

β-Mercaptoethanol의 첨가배양이 돼지난포란의 체외성숙과 배발달에 미치는 영향

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

Effect of β-Mercaptoethanol on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes and Development of Porcine IVM/IVF Embryos

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

ABSTRACT

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

The results were summarized as follows :

1. The rates of nuclear maturation, penetrated oocytes, polyspermic oocytes, pronucleus formation and mean numbers of the penetrated sperms were not significantly different using NCSU-23 maturation media for 0, 25, 50 and 100 μM β-ME ($P>0.05$).
2. The rates of blastocyst formation at day 7 after *in vitro* fertilization were higher in oocytes matured with 25 μM β-ME ($25.4\pm0.9\%$) than in those matured with 0 ($14.5\pm1.6\%$), 50 ($17.3\pm1.7\%$) and 100 μM ($12.4\pm1.3\%$) ($P<0.05$). However, no differences were found in total cell numbers of blastocyst among the treatments.
3. The rates of blastocyst formation at day 7 after *in vitro* fertilization were higher in the NCSU-23 culture medium with 25 μM β-ME ($23.6\pm2.8\%$) than in those cultured with 0 ($15.4\pm4.4\%$), 12.5 ($17.5\pm2.3\%$) and 50 μM β-ME ($18.6\pm2.1\%$) under the 5% and 20% O₂ concentrations ($P<0.05$). However, no differences were found in total cell numbers of blastocyst among the treatments.

These results suggested that the addition of 25 μM β-ME in the IVM/IVD media were effective on the porcine embryo production. However, 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 5% and 20% O₂ concentrations.

(Key words : Porcine embryo, IVM/IVF, β-ME, β-mercaptopethanol)

* 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).

I. 서 론

돼지에 있어서 난포란을 이용한 체외성숙은 Edwards 등(1965)에 의하여 체외에서 43~46시간 동안 체외배양함으로써 제2성숙분열 중기(meta-phase-II)에 도달한다는 것이 처음으로 보고된 이래, 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 다정자 침입률과 불완전한 웅성 전핵형성 등으로 인한 수정률의 저하, 초기배 발달시 4-세포기에 발달이 지연되거나 정지되는 체외발육능정지현상(*in vitro* cell block)을 초래하는 등 다른 축종보다 양질의 수정란을 생산하는 것이 아직도 어려운 것으로 보고되었다.

한편, β -mercaptoethanol(β -ME)는 일반적으로 황화합물(thiol compounds)의 일종으로, 배양액 중에서 이황화결합(disulfide bonds)을 분해하여 일정한 물질의 환원에 관여하며, 특히 cysteine이 cystine으로 산화되는 것을 막아주므로서, cysteine의 이용능력을 증대시키고, GSH의 합성을 촉진 및 증대시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 각종 활성산소들로부터 세포를 보호하는 역할을 수행한다(Sagara 등, 1993). Ishii 등(1981)은 lymphocyte의 배양에 있어 β -ME는 세포의 생존율과 성장을 증대시키며, 체외배양액내에서 이황화결합으로 생성된 cystine과 황화합물의 반응은 이황화결합을 분해하여 cystine을 다시 cysteine으로 환원시키며, 환원된 cysteine과 황화합물이 반응하여 mixed disulfide를 생산한 다음, leucine과 같은 필수 α -amino acid에 대한 수송체계인 leucine(L) system 및 alanine-serine-cysteine (ASC) system을 경유하여 세포안으로 흡수된다. 세포내의 mixed disulfide는 빠르게 환원되어 cysteine과 황화합물을 생산해 내며, 황화합물과 cysteine은 세포에서 배양액내로 나와 cystine과 다시 반응함으로서 세포들이 cysteine을 계

속해서 이용할 수 있게 해 주어, 세포의 GSH와 cysteine 수준을 세포배양 동안 일정하게 유지해 주는 것으로 Ishii 등(1981)이 보고하였다.

