

돼지수정란의 체외발육에 있어서 Growth Factors와 Hexoses의 영향

윤선영 · 이상영¹ · 정희태 · 양부근 · 김정익 · 박춘근[†]

강원대학교 동물자원과학대학

Effects of Growth Factors and Hexoses on *In Vitro* Development in Porcine Embryos

Yoon, S. Y., S. Y. Lee¹, H. T. Cheong, B. K. Yang, C. I. Kim and C. K. Park[†]

College of Animal Resource Science, Kangwon National University

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of different hexoses in medium with IGF-I and/or EGF on *in vitro* development of porcine embryos. In first experiment, when the embryos were cultured in medium with concentrations of 5 ng/ml IGF-I and 10 ng/ml EGF, the morula and blastocyst rates were higher than in another culture conditions ($P<0.05$). In second experiment, the effect of IGF-I in medium with different hexoses during the embryo culture was examined. The higher cleavage rates were obtained in medium with glucose and IGF-I ($P<0.05$). However, the higher proportion of embryos developed to morula and blastocyst stages in medium with IGF-I were obtained than in medium without IGF-I in medium with glucose, mannose and galactose. In third experiment, the effect of EGF on *in vitro* development of porcine embryos in medium with different hexoses were examined. In the culture medium was supplemented with glucose, the higher proportions ($P<0.05$) of embryos developed to morula and blastocyst stages were obtained in medium with that than without EGF. However, the proportions of embryos developed to blastocyst stage were not significantly different between with and without of EGF in medium with different hexoses. In fourth experiment, the effects of presence of IGF-I and EGF in medium with different hexoses on *in vitro* development of porcine embryos were examined. When culture medium was supplemented with IGF-I and EGF, the higher proportions of oocytes cleaved and developed to 8-cell stage were obtained in medium with glucose than mannose, galactose and fructose ($P<0.05$). These results show that glucose and growth factors, supported the development *in vitro* of porcine embryos, especially with greater embryo cleavage and development in medium with glucose added to media with IGF-I and/or EGF.

(Key words : EGF, Hexoses, *In vitro* development, IGF-I, Porcine embryo)

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-000-00208-0)지원으로 수행되었음.

¹ 경상남도 첨단양돈연구소 생명공학과

[†] Corresponding author: 박춘근, 우) 200-701, 강원도 춘천시 효자2동 192-1, 강원대학교 동물자원과학대학 동물자원학부, 전화 033-250-8627, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

I. 서론

체의 발육억제 현상은 체내의 난관 또는 자궁에서 분비되는 알려지지 않은 인자와 난관과 자궁의 조건 및 세포 발육에 유해한 영향을 미치는 요인을 제거하지 못하기 때문에 발생되며, 이로 인하여 체외 발육율이 저하되는 것으로 보고되고 있다 (Bigger, 1987; Li 등, 1993; Rieger 등, 1991).

이러한 체외발육억제현상을 극복하거나, 체외발육율을 증가시키기 위하여 단백질원의 첨가, 가스농도 조절, 각종 호르몬 및 성장인자를 첨가하여 체외 배양율을 향상시키기 위한 연구가 많은 연구자들에 의해 시행되어져 왔다. 그 중 난소 내 과립막 세포에서 발견되는 많은 성장인자들은 난자의 핵 성숙과 세포질 성숙 및 세포 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히, Insulin-like growth factor- I (IGF- I)은 난소의 과립막 세포에서 분비되며 난포의 성숙에 깊이 관여한다(Giudice, 1992). 이러한 IGF- I은 돼지(Reed 등, 1993; Xia 등, 1994)와 소(Haper와 Brackett, 1993) 난자의 체외 성숙을 자극한다. 또한 Epidermal growth factor (EGF)는 난포에서 sex steroid 합성 억제인자, 난포 세포의 증식 촉진인자로 작용하여 난자의 성숙을 통한 난구세포의 확장에 관여(Carpenter와 Cohen, 1979)함으로써 수정란의 체외배양에 유용한 성장인자로 확인되었다. 이러한 EGF는 mouse(Downs, 1989), rat(Benyosef 등, 1994), 사람(Das 등, 1991), 돼지(Reed 등, 1993; Ding과 Foxcroft, 1994) 그리고 소(Park과 Lin, 1993; Kobayashi 등, 1996; Lonergan 등, 1996) 난자의 체외성숙을 촉진시킨다고 보고된 바 있다. 더욱이 IGF- I 또는 EGF는 단독으로 첨가하는 세포증식작용이 미미하며 공동첨가시 그 작용이 활발하다고 보고되었다(Brigstock 등, 1989).

