

돼지 체외수정란의 체외발육에 있어 항산화제의 효과

장현용 · 오진영 · 김종택 · 박춘근 · 정희태 · 김정익 · 이학교¹ · 최강덕² · 양부근[†]

강원대학교 동물자원과학대학

초 록

5% CO₂와 5% O₂ 농도 조건 하에서 NCSU23 배양액에 aesculetin을 0, 1, 5 및 10 µg/ml를 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외배양 성적은 10 µg 첨가구(35.7%)가 여타구(0 µg, 30.2% ; 1 µg, 29.5% ; 5 µg, 29.2%)보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 얻었다($P < 0.05$). NCSU 23 배양액에 taurine을 0, 2.5 및 5.0 mM을 첨가, 체외배양을 실시한 결과 배반포기 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 2.8%, 2.2% 및 7.0%였으며, 상실배이상의 체외 발육성적은 26.1%, 26.9% 및 31.7%로서 taurine 5.0 mM 첨가가 체외수정란의 체외발육 성적이 유의적으로 높은 것으로 나타났다($P < 0.05$). NCSU 23 배양액에 melatonin을 0, 1, 5 및 10nM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 배반포기까지 발육된 체외 발육성적은 17.8%, 26.1%, 20.0% 및 16.3%로서 melatonin 1nM 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며($P < 0.05$), 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적에서는 melatonin 1nM 첨가구가 39.1%로서 대조구 33.3%, 5 nM 첨가구의 33.3% 및 10 nM 첨가구의 27.9%보다 높은 발육율을 나타냈다($P < 0.05$). 한편 배반포기 수정란의 세포수 조사에서는 melatonin 10 mM 첨가구가 유의하게 낮은 것으로 나타났다.

(주제어 : Porcine embryo, Antioxidant, Aesculetin, Taurine, Melatonin)

서 론

돼지 난포란을 회수하여 체외에서 성숙, 수정시킨 초기 배 수정란의 체외 배양은 체외 성숙 과정이 다른 가축에 비하여 길고, 체외 수정시 다정자 침입이 많으며, 체외 배양 과정 중 4 세포기에 체외 발육 억제 현상이 일어나 발육이 억제되거나 퇴행되는 현상으로 인하여 정상적인 수정란의 확보가 어려운 실정이다(Jarrell 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992).

초기배 수정란의 체외 발육 억제 현상의 원인은 명확하게 규명되어 있지는 않으나, 초기배 수정란의 genome 활성화와 체외배양 동안 유해한 산소를 함유한 free radical이 다량 생산되어 발생하는 oxidative stress 및 nitric oxide와 같은 수정란의 발육에 독성을 제공하는 인자 등에 의하여 일어난다는 연구결과가 보고되고 있다(Corsby와 Gandolfi, 1988 ; Joenje, 1989).

이와 같은 체외발육 억제현상을 극복하기 위하여 체외 배양액 내에 catalase, superoxide dismutase(SOD), taurine 등과 같은 항산화제 첨가 배양 및 저 농도의 산소 조건 등이 체외배양을 개선시키는 방법으로 이용되어 좋은 결과를 얻고 있다.

물푸레나무에서 추출할 수 있는 aesculetin은 흰쥐와 인간에서 prostaglandin의 생합성원인 인지질의 구성요소 중

arachidonic acid의 산화반응을 매개하는 lipooxygenase와 cyclooxygenase의 반응을 억제시키는 항산화제로 작용한다는 사실이 밝혀졌지만(Craven 등, 1986 ; Hofmanova 등, 1996 ; sekiya 등, 1982), 포유동물의 체외수정란의 체외 배양시 항산화제로서 작용하는 것에 대한 연구가 많지 않은 실정이다. aesculetin의 첨가배양이 소 체외수정란의 체외 발육을 증진시키는 것으로 보고되고 있으나(장 등, 2002), 돼지 체외수정란의 체외 발육에 미치는 효과에 대하여는 보고된 바가 없다.

황을 함유하고 있는 β-amino acid인 taurine은 체내 수정란과 자성생식기액에 높은 농도로 존재하며, 적혈구를 제외한 포유동물의 세포에서는 삼투압조절과 이온조절자로서 높은 삼투압으로부터 세포를 보호하며, 체외수정란의 체외배양시 높은 산소농도에 의해 생기는 free radical을 제거하는 항산화제 작용을 수행한다(Leibfried와 Bavistar, 1981).

