1000units/ml의 CAT 첨가배양은 배발달 및 총세포수에 영향을 미치지 않는다는 보고와도 일치하는 결과였다. 또한, 돼지수정란에 미치는 영향을 조사한 연구로서 Park 등(1996)이 돼지 미성숙난자의 체외성숙을 Waymouth 배양액에 CAT를 0.01, 0.1 및 1mg/ml 첨가하여 성숙을 유도하였을 때, 핵성숙율은 차이가 없었고, 정자 침투율은 61, 56 및 34%로서 첨가에 따라 좋지 않았음을 보고한 결과와도 합치점이 있는 것으로 사료된다.

Table 5. Effects of O₂ with CAT concentrations on mean cell number of porcine blastocysts

Culture conditions		No. of blastocysts	No. of ICM cells (Mean±SE)	No. of TE cells (Mean±SE)	Total cell no. of blastocysts (Mean±SE)
O ₂ (%)	CAT (U)				
5	0	12	8.0±2.5 ^a	35.6±5.2 ^{ab}	43.7±5.0 ^{ab}
	100	13	9.2±3.2 ^a	41.2±4.0 ^a	50.4±5.1 ^a
	500	13	1.5±0.7 ^c	25.6±2.0 ^b	27.1±2.4 ^{bc}
	1000	10	1.8±0.9 ^c	11.5±1.9 ^c	13.2±1.9 ^c
20	0	11	8.1±2.2 ^a	37.2±8.0 ^{ab}	45.3±6.8 ^{ab}
	100	15	7.5±3.3 ^{ab}	30.5±5.1 ^b	38.0±4.7 ^b
	500	7	3.6±1.9 ^{bc}	18.6±4.8 ^{bc}	22.2±5.9 ^{bc}
	1000	10	4.0±1.2 ^{bc}	9.6±2.5 ^c	13.6±2.6 ^c
Overall total or means					
5		48	5.1±1.1 ^B	29.4±2.5 ^A	34.7±3.0 ^A
20		43	6.4±1.4 ^A	26.6±3.4 ^A	33.0±3.4 ^A
	0	23	7.6±1.6 ^{AB}	36.3±4.4 ^A	44.4±4.0 ^A
	100	28	8.2±2.2 ^A	35.0±3.5 ^A	43.3±3.6 ^A
	500	20	2.2±0.8 ^C	23.2±2.1 ^B	25.4±2.4 ^B
	1000	20	2.7±0.7 ^{BC}	10.7±1.5 ^B	13.4±1.5 ^B

^{a,b,c} Values within columns for individual treatments with different superscripts differ ($P<0.05$).

^{A,B,C} Main effect means within columns with different superscripts differ ($P<0.05$).

한편, Johnson과 Nasr-Esfahani(1993)는 수정란에 CAT를 첨가하여 공동배양하는 것은 단지 최소한의 개선만을 보이며, 이것은 배양액 중에서 쉽게 불활성화되기 때문이라고 보고하였으며, 반대로 aminotriazole을 첨가하여 내인성 CAT의 활성을 억제시키면 발생정지가 없는 마우스 수정란에서도 2-세포기 발생능정지현상이 유기되는 것으로 발표하였다. 그리고 수정란에 CAT를 미세주입하면 비록 수정란의 발달을 유의적으로 증가시키지는 못하지만 빠르게 활성산소량이 줄어드는 것을 조사하는 등, CAT는 이 시기에 활동적이라고 보고한 바 있다.

본 실험을 통하여 돼지 체외수정란생산에 있어서 CAT 첨가배양이나 저분압산소 조건하에서 CAT를 첨가하여도 효과가 없었으며, 오히려 1,000 unit/ml의 첨가는 해로운 것으로 조사되었다. 그러나 수정란 및 자성생식도관에 존재하는 세포들은

공통적으로 활성산소를 처리하기 위하여 CAT의 mRNA를 갖고 있으며, 배양액 중에서 쉽게 불활성화 된다든지, 활성산소량을 감소시키는 등의 연구 보고를 볼 때, 앞으로 분자적인 수준에서 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

IV. 요 약

본 연구는 돼지난포란의 체외배양액에 황화합물인 Catalase 첨가 및 저분압산소조건 하에서 첨가배양함으로서 돼지난포란의 체외성숙과 체외배발달에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 돼지난포란을 체외성숙배양액인 0.9mM cysteine이 함유된 NCSU-23 배양액에 CAT를 각각 0, 100, 500 및 1000units/ml 첨가하여 체외성숙 및 수정을 실시한 결과, 모든 평가요소에

서 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 결과를 나타내어 체외수정에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 판단된다($P>0.05$).

2. 체외수정을 실시한 후, 배발달배양액인 NCSU-23에 7일 동안 배양한 결과, 배반포형성률과 총 세포수에 있어서 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 결과를 나타내어 체외성숙시 CAT 첨가배양은 배발달에 좋지 않은 것으로 판단된다($P>0.05$).
3. 배발달배양액인 NCSU-23에 CAT를 각각 0, 100, 500 및 1000units/ml을 첨가하고 5 및 20% 산소농도하에서 7일간 배양을 실시한 결과, 산소농도에 따른 차이는 인정되지 않았으며, CAT 첨가에 따른 배반포형성률과 총세포수에 있어서도 처리구가 대조구보다 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다($P>0.05$).

결론적으로 돼지난포란을 이용하여 체외수정란을 생산할 때, NCSU-23 배양액에 catalase의 첨가 및 산소조건은 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.

V. 인용문헌

1. Abeydeera, L. R. and Day, B. N. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. Biol. Reprod. 57:729-734.
2. 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.
3. Cheng, W. T., Polge, K., C. and Moor, R. M. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. Theriogenology. 25:146(abstr.).
4. Harvey, M. B., Arcellana-Panlilio, M. Y., Zhang, X., Schultz, G. A. and Watson, A. J. 1995. Expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. Biol. Reprod. 53:532-540.
5. Hunter, R. H. and Polge, C. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. J. Reprod. Fert. 12:525-531.
6. 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.
7. Legge, M. and Sellens, M. H. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. Human Reprod. 6(6):867-871.
8. Li, J. and Foote, R. H. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. J. Reprod. Fert. 98:163-167.
9. Lindenau, A. and Fischer, B. 1994. Effect of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured pre-implantation rabbit embryos. Theriogenology. 41:889-898.
10. 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.
11. 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.
12. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V. W. 1990. Lipid peroxidation is a source of free radicals *in vivo*. Harper's Biochem(eds.). pp.142-143.
13. Park, C. K., Roy, F. and Sirard, M. A. 1996. The effect of free radicals and anti-oxidant during *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology. 45:275(abstr.).

14. Payne, S. R., Munday, R. and Thompson, J. G. 1992. Addition of superoxide dismutase and catalase does not necessarily overcome Developmental Retardation of one-cell mouse embryos during *in-vitro* culture. *Reprod. Fertil. Dev.* 4:167-174.
15. Petters, R. M. and Wells, K. D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fert.(suppl.)* 48: 61-73.
16. Pincus, G. and Enzmann, E. V. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.* 62:655-657.
17. SAS Insitute. 1996. SAS/STAT[®] user's guide, release 6.12 edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
18. 양부근, 박동현, 우문수, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1997. Thiol 화합물과 항산화제 첨가배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 효과: Ⅱ.항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*. 21(4): 345-353.

(접수일자: 2003. 4. 17. / 채택일자: 2003. 5. 7.)