한편, 체내에 함유되어 있는 glucose의 기본 농도는 종에 따라 다를지라도 mouse(Garcner 등, 1990), 토끼(Leese, 1988), 양(Wales, 1973), 돼지(Nichol 등, 1992), 소(Carlson 등, 1970), 사람(Lippes 등, 1972)을 포함한 모든 종의 자성 번식기관에 존재한다. Hamster(Barnett 등, 1993), mice(Lane

등, 1998), 그리고 domestic animals(Flood와 Weibold, 1988; Thompson 등, 1991; Rieger 등, 1992; Gardner 등, 1993; Guyader-joly 등, 1996)에서 glucose의 대사는 수정란 발육의 초기에 낮지만, 배반포 단계시 해당작용을 증가시킨다. 그러나 현재 glucose가 초기 배발육에 해로운 영향을 끼친다는 보고가 있다(Chatot 등, 1989; Lawitts 등, 1991). 또한 glucose와 같은 fructose나 galactose, mannose는 해당경로를 개시할 수 있는 단당류 6탄당이다. Fructose는 여러 종의 번식기관에 존재하며 착상 전 수정란에 의해 대사된다(Gregoric 등, 1965; Haynes 등, 1967; Douglas 등, 1970; Suga 등, 1973; Aitken, 1976; Greven, 1984). 인간의 존재시, 배양액 내 glucose 대신 fructose를 첨가하였을 때 이종간 mouse 수정란의 cell-block을 완화시켜 배반포 형성을 촉진시킨다는 보고(Menezo 등, 1990)가 있지만 돼지 수정란의 체외발달에 있어 glucose와 fructose를 포함한 6탄당의 영향은 아직 확실하게 밝혀진 바가 없다.

따라서 본 연구는 돼지 체외수정란의 체외배양 체계에 대한 기초 자료를 얻기 위하여 돼지 체외 수정란의 체외배양시 성장인자와 6탄당 첨가가 돼지 수정란의 체외발육율에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 기본 배양액

난자의 체외성숙 및 체외배양을 위해 기본 배양액으로는 10.87mM NaCl, 0.48mM KCl, 0.17mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.12mM KH₂PO₄, 0.12mM MgSO₄ · 7H₂O, 25.07mM NaHCO₃, 1.00mM glutamine, 7.00mM taurine, 5.56mM glucose, 50µg/ml gentamycin이 첨가된 NCSU-23(North Carolina State University 23)을 사용하였다.

2. 난자의 준비

실험에 사용된 난자는 품종에 구분없이 도축 직후의 암돼지로부터 적출한 난소에서 채취하였다. 도축 직후 회수한 난소를 35~37℃의 생리식염수

(NaCl 0.9%)내에 넣어 2~3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 3회 세척한 후 2~6mm 직경의 난포로부터 18-gage 주사침이 부착된 일회용 10ml 주사기를 이용하여 흡입하였다. 흡입된 난포란은 TL-Hepes (114mM NaCl, 3.2mM KCl, 2.0mM NaHCO₃, 0.4mM NaHPO₄ · H₂O, 10.0mM Na-lactate, 2.0mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.5mM MgCl₂ · 6H₂O, 10.0mM Hepes (Quantum, Biotechnologies INC, USA), 100IU penicillin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, pH 7.4, 280 Osm로 적정)로 3회 세척하여 현미경을 통해 육안으로 선별하였다.

3. 난자의 체외 성숙

난자는 39°C의 5% CO₂ 조건하에서 10% porcine follicular fluid (PFF), 5mM hypotaurine, 0.57mM cysteine, 10 µl/ml PMSG, 1 µl/ml hCG를 첨가한 NCSU-23 내에서 22시간 성숙 배양하였다. 이후 PMSG와 hCG를 제외한 NCSU-23 성숙 배양액 내에서 22시간 동안 2차 성숙배양을 실시하였다.