Melatonin은 포유동물의 송과선에서 분비되는 호르몬으로 생물학적으로는 사람의 기분, 수면, 성적 행동, 광주기성 및 면역기능과 관계가 있는 것으로 보고되었고, 최근 사람의 노화와 관련된 질병과 관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 항산화제로서 강력한 free radical의 분해원으로 역할이 큰 것으로 보고되고 있다(Okatani 등, 1997 ; Poeggeler 등, 1993 ; Reiter, 1998 ; Reiter 등, 1993, 1995). Melatonin의 첨가가 mouse 수정란의 체외 발육을 증진시

* 본 연구는 경기도지역협력연구센터(KRRC)의 2004년도 과제의 일환으로 수행되었음.

¹ 한경대학교 생명공학부(Department of Genomic Engineering, Genomic Informatics Center, Hankyong National University)

² 한경대학교 생물정보통신전문대학원(The Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University)

[†] Corresponding author : College of Animal Resources Science, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon-Do, 200-701, Korea, TEL: 033-250-8623, E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

킴으로써 항산화 작용을 한다는 보고는 있으나, 돼지 체외수정란의 체외 발육에 있어 melatonin의 효과는 보고된 바가 없다.

본 연구는 돼지의 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 체외수정란의 체외배양 체계를 확립하고 그 기작을 규명하기 위하여 체외배양액에 항산화제(aesculetin, taurine 및 melatonin)의 첨가배양이 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

난포란의 채취

본 실험에 사용된 난포란은 도축 직후, 성숙 모돈에서 적출한 난소로부터 채취하였다. 도살 직후 적출한 난소를 2~3시간 이내에 실험실로 운반한 후, 미성숙 난포란의 채취는 3~5 mm인 난포를 선별하여 난포내의 미성숙 난포란을 흡입, 채취하였다. 채취한 난포란을 Dubelcco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS; Gibco, USA)에 0.1% Polyvinyl-alcohol(PVA; Sigma, USA)이 첨가된 배양액(D-PBS-PVA)과 희석하여 실체현미경(Nikon, Japan) 하에서 난구세포의 부착상태가 전체적으로 치밀하고 균일하게 부착되고 세포질의 상태가 양호한 것만을 회수하여 실험에 사용하였다.

난포란의 체외성숙

난포란은 North Carolina State University 23 (NCSU 23; Wang 등, 1997) 배양액을 체외성숙용 기본배양액으로 하여 0.57 mM의 cysteine, 10% 돼지 난포액과 10 IU/ml hCG 호르몬을 각각 첨가하여 성숙 배양액을 제조하여 100 μ l의 소적 내에 미성숙 난포란을 20~22개씩 넣어 22시간 1차 성숙배양을 실시한 후 호르몬이 첨가되지 않은 성숙배양액 100 μ l의 소적 내에서 22시간 동안 2차 체외성숙배양을 실시하였다.

체외성숙 배양액에 첨가된 난포액은 직경이 3~5 mm인 액상난포에서 채취한 난포액을 15 ml 원심분리튜브에 넣어 1500 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 30분간, 2회 원심분리 후, 0.2 μ m 일회용 syring filter(녹십자, 한국)로 여과하여 -20 $^{\circ}$ C에서 사용 전까지 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

난포란의 체외수정

체외수정용 기본 배양액으로는 modified Tris Buffer Medium(mTBM; Wang 등, 1997)에 2 mg/ml의 소혈청알부민(Bovine serum albumin, BSA; sigma)를 첨가하여 배양 접시 내에 50 μ l의 소적을 만든 후 mineral oil을 가주하여 사용하였다. 체외에서 40~44시간 동안 성숙 배양된 난구세포가 균일하게 확장된 성숙난포란을 0.1% hyaluronidase(Sigma)가 첨가된 성숙배양액 내에서 반복 pipetting 방법으로 난구세포의 일부를 제거한 후, 체외수정 소적에 각각 15개의 성숙 난포란을 옮겨 넣었다.