이러한 여러 가지 β -ME의 기능 때문에 가축의 체외수정란 생산시스템에 적용하여 다수의 양질 체외수정란을 안정적으로 생산하고자 하는 연구가 소(Takahashi 등, 1993; Caamano 등, 1996; Lim 등, 1996; 이 등, 1997; Caamano 등, 1998; Geshi 등, 1999) 및 돼지(Park 등, 1996; Abeydeera 등, 1998) 등에서 수행되었다.

그러나 체외배양시스템에 β -ME의 첨가효과는 실험하는 동물종, 기본배양액, 첨가농도, 체세포와의 공동배양, 에너지 급원 및 저분압 산소조건 등에 따라서 연구자들의 연구보고가 상이하고, 특히 돼지에서는 많은 연구가 수행되지 않아서 명확한 구명이 필요하다고 사료된다.

이에 본 연구는 저분압 산소조건과 황화합물인 β -ME의 첨가배양이 돼지난포란을 이용하여 체외수정란을 생산하는 체외배양시스템에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

난포란의 채취를 위한 난소는 도축 직후의 미경 산돈으로부터 적출하여 75ug/ml penicillin G와 50ug/ml streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 2회 세척한 후 멸균 생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 그리고 재차 신선 멸균 생리식염수로 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 15 ml 원심 분리관에 옮겨 38°C로 조정된 정온대(multi-block, USA)에 10분간 정치, 난포란의 침전을 유도한 다음, 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 1.5 cm간격으로 방안을 표시한 87×15mm 페트리접시에 넣고

1mg/ml PVA가 첨가된 TL-Hepes와 희석하여 실체 현미경(Nikon SMZ-2T, Japan)하에서 난구세포가 2~3층 이상 치밀하게 불고 세포질의 균일한 난포란만을 선별하여 난포란을 회수한 후 체외성숙 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

본 연구에 이용되는 시약은 대부분 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 체외성숙용 배양액은 North Carolina State University (NCSU)-23 (Petters 등, 1993)을 기본배양액으로 하여 10% 돼지난포액, 10IU/ml PMSG, 10IU/ml hCG, 10ng/ml EGF 및 0.9mM cysteine을 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6mm 이상 크기의 난포에서 난포액을 채취하여 3,000rpm, -4°C의 저온하에서 30분간 원심 분리하고, 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 NCSU23 배양액을 넣어 전배양을 실시하였다. 회수한 양질의 미성숙난자는 TL-Hepes 배양액으로 3회 세정하고, 체외성숙용 배양액으로 3회 세정하였다. 세정된 미성숙 난자는 각 well당 40~50개씩 넣어 실험목적에 따라서 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 탄산가스 배양기에서 호르몬이 첨가된 배양 액에서 22시간 배양하고, 이후에는 호르몬이 첨가되지 않은 체외성숙용 배양액에서 추가로 22시간 배양하여 총 44시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다. 그리고 난포란의 성숙판정은 시험구별 44시간 동안 성숙배양시킨 난포란의 일부를 Byun 등(1991)의 방법에 따라 염색하여 핵성숙을 비교 판정하였으며, 핵성숙단계의 판정은 Hunter와 Polge(1966)의 방법에 준하여 실시하였다.

3. 체외수정

1) 난포란의 준비

체외수정용 배양액은 modified Tris-buffered medium (mTBM)을 기본 배양액으로 2.5mM caffeine 과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 배양액을 사

용하였고(Abeydeera 등, 1997), 정액의 세정액으로는 0.1% BSA가 첨가된 DPBS 배양액을 사용하였다. 44시간 동안 체외성숙된 돼지 난포란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 NCSU-23 배양액에 넣어 연속적인 퍼펫팅으로 난구세포를 제거하고, 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA가 함유된 mTBM 배양액으로 3회 세정하였다. 세정 후 미리 48시간 전 배양을 실시한 90ul 수정용 배양액 소적에 30~40개의 성숙난자를 적하하고 매정시까지 탄산가스배양 기에서 배양하였다.