4. 난자의 체외수정

체외성숙 후 난자는 0.1% hyaluronidase가 함유된 배양액 내에서 난구세포를 제거하였다. 이후 난자는 수정용 배양액에서 세척하여 50 µl 소적 내에 넣고 정자를 첨가할 때까지 39°C의 5% CO₂ 조건의 인큐베이터 내에서 2~3시간 평형시켰다. 이 때 수정용 배양액은 2mM caffeine과 2mg/ml BSA를 첨가한 modified Tris Buffer Medium (mTBM)을 이용하였다. 동결용해정액(1 straw, 0.5 ml)은 37°C의 항온수조에서 30초간 용해한 후 D-PBS (136.98mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.08mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄, 1.8mM CaCl₂, 0.49mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.9mM CaCl₂ · 2H₂O, 1g/500ml MgSO₄ · 7H₂O)에 5.56mM glucose, 0.33mM Na-pyruvate, 100IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 1ng/ml BSA를 첨가한 배양액으로 10분간 1500rpm에서 2회 원심분리하였다. 세척된 정자는 수정용 배양액으로 2.5×10⁶ spermatozoa/ml의 농도로 최종 희석하여 준비한 수정용 소적 내 5 µl 씩 첨가하여

체외수정을 실시하였다.

5. 수정란의 체외 배양

체외수정 후 수정란은 5.0mM hypotaurine, 4mg/ml BSA가 첨가된 NCSU-23 배양액 내에서 체외배양을 실시하였다. 이 때 체외배양액내에 일정량의 성장인자와 6탄당을 첨가하여 다음과 같은 조건하에서 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

1) 돼지 수정란의 체외발육에 있어 IGF-I과 EGF의 농도에 따른 영향을 검토하기 위하여 NCSU-23 배양액내에 각각 1, 5, 10 및 20ng/ml IGF-I과 EGF를 각각 첨가하여 수정란의 체외발육을 검토하였다.

2) IGF-I 첨가 유, 무시 6탄당의 첨가가 돼지 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 NCSU-23 배양액내에 10ng/ml IGF-I을 첨가 또는 무첨가 한 후 각각 5.56mM의 glucose, mannose, galactose 및 fructose를 첨가하여 수정란의 체외발육을 검토하였다.

3) EGF의 첨가 유, 무시 6탄당의 첨가가 돼지 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 NCSU-23 배양액내에 10ng/ml EGF를 첨가 또는 무첨가한 후 각각 5.56mM의 glucose, mannose, galactose 및 fructose를 첨가하여 수정란의 체외발육을 검토하였다.

4) EGF와 IGF-I의 첨가 유, 무시 6탄당 첨가가 돼지 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하기 위하여 NCSU-23 배양액내에 10ng/ml EGF와 5ng/ml IGF-I를 첨가 또는 무첨가한 후 각각 5.56mM glucose, mannose, galactose, fructose를 첨가하여 수정란의 체외발육을 검토하였다.

6. 통계처리

자료의 분석은 χ^2 -검정으로 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

Table 1은 돼지 수정란의 체외배양시 서로 다른

Table 1. Effect of concentrations of IGF-I and EGF on *in vitro* development of porcine embryos

Concentrations (ng/ml)	Growth factors	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to			
			≥2-Cell (48h)	≥8-Cell (96h)	Morula (144h)	Blastocyst (192h)
0		131	66(50) ^p	70(53) ^{ab}	35(27) ^a	6(5) ^p
1	EGF	128	77(60) ^p	73(57) ^{ab}	38(30) ^a	10(8) ^{ab}
	IGF-I	131	82(63) ^{ab}	72(55) ^a	37(28) ^a	9(7) ^{ab}
5	EGF	144	103(72) ^a	84(58) ^a	46(32) ^a	13(9) ^{ab}
	IGF-I	156	99(64) ^{ab}	92(59) ^a	44(28) ^a	18(12) ^a
10	EGF	136	91(67) ^{ab}	83(61) ^a	41(30) ^a	14(10) ^a
	IGF-I	134	95(71) ^{ab}	87(65) ^a	36(27) ^a	10(7) ^{ab}
20	EGF	148	75(51) ^p	65(44) ^p	20(14) ^p	3(2) ^p
	IGF-I	135	68(50) ^b	44(33) ^b	13(10) ^b	3(2) ^b

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different (p<0.05).

