

Catalase와 β -Mercaptoethanol이 돼지 태아섬유아세포 Clonal Lines의 배양에 미치는 영향

권대진 · 박선영 · 박춘근 · 양부근 · 김정익 · 정희태[†]
강원대학교 동물자원과학대학

Effects of Catalase and β -Mercaptoethanol on the Culture of Clonal Lines from Porcine Fetal Fibroblast Cells

D. J. Kwon, S. Y. Park, C. K. Park, B. K. Yang, C. I. Kim and H. T. Cheong[†]

College of Animal Resource Sciences, Kangwon National University

SUMMARY

This study was performed to examine the effects of catalase and β -mercaptoethanol (β ME) on the establishment of clonal lines from porcine fetal fibroblast cells. Fibroblasts derived from a pig fetus (Day 50) were passaged two times before use. A single cell was seeded in 96-well plates and cultured in medium supplemented with or without catalase or β ME. Cell colonies were passaged two times into 4-well dish. Cell lines with proliferating potential were classified as an established clonal cell line. In experience 1, the establishment efficiencies were examined by addition of catalase (100 ng/ml) or β ME (100 μ M) in culture medium. The establishment efficiency of β ME-added group (8.3%) was significantly higher than that of control group (3.2%, $P < 0.05$). However, catalase did not have a positive effect on the establishment efficiency. In experience 2, the establishment efficiencies were examined by addition of different concentrations of catalase (0~1,000 ng/ml) in culture medium. However, establishment efficiencies were not different among the different concentrations of catalase (0~2.6%). In experience 3, the establishment efficiencies were examined by addition of different concentrations of β ME (0~1,000 μ M) in culture medium. The establishment efficiency was significantly higher in 100 μ M β ME-added group (9.4%) compare to others (0~1.6%). The result of present study shows that the establishment efficiency of clonal cell lines can be enhanced by the culture in media supplemented with 100 μ M β ME. However, catalase did not have a positive effect on the establishment efficiency.

(Key words : clonal cell lines, catalase, β -mercaptoethanol, porcine fetal fibroblast cells)

서 론

체세포를 이용한 복제양의 생산(Willmut 등, 1997)에 이어, 여러 종에서 복제 산자가 태어났다

(Kato 등, 1998; Wakayama 등, 1998; Baguisi 등, 1999; Wells 등, 1999; Polejaeva 등, 2000; Shin 등, 2002). 특히, 돼지 복제의 성공은 형질전환 복제동물 및 장기이식용 donor로서 이용할 수 있다는 가

* 본 연구는 2003년도 농림기술개발사업 기획연구과제의 연구지원(300012-5)에 의해 수행되었음.

[†] Correspondence : E-mail : htcheong@kangwon.ac.kr

능성 때문에 그 의의가 크다 하겠다. 최근 Lai 등 (2002)과 Dai 등(2002)이 이종간 장기이식 시 초급 성 거부반응을 일으키는 α -1,3-galactosyltransferase gene을 불활성화 시킨 knockout pig의 생산에 성공한 이후 형질전환 복제 동물을 장기 이식용 donor로 이용할 수 있다는 가능성이 현실화 되고 있다. 형질전환 복제 동물을 생산하는데 있어 가장 유용한 기술 중 하나로 체세포를 이용한 핵이식 기술을 들 수 있으나, 이러한 기술의 이용 효율을 극대화시키기 위해서는 형질전환 혹은 knockout된 세포의 clonal lines를 확립하는 일이 선행되어야 할 것이다. 그러나 개개의 세포로부터 clonal line을 확립하는 일은 결코 쉬운 일이 아니어서 그 효율은 5% 미만으로 알려져 있다. 이러한 효율은 clonal lines들이 유래된 조직, 체외배양조건 및 기간 등에 의해 나타날 수도 있고, 배양세포의 크기, doubling time, 세포주기나 염색체 등의 세포학적 영향, 또는 DNA methylation 등의 유전자 발현의 차이에 기인할 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 세포학적 영향, 또는 유전자 발현에 영향을 미치는 요인으로 Reactive oxygen species(ROS)에 의한 세포의 산화적 손상을 들 수 있다.