체외수정을 위한 정자의 준비는 0.5 ml의 동결정액(1 straw)을 용해시킨 후 1 mg/ml의 BSA와 10 μ l/ml의 Antibiotic antimiotic 용액(ABAM; Gibco)이 첨가된 D-PBS 배양액과 혼합, 원심분리(900 \times g, 5분)로 2회 세척하여 정자의 농도가 2.0×10^6 정자/ml가 되도록 조정하였다. 상기방법으로

로 준비된 정액을 2 mM의 caffeine(sigma)이 첨가된 mTBM으로 희석시켜 정자 부유액을 준비하였다. 준비된 정자 부유액 50 μ l을 미리 준비된 성숙 난포란의 옮겨진 체외수정 소적에 50 μ l을 삽입하여 체외수정을 실시하였다.

체외수정란의 체외배양

체외수정 후 40~44시간에 생산된 정상적으로 분할된 2~8세포기 체외수정란만을 선별하여 돼지 난포액과 L-cysteine이 함유되지 않고 BSA가 첨가된 체외배양액인 NCSU 23 배양액에 항산화제인 aesculetin, taurine 및 melatonin을 첨가하여 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향을 조사하였다.

체외수정란의 세포수 조사

체외수정란의 세포수 조사는 Papaioannou와 Ebert (1988)의 이중형광염색방법을 수정 보완하여 조사하였다. 체외수정란을 0.5% hyaluronidase(Sigma)에 처리하여 용해시킨 후, TNBA acid-PBS(1:9)와 3 mg/ml PVP액에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리한 후, Anti-DNP-BSA(1:10)액 내에서 20분간 배양한 후, Guinea pig complement-PBS(1:3)에서 30분간 처리하였다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란을 2.3% citrate 용액과 ethanol을 3:1의 비율로 만든 용액으로 세척한 다음, 10 μ g/ml Hoechst 33342(Sigma)와 10 μ g/ml propidium iodide(Sigma)에서 4~5분간 염색을 실시하였다. Mounting 용액은 PBS와 glycerol을 1:1로 혼합하여 사용하였으며, slide glass에 3 μ l mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 염색된 수정란을 옮긴 후 cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 400배 형광현미경(Ziess, Germany)에서 세포수를 조사하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS@8.1 package/PC를 이용하여 분석하였고, Duncan의 다중범위 검정방법을 실시하여 처리간 유의성을 검토하였다.

결 과

돼지의 난포란을 회수하여 체외성숙·체외수정시킨 후 40~44시간에 생산된 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 NCSU 23에 각각 다른 농도의 aesculetin과 taurine을 첨가하여 5~6일간 5% CO₂ 농도와 5% O₂ 농도 조건에서 체외배양하여 얻은 체외발육 성적을 Table 1과 2에 요약하였다.

Table 1의 결과에서 나타난 바와 같이 5% CO₂와 5% O₂ 농도 조건 하에서 NCSU 23 배양액에 aesculetin을 0, 1, 5 및 10 μ g/ml를 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외배양 성적은 10 μ g 첨가구(35.7%)가 여타구(0 μ g, 30.2%; 1 μ g, 29.5%; 5 μ g, 29.2%)보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 얻었다($P < 0.05$).

Table 2는 NCSU 23 배양액에 taurine을 0, 2.5 및 5.0 mM을 첨가, 체외배양을 실시한 결과 배반포기 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 2.8%, 2.2% 및 7.0%였으며, 상실배 이상의 체외 발육성적은 26.1%, 26.9% 및 31.7%로서 taurine 5.0 mM 첨가가 체외수정란의 체외발육 성적이 유의적으로 높은 것으로 나타났다($P < 0.05$).