농도의 IGF-I과 EGF를 각각 첨가했을 때 초기 배 발육에 미치는 영향을 나타내었다. 그 결과, 체외 수정 후 48시간에서 2-cell 이상 분할된 난자의 비율은 대조구와 20ng/ml 첨가구에 비해 1~10ng/ml 첨가시 높게 나타났으며, 10ng/ml EGF 첨가시 타 첨가구에 비해 유의적으로 높은 비율을 나타냈다 (p<0.05). 또한 5ng/ml IGF-I 첨가시 blastocyst 단계까지의 발육율은 대조구와 20ng/ml 첨가구에 비해 유의적으로 높은 비율을 나타냈다(p<0.05).

돼지 체외수정란의 체외발육시 IGF-I의 유, 무에 따라 각각 glucose, mannose, galactose, fructose를 첨가하여 체외발육율을 검토한 결과를 Table 2에 나타냈다. 그 결과 배양액 내에 glucose가 존재하는 경우 IGF-I을 첨가함으로써 타 배양조건보다 유의적으로 높은 분할율을 나타냈다(p<0.05). 이와 같은 결과는 체외수정 후 96시간, 144시간 및 192시간에서 8-cell, morula 및 blastocyst 단계까지의 발육율에서도 같은 경향을 나타냈다. 한편, 수정란의 체외발육시 glucose, mannose 및 galactose는 IGF-I의 첨가가 무첨가에 비해 비교적 높은 발육율을 나타냈으나, fructose의 경우에는 IGF-I의 무첨가 시 오히려 높은 발육율을 나타냈다.

체외 발육을 위한 배양액 내에 서로 다른 hexo-

ses를 첨가한 경우 EGF의 첨가 유무에 의한 돼지 수정란의 초기 발육상황을 Table 3에 나타냈다. 그 결과, glucose가 함유된 배양액 내에서 EGF를 첨가한 경우 타 배양 조건에 비해 유의적으로 높은 발육율을 나타냈지만(p<0.05), fructose 첨가시 8-cell까지의 발육율이 타 배양조건에 비해 낮게 나타났다. 한편 서로 다른 hexoses의 첨가시 EGF의 유무에 의한 발육율의 차이는 거의 인정되지 않았다.

Table 4는 배양액 내에 각각의 6탄당 첨가시 EGF와 IGF-I을 공동으로 첨가 및 무첨가에 따른 각각의 6탄당 첨가시 돼지 체외 수정란의 발육율을 나타냈다. 그 결과 체외배양액 내에 glucose 첨가시 배양 96시간에서 8-cell 이상으로 발육한 수정란의 비율은 EGF와 IGF-I의 공동첨가시 타 배양조건에 비해 높은 비율을 나타냈다. 한편, morula 단계 이상으로 발육한 수정란의 비율은 그 차이가 인정되지 않았지만 glucose와 mannose 첨가시 galactose와 fructose 첨가에 비해 약간 높은 발육율을 나타냈다. 그러나 glucose 첨가시 8-cell 이상의 비율에서 EGF와 IGF-I의 첨가와 무첨가 사이의 유의적인 차이를(p<0.05) 제외하고는 모든 배양조건에서 그 차이는 인정되지 않았다.