2) 정자의 준비 및 수정능획득

정액은 인공수정용 액상정액으로 사용 직전까지 17°C 항온고에서 최대 4일간 보존하여 사용하였다. 보존된 정액은 사용직전에 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 CO₂ 배양기 내에서 10분간 정착하였다. 운동성을 가진 부유된 정자들을 회수하여 450g에서 3분간 원심분리를 실시한 다음, 침전된 정자는 체외수정용 배양액으로 재차 희석하였다. 희석된 정자는 성숙난자가 들어 있는 소적에 최종농도가 1.5×10^5 sperm/ml이 되도록 각각 10ul씩 주입한 후 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 5~6시간 동안 체외 수정을 실시하였다.

3) 체외수정의 판정

각각의 처리구별 5~6시간 동안 체외수정용 배양액에서 정자와 수정을 유기한 후, pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대 부착정자를 제거하였다. 그리고 배발달 배양액에 옮겨 추가로 배양한 다음, 수정후 10~12시간에 1-세포기의 수정란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로 염색하여 정자의 침입, 자·웅전핵형성 등의 수정 여부를 확인하였다.

4. 체외수정란의 체외배발달

돼지 체외수정란의 배양에는 0.4% BSA(A0281, Sigma, USA)가 함유된 NCSU-23을 기본배양액으로 사용하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 pipetting 및 배발달 배양액으로 3회 세척하여 잔류된 난구세포와 투명대 부착정자를 제거한 다음 0.4% BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액으로 각각의 처리 구별로 작성된 배양액을 4-well dish에 각 well당 500ul의 배발달배양액을 넣고 well당 40~50개씩 넣어 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 체외배발달을 유도하였다. 체외배양 2일째에 난할률을 조사하였고, 6일 및 7일째 배반포 발달률을 조사하였다. 이상과 같은 모든 실험은 37°C로 조정된 현미경 가온판(microscopic stage warmer, Japan)위에서 실시하였다.

5. 세포수 검사

체외수정을 실시하여 생산한 돼지수정란은 체외배양 7일째의 배반포단계에서 Machaty 등(1998)의 이중형광염색방법을 이용하여 내부세포피(inner cell mass, ICM)세포와 영양배엽(trophectoderm, TE)세포 및 총세포수를 조사하였다. 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, 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(200×)하에서 세포수를 조사하였다.

6. 실험 구성

β-ME 및 산소조건이 체외성숙 및 배발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 β-ME를 각각 0, 25,

50 및 100μM을 첨가하여 체외성숙 및 배발달에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 β-ME와 산소조건이 체외배발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여 NCSU-23 배양액으로 성숙을 유도한 후, 정해진 방법으로 체외수정을 실시하였다. 그리고 생산된 수정란을 β-ME가 각각 0, 12.5, 25 및 50μM이 첨가된 배발달 배양액에 넣어 각각 20% 산소조건(39°C, 5% CO₂ 및 포화습도) 및 5% 산소조건(39°C, 5% O₂, 5% CO₂ 90% N₂ 및 포화습도)의 배양기에서 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 검정(DMRT)에 의하여 처리구간 유의성을 검정하였으며, P<0.05 이하의 유의성만을 통계학적 차이가 있는 것으로 인정하였다.

III. 결과 및 고찰

돼지난포란을 체외성숙 기본배양액인 NCSU-23에 β-ME를 각각 0, 25, 50 및 100μM 첨가배양하여 성숙을 유기한 후, 체외수정용 배양액인 mTBM 배양액에서 6시간 동안 체외수정을 시킨 결과는 Table 1과 같다. 모든 처리구에서 대조구에 비하여 핵성숙률($76.4\pm5.4\sim95.2\pm4.7\%$), 침투율($51.1\pm3.8\sim66.9\pm6.5\%$), 웅성전핵형성률($95.2\pm4.7\sim100\%$), 다정자침입률($18.2\pm0.9\sim27.0\pm10.4\%$) 및 평균침입정자수($1.2\pm3.2\sim1.4\pm0.2$ 개)에서 유의적인 차이가 인정되지 않았다($P>0.05$).