Table 1. Effects of Aesculetin on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Aesculetin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	No. of embryos	No. of embryos developed to(%);				Morulae plus blastocysts (%)
		≤ 4 cell	≤ 16 cell	Morulae	Blastocysts	
0	86	15(17.4) ^b	45(52.3)	26(30.2) ^b	-	26(30.2) ^b
1	78	21(26.9) ^a	34(43.6)	21(26.9) ^b	2(2.6) ^b	23(29.5) ^b
5	72	14(19.4) ^b	37(51.4)	17(23.6) ^b	4(5.6) ^a	21(29.2) ^b
10	84	15(17.8) ^b	39(46.4)	26(31.0) ^a	4(4.8) ^a	30(35.7) ^a

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

Table 2. Effects of Taurine on *in vitro* development of porcine IVM/IVF embryos

Taurine (mM)	No. of embryos	No. of embryos developed to(%);				Morulae plus blastocysts (%)
		≤ 4 cell	≤ 16 cell	Morulae	Blastocysts	
0	176	51(28.9)	79(44.9) ^a	41(23.3)	5(2.8) ^b	46(26.1) ^b
2.5	182	51(28.0)	82(45.1) ^a	45(24.7)	4(2.2) ^b	49(26.9) ^b
5.0	186	51(27.4)	76(40.9) ^b	46(24.7)	13(7.0) ^a	59(31.7) ^a

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

Table 3. Effects of melatonin on the development of porcine IVM/IVF embryos

Melatonin (nM)	No. of IVM/IVF embryos	No. of embryos developed to(%);			Morulae Plus blastocysts (%)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	45	30(66.7)	7(15.6) ^a	8(17.8) ^b	15(33.3) ^b
1	46	28(60.9)	6(13.0) ^a	12(26.1) ^a	18(39.1) ^a
5	45	30(66.7)	6(13.3) ^a	9(20.0) ^b	15(33.3) ^b
10	43	31(72.1)	5(11.6) ^a	7(16.3) ^b	12(27.9) ^{bc}

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

Table 4. Number of total cell of porcine IVM/IVF embryos in NCSU23 supplemented with melatonin

Melatonin (nM)	Inner cell mass(ICM) (Means \pm S.E)	Trophectoder cell(TE) (Means \pm S.E)	Total cell no. of blastocysts (Means \pm S.E)
0	23.0 \pm 0.5 ^a	17.3 \pm 0.8 ^a	41.0 \pm 1.5 ^a
1	23.6 \pm 0.6 ^a	19.0 \pm 0.5 ^a	42.6 \pm 0.3 ^a
5	23.2 \pm 1.1 ^a	16.3 \pm 0.8 ^a	39.6 \pm 1.4 ^a
10	20.0 \pm 0.5 ^b	13.3 \pm 0.8 ^b	33.3 \pm 1.2 ^b

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

체외배양액인 NCSU 23에 각각 다른 농도의 melatonin을 첨가하여 체외수정란을 5~6일간 체외 배양하여 얻은 체외발육성적과 배반포 수정란의 세포수를 Table 3과

Table 4에 요약하였다.

Table 3의 결과에서 나타난 바와 같이 NCSU 23 배양액에 melatonin을 0, 1, 5 및 10nM을 첨가하여 체외배양을 실

시한 결과, 배반포기 까지 발육된 체외 발육성적은 17.8%, 26.1%, 20.0% 및 16.3%로서 melatonin 1nM 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며($P < 0.05$), 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적에서는 melatonin 1nM 첨가구가 39.1%로서 대조구 33.3%, 5nM 첨가구의 33.3% 및 10nM 첨가구의 27.9%보다 높은 발육율을 나타냈다.

Table 4는 NCSU 23 배양액에 melatonin을 0, 1, 5 및 10nM을 첨가하여 얻은 배반포기 수정란의 총 세포수를 조사한 결과로서 각각 41.0 ± 1.5 , 42.6 ± 0.3 , 39.6 ± 1.4 및 33.3 ± 1.2 로서 melatonin 10nM 처리구가 여타구보다 낮은 세포수를 나타내었다($P < 0.05$).

고찰

본 연구는 돼지 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후, 체외배양액에 항산화제인 aesculetin, taurine 및 melatonin을 첨가하여 항산화 효과를 비교 검토하였다.

세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포에 독성물질로 작용하는데, 이러한 과산화물(H_2O_2)을 환원시켜 세포의 독성을 제거하는데는 항산화물질(antioxidants)이 유효하나, 체내에서와 달리 체외에서는 이와 같은 항산화제가 배양액 내에 존재하지 않을 경우 세포의 성장을 억제한다(Murray 등, 1990).