Table 2. Effect of IGF-I on *in vitro* development of porcine embryo in medium different hexose

Hexoses	Presence of IGF-I	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to			
			2-Cell (48h)	8-Cell (96h)	Morula (144h)	Blastocyst (192h)
Glucose	+	122	79(65) ^a	72(59) ^a	37(30) ^a	13(11) ^a
	-	115	60(52) ^{ab}	52(45) ^b	25(22) ^{ab}	9(8) ^{ab}
Mannose	+	118	57(48) ^b	48(41) ^b	27(23) ^{ab}	9(8) ^{ab}
	-	113	54(46) ^b	38(32) ^{bc}	20(18) ^b	5(4) ^{ab}
Galactose	+	129	63(49) ^b	42(33) ^c	25(19) ^b	7(5) ^{ab}
	-	123	49(40) ^b	43(35) ^{bc}	25(20) ^{ab}	5(4) ^b
Fructose	+	115	38(36) ^c	32(28) ^c	21(18) ^b	4(3) ^b
	-	120	49(41) ^{bc}	42(35) ^{bc}	26(22) ^{ab}	6(5) ^{ab}

IGF-I : 5ng/ml, Hexoses : 5.56mM.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different (p<0.05).

Table 3. Effect of EGF on *in vitro* development of porcine embryos in medium with different hexose

Hexoses	Presence of EGF	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to			
			2-Cell (48h)	8-Cell (96h)	Morula (144h)	Blastocyst (192h)
Glucose	+	143	83(58) ^a	78(55) ^a	41(29) ^a	14(10) ^a
	-	151	83(55) ^a	61(40) ^b	37(25) ^{ab}	9(6) ^{ab}
Mannose	+	141	80(57) ^a	62(44) ^{ab}	26(20) ^{ab}	8(6) ^{ab}
	-	130	67(52) ^{ab}	56(43) ^b	26(20) ^{ab}	8(6) ^{ab}
Galactose	+	139	63(45) ^{bc}	56(40) ^b	20(15) ^c	5(4) ^{ab}
	-	128	58(45) ^{bc}	40(31) ^c	20(16) ^{bc}	5(4) ^b
Fructose	+	142	55(39) ^c	49(37) ^c	30(21) ^{bc}	7(5) ^b
	-	135	50(37) ^c	40(30) ^c	25(19) ^{bc}	4(3) ^{ab}

EGF : 10ng/ml, Hexoses : 5.56mM.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different (p<0.05).

Table 4. Effect of hexose with and without growth factors on *in vitro* development of porcine embryos

Hexoses	Presence of EGF & IGF-I	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos developed to			
			2-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
Glucose	+	129	96(74) ^a	69(64) ^a	29(22)	12(9)
	-	117	77(66) ^{ab}	47(40) ^b	23(20)	7(6)
Mannose	+	125	87(70) ^{ab}	61(49) ^a	29(23)	10(8)
	-	130	78(60) ^b	54(42) ^{ab}	24(18)	8(6)
Galactose	+	122	87(71) ^{ab}	47(39) ^b	22(18)	6(5)
	-	118	79(67) ^{ab}	44(37) ^b	21(18)	6(5)
Fructose	+	116	76(66) ^{ab}	45(39) ^b	18(16)	7(6)
	-	120	72(60) ^b	38(32) ^b	18(15)	5(4)

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p < 0.05$).

IV. 고 찰

본 연구는 돼지 미성숙 난자를 체외에서 성숙, 수정시킨 뒤, 체외수정란의 배양시 성장인자와 6 단당의 첨가에 따른 체외발육율을 검토하였다.

성장인자는 일반적으로 세포막의 표면에 있는 성장인자의 수용체와 결합하여 protein kinase, 환상 AMP, Ca^{2+} 등과 같은 2차 정보 전달계를 거쳐 세포의 성장, 증식을 촉진한다. Kane 등(1992)에 의하면 성장인자와 성장인자 수용체는 난관, 자궁 및 수정란에 존재하며 세포분화 및 증식에 관여함을 보고한 바 있다.

본 연구의 결과에서 체외성숙시 성장인자 첨가 효과에 있어서 IGF-I의 첨가시 5ng/ml에서 가장 좋은 배 발육율을 나타내었는데 이와 같은 결과는 IGF-I의 첨가가 수정란의 발달을 촉진한다고 한 Gruppen 등(1995)의 결과와 일치하였다. 또 Kathleen 등(1993)은 FSH 10ng/ml를 첨가한 경우 EGF 10ng/ml 첨가구에서 배반포 발육율이 28.2%로써 FSH 부재시 동량의 EGF를 첨가한 경우 발육율이 9.6%로 EGF 단독 첨가가 체외 성숙율이 배반포 발육율에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서도 배양액 내 서로 다른 농도의 EGF를 첨

가한 경우 10ng/ml EGF 첨가시 다른 첨가구에 비해 높은 배 발육 경향을 보였다. 한편, Abeydeera 등(1998)은 체외성숙시 10ng/ml의 EGF를 첨가하여 M II기까지의 높은 성숙율을 보였으며, 결과적으로 배양액 내 10ng/ml의 EGF 첨가가 난자의 체외성숙과 수정란의 배발육시 영향을 미치는 것으로 사료된다.