포유동물의 모든 세포들은 산화·환원 반응 시 형성되는 활성 산소에 의해 세포막의 지질 과산화(lipid peroxidation), 효소 불활성화, DNA와 RNA 손상 등 유해한 영향을 받게 된다(Loven, 1988). 정상적인 세포는 ROS에 대하여 스스로를 보호하기 위해 독성체제와 방어체제가 안정한 상태에 있다. 만약 방어체제의 손상이나 과도한 ROS가 형성되면 산화스트레스와 세포사가 일어난다(Liu 등, 1999). 대부분의 세포는 배양시 hydrogen peroxide (H_2O_2 ; Goto 등, 1993)와 superoxide radicals(O_2^- ; Noda 등, 1991)등의 ROS 생산 증가로 인한 산화적 손상이 증가된다. 그러나 호기적 세포내에는 O_2^- 를 제거하고 H_2O_2 를 발생시키는 superoxide dismutase(SOD; Allen 등, 1998), H_2O_2 를 제거하는 catalase와 세포내 산화-환원 상태를 유지시키는 작용을 하는 glutathione(GSH; Chance 등, 1979)과 같은 항산화 작용물질이 있어 세포내 산화적 손상을 줄인다(Halliwell 등, 1995). 이와 관련하여 β -mercaptoethanol(β ME)의 첨가는 GSH 수준을 증가

시키고 세포성장을 향상시켜 cystine 흡수능력이 부족한 세포에 있어서의 cystine의 흡수를 촉진시킨다(Ishii 등, 1981a; Janjic 등, 1992; Ohmori 등, 1993). β ME의 성장촉진효과는 산화 스트레스로부터 세포가 보호되도록 세포의 내·외부에 산화-환원상태를 유지시키는 것과 관련되어 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 clonal cell lines을 효율적으로 확립할 수 있는 방법을 제시하기 위하여 배양액 내에 catalase와 β ME 첨가가 clonal cell line 확립 효율에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 태아섬유아세포의 분리, 배양 및 보존

임신 50일령의 암태지에서 태아를 적출하여 멸균한 생리식염수로 세척한 후 머리와 내장을 제거하고, 나머지 몸 조직을 안과용 가위로 잘게 썰어 37°C의 0.05% trypsin-EDTA가 함유된 PBS액 내에 30분동안 정치시켜 효소처리에 의한 분리를 유도하였다(Willmut 등, 1997). 2~3회 반복 후 상층액을 15 ml 원심관으로 옮겨 500×g에서 5분간 원심 분리하여 분리된 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 1×10^5 cells/ml 세포 농도로 10% FBS와 50 μ l/ml gentamycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco-BRL Grand Island, NY, USA)액에 재 부유시켜 50 ml 배양병 내에 넣어 5% CO_2 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 세포가 약 90% 정도 confluency 되었을 때 passage를 실시하였다. 2회 passage한 세포는 10% dimethylsulfoxide (DMSO)가 포함된 FBS에 부유시켜 냉동 vial에 넣은 후 동결하여 LN_2 용기 내로 이동하여 보관하였다.

2. Clonal Cell Line의 확립

동결된 돼지 태아 섬유아세포를 용해하여, 각각의 세포를 96-well plate에 seeding하였다. 기본 배양액인 10% FBS가 포함된 DMEM 액에 0~1,000 ng/ml catalase와 0~1,000uM β ME를 첨가하여 세포 배양액으로 사용하였다. 세포는 5% CO_2 및 37°C의 조건에서 배양하였으며 7~14일 후 세포가 dish의 저면에 단층을 형성하면 trypsin 처리에 의해 회수하여 4-well dish로 옮겨 2회의 passage를 반복한

다음 이후 배양이 가능한 세포를 clonal cell line이 확립된 것으로 판정하였다.

다중검정을 이용하였다.