포유동물 수정란의 체외 배양은 일반적으로 고농도의 산소조건(20% O_2)에서 실시하므로 체외 배양액에 free radical이 많이 발생해 수정란 발육에 유해한 영향을 주어 체외 발육이 억제된다. 이와 같은 체외 발육 억제 현상을 극복하기 위하여 체외 배양액내에 여러 종류의 항산화제를 첨가, 배양하여 좋은 성적을 얻고 있다. 포유동물 수정란의 체외 배양시 이용되는 항산화제로는 SOD, catalase, glutathione 등이 많이 이용되고 있으나, 최근에는 aesculetin, taurine 및 melatonin 등을 첨가, 배양하는 연구들이 시도되고 있다.

물푸레나무에서 추출할 수 있는 aesculetin은 체내에서 arachidonic acid의 산화반응에 항산화제로의 기능에 관한 연구와 lipoygenase와 cyclooxygenase의 억제로 인한 암발생 억제 인자로서의 작용 및 glutathione 대사작용과 lipid peroxidation의 항산화제로서 기능에 관한 보고가 있지만(Martin-Aragon 등, 1998; Matsunaga 등, 1998; Sekiya 등, 1982), 아직 aesculetin에 대한 많은 연구가 수행되지 않으며, 포유동물 체외수정란의 발육에 미치는 효과에 대해서는 많은 논문이 보고되지 않은 실정이다.

따라서, 본 연구에서 식물성 항산화제로서 aesculetin이 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과를 검토한 결과, aesculetin을 0, 1, 5 및 10 $\mu g/ml$ 로 첨가하였을 때 상실배기 이상 발육된 체외배양 성적은 10 μg 첨가구(35.7%)가 여타구(0 μg , 30.2%; 1 μg , 29.5%; 5 μg , 29.2%)보다 높은 성적을 얻었다. 장 등(2002)은 소 수정란의 체외발육에 미치는 효과를 검토한 결과 5% O_2 와 20% O_2 농도 조건하에서 CR1a 배양액에 aesculetin을 0, 1, 5, 10 $\mu g/ml$ 를 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외배양 성적은 5% O_2 농도 조건에서 각각 60.0%, 79.1%, 62.5% 및 57.5%로 나타났으며, 20%

O_2 농도 조건하에서는 각각 51.2%, 68.3%, 51.2% 및 52.2%로 나타나 O_2 농도와 관계없이 체외 배양액에 1 $\mu g/ml$ aesculetin 첨가구가 체외 발육 성적이 높은 것으로 나타난 것으로 보고하였다.

Taurine은 자성 생식도관의 분비액과 정액내에 높은 농도로 존재하며 정자의 수정능 획득과 체외수정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편 taurine은 설치류의 난관과 토끼 자궁에서는 아미노산의 주요 구성분자이며, 포유동물 수정란의 체외 배양액에서는 antioxidant, osmolyte, chelating agent로서 작용한다(Dumoulin 등, 1992; Li 등, 1993). taurine은 생쥐(Dumoulin 등, 1992), 토끼(Li 등, 1993) 및 돼지(Reed 등, 1996)의 수정란 배양액에 첨가되어 수정란의 체외 발육율을 향상시킨다고 보고되고 있다. Dumoulin 등(1992)이 생쥐 체외수정란을 배양한 결과 배반포기 이상 발육된 체외 발육율은 배양액내에 taurine 2.5mM 첨가구가 70%로서 대조구의 60%에 비하여 높았으며, Li 등(1993)은 토끼의 체외수정란을 RD 배양액에 적정량의 taurine을 첨가했을 때 배반포기 이상 발육율은 78%로서 대조구의 40%에 비하여 체외발육성적이 높았다고 보고하였다.

본 실험에서는 체외 배양액에 taurine을 0, 2.5 및 5.0mM을 첨가, 체외배양을 실시한 결과 상실배 이상의 체외 발육 성적은 26.1%, 26.9% 및 31.7%로서 taurine 5.0 mM 첨가가 체외수정란의 체외발육 성적이 유의적으로 높은 결과를 얻어 이들의 보고와 유사한 경향을 나타냈다.