또한 본 실험에서 EGF 단독 처리시보다 IGF-I 과 공동 첨가한 경우 수정란의 체외 발육에 효과적인 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 이는 Lorenzo 등(1994)이 보고한 소 수정란의 체외배양시 EGF와 IGF-I 공동첨가에 의해 높은 핵 성숙율을 나타낸 것과 소 수정란의 체외배양액 내 EGF와 IGF-I 공동첨가시 높은 배발육을 보인 Rieger 등(1998)의 연구 결과와 같은 경향을 나타냈다.

한편, Table 2, 3 및 4에서 나타낸 바와 같이 성장인자 존재 하에서 glucose의 첨가가 가장 높은 배 발육율을 보였다. 이와 비슷한 결과로 Ludwig 등(2001)은 mouse 수정란의 체외배양에 있어 glucose 첨가 시 배반포기까지의 좋은 배발육을 보고하였다 Sakkas 등(1993)의 연구에 따르면 glucose는 4-cell 단계 이 후에 부족하면 세포 분열을 지연시키고 fructose는 glucose를 보충하는 부분으로 활동

한다고 하였다. 또 Ludwig 등(2001)의 연구에서도 fructose의 영향이 증명되었으나 본 연구에서는 fructose의 역할이 확실하게 나타나지 않았으나 glucose의 역할은 초기배부터 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Glucose의 이로운 작용은 대사와 관련이 있을 것이다. 단백질 합성, 핵산 합성, 이온 수송을 포함한 에너지를 요구하는 생물학적 과정은 증가가 필요하고, 배반포 단계를 이끄는 대사활성을 상승시키는 원인과 필요성을 증가시킨다(Brinster, 1974; Wales, 1975). 따라서 glucose와 fructose는 단백질 합성을 증가시키므로 초개배의 발육에 효과적인 영향을 미치는 것으로 생각되는데, Glucose는 glutamine 기질이기에 때문에 효율적인 생산능력으로 적합하게 포도당화 된 단백질은 수정란 발육에 유리하게 작용하기 때문에 본 연구 결과 성장인자와 6탄당의 첨가는 돼지 수정란의 체외 배양시 배발육에 효과적인 영향을 끼치는 것으로 사료되며, 이는 체외 발육율이 타 가축에 비해 낮은 돼지의 수정란 생산에 있어 체외배양체계를 개선할 수 있는 기초자료로서 활용할 수 있는 것으로 기대된다.

V. 요약

본 연구는 돼지 미성숙 난자를 체외에서 성숙, 수정시킨 뒤, 체외 수정란의 배양 시 성장인자와 6탄당의 첨가에 따른 체외 발육율을 검토하였다.

체외수정란의 발육을 위한 기본 배양액인 NCSU-23에 각각 0, 1, 5, 10 및 20ng/ml의 IGF-I과 EGF를 각각 첨가하여 농도의 차이에 따른 발육율을 검토하였다. 또한 5.56mM의 glucose, mannose, galactose 및 fructose에 5ng/ml의 IGF-I 또는 10ng/ml의 EGF 첨가 유, 무에 따른 초기배 발육율을 검토하였다. 마지막으로, 각각의 6탄당에 위와 같은 농도의 IGF-I과 EGF 공동 첨가 유, 무에 따른 초기배 발육율을 검토하였다.