결 과

3. 실험설계

실험 1: Clonal line 확립효율에 미치는 catalase와 β ME의 효과를 검토하기 위하여 세포를 100ng/ml catalase와 100uM β ME가 첨가된 DMEM액 내에서 배양하여 clonal line 확립효율을 검토하였다.

실험 2: 기본배양액에 0, 10, 100, 1,000ng/ml의 농도로 catalase를 첨가하여 catalase 농도에 따른 clonal line 확립효율을 검토하였다.

실험 3: 기본배양액에 0, 10, 100, 1,000uM의 농도로 β ME를 첨가하여 β ME 농도에 따른 clonal line 확립효율을 검토하였다.

4. 통계 분석

각각의 실험구에 있어서 평균의 차이에 대한 유의성 판정은 SAS의 GLM 절차를 통한 Duncan의

1. Catalase와 β ME의 영향

배양액 내 catalase와 β ME의 첨가가 clonal cell line의 확립에 미치는 영향을 검토한 결과, clonal cell line의 확립에 있어서 대조구(3.2%)에 비하여 catalase를 첨가한 경우(3.6%)는 유의적인 차이가 없었으나 β ME를 첨가한 경우는 확립된 cell line이 8.3%로 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났다. 그러나 세포의 부착율은 62.4~66.1%로 모든 처리구에서 차이가 없었다(Table 1).

2. Catalase 농도에 따른 영향

Clonal cell line의 확립에 있어서 catalase 첨가 수준에 따른 영향을 검토하였다. Catalase 농도를 0~1,000ng/ml 첨가한 결과 확립된 cell line이 0~2.6%로 모든 그룹 간에 차이가 없었다(Table 2).

Table 1. Effects of catalase and β ME on the culture of clonal cell lines

Treatment*	No. of seeded cells	No. of cell line (%)			
		Adhesion	Passage 1	Passage 2	Established
Control	189	118(62.4)	30(15.9) ^a	10(5.3) ^a	6(3.2) ^a
Catalase	192	121(63.0)	33(17.2) ^a	12(6.3) ^a	7(3.6) ^{ab}
β ME	192	127(66.1)	64(33.3) ^b	30(15.6) ^b	16(8.3) ^b

*100ng/ml Catalase and 100uM β -mercaptoethanol.

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

Table 2. Effect of catalase concentration on the culture of clonal cell lines

Catalase con.(ng/ml)	No. of seeded cells	No. of cell line (%)			
		Adhesion	Passage 1	Passage 2	Established
0	192	106(55.2)	27(14.1)	6(3.1) ^{ab}	4(2.1)
10	192	105(54.7)	20(10.4)	2(1.0) ^b	0
100	192	94(50.0)	24(12.8)	5(2.7) ^{ab}	4(2.1)
1,000	192	127(66.2)	28(14.6)	8(4.2) ^a	5(2.6)

^{a,b} Values with different superscripts differ ($P<0.05$).

3. β ME 농도에 따른 영향

Table 3은 β ME 첨가 수준에 따른 clonal cell line의 확립효율을 나타낸 것으로, 0~1,000uM β ME를 첨가하여 배양 효과를 검토한 결과, 100uM 농도로 첨가하였을 때 세포 부착율(75.0%) 및 cell line 확립효율(9.4%)에 있어 타 처리구(1~56% 및 0~1.6%)보다 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 특히, 1,000uM의 농도로 β ME를 첨가 시 세포부착율 및 cell line 확립 효율이 극히 저하되는 것으로 나타났다.

고 찰

일반적인 세포에 있어서 체외배양 시 체내 환경에서 보다 O_2 의 농도가 높게 유지되기 때문에 ROS의 생성이 증가하게 된다. 이러한 ROS는 세포의 유전물질에 작용하여 유전자의 전사 양상(Larson 등, 1992), 염색체 구조의 변화(Phillips 등, 1984), 유전자의 비정상적 발현(Suzuki과 Hci, 1996) 및 세포 표현형의 변화를 유발(McBride 등, 1991) 하는 등 세포의 생존에 대한 다양한 형태의 치명적 손상을 유발하며, 결과적으로, 축적된 ROS로 인해 세포사가 일어날 수 있다(Liu 등, 1999).