돼지난포란을 NCSU-23 배양액에 각각 다른 농도의 β-ME를 첨가하여 성숙시킨 후, 체외수정배양액인 mTBM에서 6시간 동안 체외수정시킨 다음, 배발달배양액인 0.4mg/ml BSA가 함유된 NCSU-23 배양액에 7일간 배양하여 배발달을 유기한 결과는 Table 2와 Table 3과 같다. 즉, 처리구별 난할

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

Concentration of β -ME (μ M)	No. of examined oocytes	% (mean \pm SE) of oocytes			Percentage of polyspermic oocytes (Mean \pm SE)	Mean no. of spermatozoa in penetrated oocytes (Mean \pm SE)
		Matured	Penetrated	with male and female pronuclei		
0	62	86.8 \pm 2.4 (54)	51.1 \pm 3.8 (27)	95.2 \pm 4.7 (26)	23.5 \pm 10.9 (7)	1.3 \pm 0.1
25	74	87.6 \pm 5.2 (66)	66.9 \pm 6.5 (42)	100 (42)	25.6 \pm 9.4 (10)	1.3 \pm 0.1
50	54	95.2 \pm 4.7 (52)	54.4 \pm 9.8 (27)	100 (27)	18.2 \pm 0.9 (5)	1.2 \pm 3.2
100	76	76.4 \pm 5.4 (57)	58.2 \pm 6.1 (33)	100 (33)	27.0 \pm 10.4 (10)	1.4 \pm 0.2

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

Concentration of β -ME (μ M)	Total no. of putative embryos	% of oocytes cleaved (Mean \pm SE)	% (mean \pm SE) of embryos developing to blastocysts	
			Day 6	Day 7
0	221	67.9 \pm 6.7 (152)	11.8 \pm 2.0 (25) ^b	14.5 \pm 1.6 (35) ^b
25	243	67.5 \pm 5.7 (168)	23.0 \pm 1.6 (56) ^a	25.4 \pm 0.9 (62) ^a
50	241	62.3 \pm 4.9 (150)	16.4 \pm 1.4 (39) ^{ab}	17.3 \pm 1.7 (41) ^b
100	268	53.9 \pm 7.2 (140)	9.4 \pm 1.5 (27) ^b	12.4 \pm 1.3 (34) ^b

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

Table 3. Effects of different β -ME concentrations during IVM on mean cell number of porcine blastocysts

Concentration of β -ME (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	17	6.6 \pm 1.5	37.5 \pm 4.5	44.1 \pm 4.7
25	38	7.5 \pm 1.1	39.3 \pm 2.8	46.3 \pm 2.8
50	25	5.0 \pm 0.7	39.4 \pm 3.6	44.5 \pm 3.8
100	23	5.3 \pm 0.7	36.6 \pm 3.0	42.0 \pm 3.1

률(53.9 ± 7.2 ~ $67.9\pm6.7\%$)에는 차이가 없었으며, 7일째 배반포기 발달률은 각각 14.5 ± 1.6 , 25.4 ± 0.9 , 17.3 ± 1.7 및 $12.4\pm1.3\%$ 로서 $25\mu\text{M}$ 의 β -ME 처리구

가 유의적($P<0.05$)으로 높은 배발달률을 나타냈고, 총세포수에 있어서는 대조구와 처리구간 유의적인 차이가 없었다.