그 결과, 돼지 체외 수정란의 체외 발육 시 배양액 내에 서로 다른 농도의 IGF-I과 EGF를 첨가하였을 때 IGF-I은 5ng/ml(12%)에서, EGF는 10ng/ml(10%)의 실험구에서 가장 높은 배반포기 배의 발

육율을 나타냈다.($p<0.05$) 또한 각각의 6탄당과 IGF-I 또는 EGF 유, 무에 따른 초기배 발육율을 검토한 결과 IGF-I과 EGF 모두 glucose 첨가 시 타 첨가구에 비해 초기 발육 단계의 수정란 발육뿐만 아니라 배반포까지의 배발육(10~11%)이 타 첨가구(3~8%)에 비해 높게 나타났다.($p<0.05$) 한편, 각각의 6탄당이 첨가된 배양액 내에 IGF-I과 EGF 공동첨가 유, 무에 따른 초기배 발육율을 검토한 결과 모든 실험구에서 EGF와 IGF-I 첨가 시 무첨가보다 높은 초기배 발육율을 나타냈으며 특히 초기 분열단계 수정란에서는 발육의 차이가 크게 나타났다.

본 연구 결과 성장인자와 6탄당의 첨가는 돼지 수정란의 체외배양 시 초기배 배발육에 효과적인 영향을 미치는 것으로 사료되며, 이는 체외 발육율이 타 가축에 비해 낮은 돼지의 수정란 생산에 있어 체외배양체계의 개선을 위한 기초자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

VI. 인용문헌

1. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Rieke, A., Prather, R. S. and Day, B. N. 1998. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol. Repro. Dev.* 51: 395-401.
2. Aitken, R. J. 1976. Uterine secretion of fructose in the roe deer. *J. Reprod Fertil.* 46:439-440.
3. Barnett, D. K., Reiger, D. and Bavister, B. D. 1993. Changes in the metabolism of glucose and glutamine during development of the hamster embryo. *Theriogenology* 39:185.
4. Benyosef, D., Galiani, D., Dekel, N. and Shalgi, R. 1992. Rat oocytes induced to mature by epidermal growth factor are successfully fertilized. *Mol. Cel. Endocr.* 88:135-141.
5. Bigger, J. D. 1987. Pioneering mammalian embryo culture. In: *The mamalian preimplanta-*

- tion embryo. Bavister B. C(ed). : Plenum press New York:1-22.
6. Brigstock, D. R., Heape, R. B. and Brown, K. D. 1989. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. *J. Reprod. Fert.* 85:747-758.
 7. Brinster, R. L. 1974. Embryo development. *J. Anim. Sci.* 38:1003-1012.
 8. Carlson, D., Black, D. L. and Howe, G. R. 1970. Oviduct secretion in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 22:549-552.
 9. Carpenter, G. and Cohen, S. 1979. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 39:30-40.
 10. Chatot, C. L., Ziomek, C., Bavister, B. D., Lewis, J. L. and Torres, I. 1989. An improved culture medium supports development of randombred 1-cell mouse embryo *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 86:679-688.
 11. Das, K., Hensleigh, L. E., Tagatz, G. E., Phipps, W. R. and Leung, B. S. 1991. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fert. Ster.* 55:1000-1004.
 12. Ding, J. and Foxcroft, G. R. 1994. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 39:30-40.
 13. Douglas, C. P., Garrow, J. S. and Pugh, E. W. 1970. Investigation into the sugar content of endometrial secretion. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* 77:891-894.
 14. Downs, S. M. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol. Reprod.* 41:371-379.
 15. Flood, M. R. and Weibold, J. L. 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 72:9-13.
 16. Funahashi, H., Cantley, T. and Day, B. N. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 101:159-165.
 17. Gardner, D. K., Lane, M. and Batt, P. 1993. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed *in vivo*. *Mol. Reprod. Fertil.* 36:313-319.
 18. Gardner, D. K. and Leese, H. J. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 88:361-368.
 19. Giudice, L. C. 1992. Insuline-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr. Rev.* 13:641-669.
 20. Gregorie, A. T. and Gibbon, R. 1965. Glucosyl oligosaccharides of the rabbit genital tract: effects of ovarian hormone administration. *Int. J. Fertil.* 10:151-157.
 21. Greven, H. 1984. The distribution of monosaccharides and hexosamines in the oviduct of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 79:229-232.
 22. Grupen, C. G., Nagashima, H. and Nottle, M. B. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology* 36:485-493.
 23. Guyader-Joly, C., Kahtchadourian, C. and Menezes, Y. 1996. Comparative glucose and fructose incorporation and conversion by *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote* 4:85-91.
 24. Harper, K. M. and Brackett, B. G. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 48:409-416.
 25. Haynes, N. B. and Lamming, G. E. 1967. Carbohydrate content of sow uterine flushings. *J. Reprod. Fertil.* 14:335-337.
 26. Kane, M. T., Carney, E. W. and Ellington, J.