Catalase는 ROS의 일종인 세포내 H_2O_2 를 분해할수 있는 항산화 효소이다(Chance 등, 1979). Rossman 등(1998)은 저 농도의 혈청첨가($<0.25\%$) 배지에서 세포배양 시 catalase(100ng/ml)의 첨가는 자발적인 유전적 변이를 감소시킬 수 있으나 세포의 발육에는 영향이 없었다고 보고하였다.

Balin 등(2001)의 연구에서도 태아와 성체의 피부 세포를 이용한 실험에서 태아세포 내의 항산화 억제 효소가 성체세포에서보다 더 적었음에도 불구하고 성장률에 있어서 유의적인 차이가 없었다. 본 실험에서도 위의 결과와 같이 catalase 첨가 clonal line의 확립 효율에 아무런 영향이 없는 것으로 나타나 세포배양 시 catalase가 세포의 유전적 변이를 줄일 수 있을지는 몰라도 세포의 성장률에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 생쥐 수정란 배양에서 Nasr-Esfahani 등(1990)은 catalase 첨가 시 생쥐 수정란에서 H_2O_2 를 감소시키는 효과가 없었으며, catalase 첨가가 토끼 수정란 발육에 있어 어떠한 영향도 미치지 않는다고 보고되어(Li 등, 1993) 수정란의 배양에서도 발육을 향상시키지 않는 것으로 보인다.

반면, 본 실험에서 β ME를 첨가하였을 때 clonal line 확립효율이 대조구 및 catalase 첨가구 보다 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). β ME는 포유동물 세포의 체외배양 시 이로운 효과를 가지고 있는 여러 thiol 화합물 중 가장 효과적인 물질이며, 여러 동물세포의 체외 배양에서 생존능력(Broome 등, 1972; Click 등, 1972), 항체 형성(Click 등, 1972), 그리고 배반포 발달(Heber-Katz 등, 1973)을 향상시킨다. 특히 여러 종류의 설치류(Broome 등, 1972; Broome 등, 1973; Pourreau-Schneider, 1975; Toohey, 1975; Oshima, 1978) 및 사람(Hamburger 등, 1977; Claesson 등, 1978; Epstein 등, 1979) 세포들은 β ME에 의해 colony 형성이나 세포의 성장이 향상된다. 체세포를 이용한 연구에서 β ME는 세

Table 3. Effects of β -mercaptoethanol concentration on the culture of clonal cell lines

β ME* con.(uM)	No. of seeded cells	No. of cell lines (%)			
		Adhesion	Passage 1	Passage 2	Established
0	192	102(53.1) ^b	17(8.9) ^{ab}	2(1.0) ^b	0 ^b
10	192	109(56.8) ^b	26(13.5) ^a	6(3.1) ^b	3(1.6) ^b
100	192	144(75.0) ^a	64(33.3) ^a	32(16.7) ^a	18(9.4) ^a
1,000	192	2(1.0) ^c	0 ^b	0 ^b	0 ^b

* β -mercaptoethanol.

^{ab} Values with different superscripts in the same column differ ($P<0.05$).