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

O ₂ (%)	Culture conditions	β-ME (μM)	Total no. of putative embryos	% of oocytes cleaved (Mean±SE)	% (mean±SE) of embryos developing to blastocysts	
					Day 6	Day 7
5	0	0	102	63.5±7.3 (63)	15.1±4.0 (15) ^{bc}	19.6±8.5 (19) ^{ab}
		12.5	95	59.2±8.4 (56)	12.6±0.3 (12) ^c	13.6±0.7 (13) ^{bc}
		25	114	60.8±2.1 (70)	22.7±3.6 (25) ^a	22.7±3.6 (25) ^a
		50	107	55.2±1.4 (59)	18.2±2.6 (20) ^{ab}	22.5±1.7 (24) ^a
	20	0	117	54.8±2.5 (65)	10.1±2.0 (13) ^c	11.3±3.2 (15) ^c
		12.5	111	60.7±9.8 (67)	19.9±2.9 (22) ^{ab}	21.3±3.3 (24) ^a
		25	115	59.3±9.7 (67)	23.5±4.2 (26) ^a	24.6±5.2 (27) ^a
		50	110	60.3±13.8 (65)	11.9±1.9 (13) ^c	14.7±2.0 (16) ^{bc}
Overall total or means						
5		418	59.7±2.6 (248)	17.1±1.7 (72) ^A	19.6±2.2 (81) ^A	
20		453	58.7±4.2 (264)	16.3±2.0 (74) ^A	17.9±2.2 (82) ^A	
0		219	59.1±4.0 (128)	12.6±2.3 (28) ^C	15.4±4.4 (34) ^B	
12.5		206	59.9±5.8 (123)	16.2±2.1 (34) ^B	17.5±2.3 (37) ^B	
25		229	60.0±4.4 (137)	23.1±2.5 (51) ^A	23.6±2.8 (52) ^A	
50		217	57.7±6.3 (124)	15.0±2.0 (33) ^{BC}	18.6±2.1 (40) ^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 ($P<0.05$).

돼지난포란을 NCSU-23 배양액에서 체외성숙을 유기한 후, 체외수정을 실시하여 NCSU-23 배양액에 β-ME를 각각 0, 12.5, 25 및 50μM 첨가하여 7일간 배발달을 유기한 결과는 Table 4 및 Table 5와 같다. 즉, 처리구별 산소농도에 따른 배발달률 및 총세포수에 있어서는 유의적인 차이가 없었으나, β-ME 농도에 따라 7일째 배반포기 발달률은 각각 15.4±4.4, 17.5±2.3, 23.6±2.8 및 18.6±2.1%로서 25μM 처리구에서 유의적으로 높은 배반포기 발달률을 나타냈다($P<0.05$). 그러나 총세포수에서는 처리구 및 대조구간 유의성이 인정되지 않았다.

이와 같은 연구결과는 소의 체외수정란을 TCM199을 기본배양액으로 β-ME를 첨가배양하였을 때, 50μM(Takahashi 등, 1993) 및 100μM(Caam-

ano 등, 1996; 이 등, 1997; Caamano 등, 1998)의 농도가 좋다고 보고한 결과와 Lim 등(1996)이 BECM 배양액에 배양시 β-ME는 6.25~12.5μM이 효과적이라고 보고 및 양 등(1997a)이 CR1aa 배양액에 50μM 첨가구 및 Caamano 등(1998)이 20μM을 첨가하여 배양하였을 경우에 배반포발달률 및 GSH함량이 유의적으로 높아진다는 보고와 유사한 결과였다. 또한 에너지급원과 관련하여 Takahashi 등(1993)이 10% FBS와 100μM의 β-ME를 병용 처리하였을 때가 대조구 및 단독첨가구 보다 유의적($P<0.05$)으로 높은 배발달률을 나타냈다는 보고와도 유사한 결과였고, 체세포와의 공동배양시에 미치는 영향에 관한 연구로서 Lim 등(1996)과 Geshi 등(1999)이 난구세포(cumulus cell)와 공배