Melatonin은 포유동물 수정란의 체외발달에서 세포의 분열과 세포주기에 영향을 주는 것으로 보고되었으며, 또한 포유동물 수정란의 체외 배양시 melatonin 첨가는 수정란의 체외 발육율을 증진시켜 ROS scavenger로서의 역할이 간접적으로 입증되었다(Okatani 등, 1997; Poeggeler 등, 1993; Reiter 등, 1993, 1995). melatonin의 낮은 농도는 mouse 수정란의 체외배양에서 독성이 없는 것으로 보고되었다(Ishizuka 등, 2000). Ishizuka 등(2000)은 생쥐 수정란에 melatonin($10^{-6}M$)의 첨가는 4 세포기에서 배반포 발달율을 증가시켰지만, 2 세포기 단계의 수정란에서는 영향을 주지 않는다고 보고하였고, melatonin의 $10^{-6}M$ 의 첨가에서는 모든 발육단계의 체외 발육율에 영향을 주었다고 보고하였다. 또한 Maestroni(1996)의 연구에 의하면 lipopolysaccharide(LPS)를 통한 동물 패혈증 모델에서 melatonin의 투여가 TNF- α , IL-1 β , INF- γ 와 같은 혈중 사이토카인 변화에는 영향이 없으며, 패혈증에서 중요한 역할을 하는 유리 산소기의 하나인 nitric oxide의 생산을 억제한다고 한다.

본 연구에서는 돼지 체외수정란의 체외 배양에 있어 체외 배양액에 melatonin을 0, 1, 5 및 10 nM을 첨가하여 체외배양을 실시한 결과, 배반포기 까지 발육된 체외 발육성적은 17.8%, 26.1%, 20.0% 및 16.3%로서 melatonin 1 nM (26.0%) 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈으며, 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적에서는 melatonin 1 nM 첨가구가 39.1%로서 대조구 33.3%, 5 nM 첨가구의 33.3% 및 10 nM 첨가구의 27.9%보다 높은 발육율을 나타냈다.

이상의 결과를 종합하여 보면 돼지 체외 수정란의 체외 배양시 체외 배양액내에 aesculetin, taurine 및 melatonin의 첨가는 수정란의 체외 발육율을 증가시켜 항산화제로서 작용하는 것이 간접적으로 증명되었다.

인용문헌

1. Bavister, B.D. 1988. Role of oviductal secretion in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology 29:143-154.
2. Cosby, I.M., Gandolfi, F. and Moor, R.M. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. J. Reprod. Fertil. 82:769-775.
3. Craven, P.A., Pfanstiel, J. and DeRubertis, F.R. 1986. Role of reactive oxygen in bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. J. Clin. Invest. 77: 850-859.
4. Dumoulin, J.C.M., Evers, J.L.H., Bras, M., Pieters, H. E.C. and Geraedts, J.P.M. 1992. Positive effect of taurine on preimplantation mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 94:373-380.
5. Hofmanova, J., Musilova, E. and Kozubik, A. 1996. Suppression of human cancer cell proliferation by lipoxygenase inhibitors and gamma-radiation *in vitro*. Gen Physiol. Biophys. 15:317-31.
6. Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Murai, K., Amemiya, A. and Itoh, M.T. 2000. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. J. Pineal. Res. 28:48-51.
7. 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.
8. Joenje, H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. Mut. Res. 291:193-208.
9. Leibfried, M.L. and Bavistar, B.D. 1981. Effect of epinephrine and hypotaurine on *in vitro* fertilization in the golden hamster. J. Reprod. Fertil. 4:57-63.
10. 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. 48:33-37.
11. Maestroni, G.J.M. 1996. Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. J. Pineal. Res. 20:84.
12. Martin-Aragon, S., Benedi, J.M. and Villar, A.M. 1998. Effects of the antioxidant (6,7-dihydroxycoumarin) esculetin on the glutathione system and lipid peroxidation in mice. Gerontology 44:21-25.
13. Matsunaga, K., Yoshimi, N., Yamada, Y., Shimizu, M., Kawabata, K., Ozawa, Y., Hara, A. and Mori, H. 1998. Inhibitory effects of mabumetone, a cyclooxygenase-2 inhibitor, and esculetin, a lipoxygenase inhibitor, on N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rat. Jpn. J. Cancer. Res. 89 (5):496-501.
14. Murraray, 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), 142-143
15. Okatani, Y., Watanabe, K., Wakatuki, A. and Sagara, Y. 1997. Melatonin inhibits vasopastic action of hydrogen peroxide in human umbilical artery. J. Pineal Res. 22:163-168.
16. Papaioannou, D.E. and EBERT, K.M. 1988. The preimplantation pig embryo; cell number ad allocation to trophoderm adn inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. Development 102: 793-803.
17. Poeggeler, B., Tan, D.X., Reiter, R.J., Chen, L.D., Chen, S., Manchester, L.C. and Barlow-Walden, L.R. 1993. Cancer. Lett. 70:65-71.
18. Reed, W.A., Suh, T. K., Bunch, T.D. and White, K.L. 1996. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver cells, BRL-Cell-Conditioned medium. Theriogenology 45:439-449.
19. Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E, Poeggeler, B., Barlow-Walden, L, Chuang, J., Ortiz, G. G. and Acuna-Castroviejo, D. 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. J. Pineal Res. 18:1-11.
20. Reiter, R.J. 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. Prog. Neurobiol. 56:359-384.
21. Reiter, R.J., Poeggeler, B., TAN, D.X., Dhen, L.D., Manchester, L.C. and Guerrero, J.M. 1993. Antioxidant activity of melatonin : A Novel action not requiring a receptor. Neuroendocrinol. Lett. 15:103-116.
22. Schoenbeck, R.A., Peter, M.S., Rickords, L.F., Stumpf, T.T. and Parther, 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.
23. Sekiya, K., Okuda, H. and Arichi, S. 1982. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by aesculetin. Bilchim. Biophys. Acta. 713:68-72.
24. Wang, W.H., Abeydeera, C.R, 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.
25. 장현용, 박기은, 김정익, 박춘근, 정희태, 양부근. 2002. 한우 수정란의 체외발육에 있어서 Aesculetin과 O₂ 농도의 영향. 한국가축번식학회지. 26(1):61-68. (접수일자: 2004. 3. 15. / 채택일자: 2004. 6. 18.)