- E. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology* 38:297-313.
27. Kathleen, M. H. and Brackett, B. G. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 48:409-416.
 28. Kobayashi, K., Yamashita, S. and Hoshi, H. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Fert.* 100:439-446.
 29. Lane, M. and Gardner, D. K. 1998. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod.* 13:991-997.
 30. Lawitts, J. A. and Bigger, J. D. 1991. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J. Reprod. Fert.* 91:543-556.
 31. Leese, H. 1988. The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fert.* 82:843-856.
 32. Li, J., Foote, R. H. and Simkin, M. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 49:33-37.
 33. Lippes, J., Enders R. G. and Pragay, D. A. 1972. Bartholomew WR. The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception.* 5:85 103.
 34. Lonergan, P., Carolan, C., Van Lanendonck, A., Donnay, I., Khatir, H. and Mermillod, P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 54: 1420-1429.
 35. Lorenzo, P., Illera, M. J., Illera, J. C. and Illera, M. 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fert.* 101:697-701.
 36. Ludwig, T. E., Lane, M. and Barister, B. D. 2001. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 64:1366-1374.
 37. Menezes, Y. and Khatchadourian, C. 1990. Involvement of glucose 6 phosphate isomerase activity(EG5.3.1.9) in the mouse embryo "2 cell block" *in vitro*. *C. R. Acad Sci. Paris.* 310: 297-301.
 38. Nichol, R., Hunter, R. F. K., Gardner, D. K., Leese, H. J. and Cooke, G. M. 1992. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J. Reprod. Fertil.* 96:699-707.
 39. Park, Y. S. and Lin, Y. C. 1993. Effect of epidermal growth factor(EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 39:475-484.
 40. Reed, M. L., Estrada, J. L., Illera, M. J. and Petters, R. M. 1993. Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zoo.* 266:74-78.
 41. Rieger, D., Luciano, A. M., Modina, S., Pocar, D., Lauria, A. and Gandolfi, F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 112: 123-130.
 42. Rieger, D., Luskutoff, N. M. and Betteridge, K. J. 1991. Developmentally related changes in the metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced and co-culture *in*

- vitro*. J. Reprod. Fert. 95:585-595.
43. Rieger, D., Luskutoff, N. M. and Betteridge, K. J. 1992. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev. 4:547-557.
 44. Sakkas, D., Urner, F., Menezes, Y. and Leppens, G. 1993. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos *in vitro*. Bio. Reprod. 49:1288-1292.
 45. Suga, T. and Masaki, J. 1973. Studies on the secretions of the cow. 6. Sugar and polyol constituents in the luminal fluid of the bovine uterus. Jpn. J. Anim. Reprod. 18:143-147.
 46. Thompson, J. G., Simpson, A. C., Pugh, P. A., Wright, R. W. and Tervit, H. R. 1991. Glucose utilization by sheep embryos derived *in vivo* and *in vitro*. Reprod. Fertil. Dev. 3:571-576.
 47. Wales, R. G. 1973. The uterus of the ewe. II. Chemical analysis of the uterine fluid collected by cannulation. Aust. J. Biol. Sci. 26:947-959.
 48. Wales, R. G. 1975. Maturation of the mammalian embryo: biochemical aspects. Biol. Reprod. 12:66-81.
 49. Wang, W. H., Abeydeera, L. R. and Cantley, T. C. and Day, B. N. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. J. Reprod. Fert. 111:101-108.
 50. Xia, P., Tekpetey, F. R. and Armstrong D. T. 1994. Effects of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. Mol. Reprod. Dev. 38:373-379.
- (접수일자: 2003. 5. 29. / 채택일자: 2003. 7. 2.)