Table 5. Effects of O₂ with β-ME 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 (%)	β-ME (μM)				
5	0	16	5.6±1.0 ^b	41.8±3.5 ^{ab}	47.5±3.7 ^a
	12.5	13	6.7±1.4 ^{ab}	36.6±5.5 ^b	44.2±5.1 ^{ab}
	25	20	4.5±0.8 ^{bc}	43.5±3.8 ^a	48.0±4.2 ^a
	50	11	8.1±2.5 ^a	31.3±3.6 ^{bc}	39.8±4.4 ^b
20	0	13	4.4±1.7 ^{bc}	28.7±5.1 ^c	33.2±4.8 ^c
	12.5	14	2.7±0.7 ^c	43.5±5.0 ^a	46.2±5.1 ^{ab}
	25	18	4.2±1.2 ^{bc}	37.5±4.8 ^b	41.7±4.4 ^b
	50	13	2.6±1.0 ^c	34.5±4.8 ^b	37.2±4.8 ^{bc}
Overall total or means					
5		60	6.1±0.6 ^A	39.3±2.1	45.5±2.1
20		58	3.5±0.5 ^B	36.8±2.5	40.4±2.4
0		29	5.2±0.9 ^A	37.1±3.1	42.3±3.2
12.5		27	5.0±0.8 ^A	40.2±3.7	45.2±3.5
25		38	4.3±0.7 ^A	40.6±3.0	45.0±3.0
50		24	5.2±1.4 ^A	33.0±3.0	38.4±3.2

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

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

양시에 각각 6.25μM와 10μM의 농도로 첨가배양하는 것이 가장 높은 배반포발달률로 조사되었다는 연구결과와 이 등(1997)이 난관상피단층세포(BOEC)와 100μM의 첨가배양은 체세포와의 공배양 유·무에 관계없이 높은 배반포 발달률을 나타냈다는 보고와도 일치하는 결과였다. 그리고 돼지수정란의 체외배양에 미치는 영향에 관한 연구로서 Abeydeera 등(1998d)이 NCSU-23 배양액으로 체외성숙시 0, 12.5, 25 및 50μM의 β-ME를 첨가배양했을 때, 다정자침입률 및 웅성전핵형성을 및 첨투정자수에는 영향을 미치지 않았고, 배양 6일째 배반포발달률은 각각 26, 34, 41 및 31%, 총세포수는 각각 34.9, 47.4, 67.5 및 54.5개로서 25μM 첨가구에서 유의적($P<0.05$)으로 높은 배반포 발달률과

총세포수를 나타냈고, 이러한 결과는 β-ME 첨가에 의한 세포내 GSH의 증가에 기인한다고 보고하고 있으며, 각각 7.9, 11.8, 15.5 및 10.4 pmol/Oocyte로서 세포내 GSH함량이 높을수록 배반포발달률과 세포수가 증가한다고 보고와도 일치하는 결과였다. 그러나 Park 등(1996)이 Waymouth 배양액에 β-ME를 각각 1, 10 및 100μM을 첨가하여 성숙율을 유기하였을 때, 핵성숙율에는 차이가 없었으나, 정자침투율에 있어서는 60, 51 및 26%로서 오히려 첨가량이 증가할수록 유의적으로 낮아진 결과를 나타내어 첨가효과가 없음을 보고한 결과와는 상반된 결과였다.

한편, β-ME와 저분압 산소조건이 배발달에 미치는 영향에 관한 연구에서는 소에서 난구세포 및

10 μ M β -ME를 첨가하여 5% 및 20% 산소조건 하에서 배양한 결과 배반포발달률은 각각 25와 29%로서 차이가 없음을 보고하여 β -ME 및 저분압 산소조건이 소수정란의 배발달에 효과적이지 않다는 Lim 등(1999)의 보고와는 대체로 일치하는 결과였고, CR1aa에 5% 및 20% 산소조건과 β -ME를 무첨가 및 20 μ M 첨가구하여 7일간 배양하였을 때 5% 산소조건에 20 μ M β -ME 첨가구가 배반포기로의 발달을 유의적($p<0.05$)으로 증가시켰으며, 또한 5% 산소조건은 총세포수를 증가시켰다고 한 보고(Caamano 등, 1998)와는 차이가 나는 결과였다.

본 실험을 통하여 돼지체외수정란의 생산시 NCSU-23 배양액을 기본배양액으로 할 경우에는 산소분압에 관계없이 체외성숙 및 배발달에도 25 μ M의 β -ME가 적정한 것으로 조사되었다.