Effects of Antioxidants on Porcine IVM/IVF Embryos

Jang, H. Y., J. Y. Oh, J. T. Kim, C. K. Park, H. T. Cheong, C. I. Kim, H. K. Lee, K. D. Choi and B. K. Yang
College of Animal Resources Science, Kangwon National University

ABSTRACT

The purpose of this study was performed to establish the *in vitro* culture system of porcine *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization(IVM/IVF) embryo. These studies was to determine the effects of antioxidants(aesculetin, taurine and melatonin) in porcine IVM/IVF embryos. In routine porcine IVM/IVF procedure, oocytes were cultured for 40~44h incubation in NCSU 23 medium and matured oocytes were inseminated with frozen semen. Then 2 to 8 cell embryos were removed cumulus cell and were allotted randomly to NCSU 23 containing different concentration of antioxidants in 5% O₂ and 5% CO₂ at 38.5°C. Cell numbers of blastocyst were also counted using double fluorescence stain method. Aesculetin were added to NCSU 23 medium at concentration of 1 ug, 5 ug, and 10 ug, when treated with 10 ug(35.7%) of aesculetin at the rate of embryos of the morula plus blastocysts were higher than those of any other groups (30.2%, 29.5% and 29.2%)($P < 0.05$). The developmental rates beyond morula stage of porcine embryos in NCSU 23 medium supplemented with taurine 0, 2.5 and 5.0 mM were 26.1%, 26.9% and 31.7%, respectively. The addition of 5.0 mM taurine was higher the developmental rate beyond morula stage than in any other groups. In NCSU 23 medium treated with melatonin 0, 1, 5 and 10 nM, the developmental rate of morula plus blastocysts were 33.3%, 39.1%, 33.3% and 27.9%, respectively. The developmental rate of morula and blastocysts treated with 1nM melatonin was higher than in any other groups($P < 0.05$). Cell numbers of blastocyst in NCSU 23 treated with melatonin 0, 1, 5 and 10nM were 41.0, 42.6, 39.6 and 33.0, respectively. These results indicate that aesculetin, taurine and melatonin can increase the developmental rate beyond the morulae and blastocysts in porcine embryos.

(Key words : Porcine embryo, Antioxidant, Aesculetin, Taurine, Melatonin)