IV. 요 약

본 연구는 돼지 난포란의 체외배양액에 황화합물인 β -mercaptoethanol(β -ME)을 첨가배양함으로서 돼지난포란의 체외성숙과 체외배발달에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다. 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 돼지난포란을 체외성숙배양액인 NCSU-23 배양액에 β -ME를 각각 0, 25, 50 및 100 μ M 첨가배양하여 성숙을 유기한 다음, 체외수정을 실시한 결과, 모든 처리구에서 핵성숙률, 정자침투율, 웅성전핵형성률, 다정자침입률 및 평균침입정자수에서 유의적인 차이가 인정되지 않았다 ($P>0.05$).
- 체외성숙 및 수정을 실시한 후, 배발달 배양액인 NCSU-23에 7일간 배양한 결과, 배반포 형성률은 25 μ M의 β -ME 처리구가 유의적($P<0.05$)으로 높은 결과를 나타냈고, 총세포수에 있어서는 대조구와 처리구간 유의적인 차이가 인정되지 않았다.
- 배발달배양액인 NCSU-23에 β -ME를 각각 0, 12.5, 25 및 50 μ M 첨가하고 5 및 20% 산소조건 하에서 7일간 배양한 결과, 처리구별 산소농도에 따른 배발달률 및 총세포수에 있어서는 유

의적인 차이가 없었으나, 25 μ M β -ME 처리구에서 유의적으로 높은 결과를 나타냈다($P<0.05$). 그러나 총세포수에서는 처리구 및 대조구간 유의성이 인정되지 않았다.

결론적으로 돼지난포란의 체외성숙 및 배발달 시 황화합물인 β -ME의 첨가는 25 μ M이 가장 적합하며, 산소농도에 따라서는 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.

V. 인용문헌

- 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.
- Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Prather, R. S. and Day, B. N. 1998. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocysts development after *in vitro* fertilization. Theriogenology. 50:747-756.
- 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.
- Caamano, J. N., Pugh, M. L., Rowson, A. D. and Youngs, C. R. 1998. Effect of oxygen tension and β -mercaptoethanol on development of *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology. 49:196(abstr.).
- Caamano, J. N., Ryoo, Z. Y., Thomas, J. A. and Youngs, C. R. 1996. β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. Biol. Reprod. 55:1179-1184.
- Cheng, W. T. K., Polge, C. and Moor, R. M. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. Theriogenology. 25:146(abstr.).
- Edwards, R. G. 1965. Maturation of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human

- ovarian oocytes. *Nature*. 208:349-352.
8. Geshi, M., Yonai, M., Sakaguchi, M. and Nagai, T. 1999. Improvement of *in vitro* co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Theriogenology*. 51:551-558.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Ishii, T., Bannai, S. and Sugita, Y. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*: role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine. *J. Biol. Chem.* 256(23):12387-12392.
 12. Lim, J. M., Reggio, B. C., Godke, R. A. and Hansel, W. 1999. Development of *in-vitro* derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Human Reprod.* 14(2):458-464.
 13. Lim, J. M., Liou, S. S. and Hansel, W. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*. 46:429-439.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Park, C. K., Roy, F. and Sirard, M. A. 1996. The effect of free radicals and antioxidant during *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology*. 45:275(abstr.).
 17. Petters, R. M. and Wells, K. D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fert.(suppl.)* 48: 61-73.
 18. Sagara, J., Miura, K. and Bannai. 1993. Cysteine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J. Neurochem.* 61:1667-1671.
 19. SAS Insitute. 1996. SAS/STAT® user's guide, release 6.12 edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
 20. Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N. and Okano, A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* developoment and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49: 228-232.
 21. 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 Glutathione 농도변화에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*. 21(4): 335-343.
 22. 이홍준, 서승훈, 이광희, 김기동, 이상호, 송해범. 1997. β -Mercaptoethanol 첨가에 의한 소 초기배의 체외발생 효과. *한국가축번식학회지*. 21(4):389-396.

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