포의 cysteine 이용과 GSH 합성에 관여하여(Ishii 등, 1981b; Janjic 등, 1992; Ohmori, 1993) 세포의 발육 동안에 배양액과 세포질 내 cysteine의 지속적인 이용을 가능하게 함으로써 세포내 GSH 수준을 유지시킨다(Ishii 등, 1981b). GSH는 산화 스트레스로부터 세포를 보호하기 위해 세포내의 산화환원상태를 유지시키며(Gardner와 Reed, 1994; Takahashi, 1996), 결과적으로, 세포의 apoptosis를 조절하는 기작에 있어 중요한 역할을 가지고 있을 것으로 보고되었다(Boggs 등, 1998). 그러나 GSH 합성은 세포 외부의 cysteine의 유효성에 크게 의존하고 있다(Ishii 등, 1981a,b; Rathbun, 1991). Cysteine은 GSH 합성 시에 합성 비율을 제한하는 물질(Ishii 등, 1981b)로 일반적인 배양조건 하에서 쉽게 산화되어 cysteine의 이량체인 cystine으로 전환된다(Toohey, 1975; Sagara 등, 1993). Cysteine이 cystine으로 전환되면, lymphocytes 같은 몇몇 세포들의 경우에는 cystine의 낮은 이용성으로 인하여 GSH 결핍과 성장저해(Gmünder 등, 1991)가 초래된다. 그러나 β ME는 체외 배양액 내에서 cystine과 반응하여 cystine를 cysteine으로 전환시킨다(Ishii 등, 1981a). 따라서 β ME와 같은 thiol 화합물의 첨가로 cystine 흡수 능력이 부족한 세포에서 cystine 이용을 촉진시켜 GSH 수준과 세포 성장을 향상시킬 수 있다(Ishii 등, 1981a; Janjic 등, 1992; Ohmori 등, 1993). 본 실험 결과 비록 세포의 cystine 이용성이나 세포내 GSH 합성 정도를 확인하진 않았지만 β ME의 첨가 시 높은 colony 형성과 clonal cell 확립효율을 얻은 수 있었던 이유는 β ME의 이러한 작용 때문이라 여겨진다.

본 연구결과 배양액내 100 μ M β ME를 첨가로 clonal line의 확립 효율을 높일 수 있었으며, clonal line 확립의 궁극적인 목적으로 볼 때 이후 β ME를 첨가하여 확립된 세포를 핵이식에 이용 시 발육 및 생존성에 있어서 효과적일 것이라 사료된다. 이후 연구에서는 이러한 세포의 형태적, 세포학적 특징에 대해 명확하게 검토되어야 할 것이다.

적 요

본 연구에서는 clonal cell lines을 효율적으로 확

립할 수 있는 방법을 제시하기 위하여 배양액 내에 catalase와 β ME 첨가가 clonal cell line 확립 효율에 미치는 영향을 검토하였다.

임신 50일령의 암태지에서 얻은 태아섬유아세포를 2회 passage한 후 동결 보관하였다가 실험에 이용하였다. 단일세포를 catalase나 β ME가 첨가된 배양액이 들어 있는 96-well dish로 옮겨 배양하였다. 단층이 형성된 세포는 4-well dish로 옮겨주어 배양하였으며, 이후 2회 이상 passage가 가능한 세포를 clonal line이 확립된 세포로 판정하였다. 실험 1에서 clonal line 확립효율에 미치는 catalase와 β ME의 효과를 검토하기 위하여 세포를 100ng/ml catalase와 100nM β ME가 첨가된 DMEM액 내에서 배양하여 clonal line 확립효율을 검토하였다. β ME 첨가 시 clonal line 확립효율이 8.3%로 대조구의 3.2%에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P < .05$). 그러나 catalase 첨가 시(3.6%)에는 대조구와 차이가 없었다. 실험 2에서 catalase 농도(0, 10, 100, 1,000ng/ml)에 따른 clonal line 확립효율을 검토하였다. 대조구에 비하여 모든 처리구에서 clonal line 확립 효율에 대한 첨가효과가 없었다(0~2.6%). 실험 3에서 β ME 농도(0, 10, 100, 1,000 nM)에 따른 clonal line 확립효율을 검토하였다. 100 nM의 β ME 첨가 시 clonal line 확립 효율이 9.4%로 대조구 및 타 처리구(0~1.6%)보다 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$).

본 연구 결과 배양액 내 catalase 첨가는 확립효율에 영향을 미치지 않지만, 100nM의 β ME 첨가로 clonal cell line의 확립효율을 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Allen RG. 1998. Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. *Age*, 21:47-76.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Over-

- strom EW and Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, 17:456-461.
- Balin BJ and Appelt DM. 2001. Role of infection in Alzheimer's disease. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, 101:1-6(Rev).
- Boggs SE, McCormick TS and Lapetina EG. 1998. Glutathione levels determine apoptosis in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247:229-233.
- Broome JD and Jeng MW. 1972. Growth stimulation of mouse leukemia cells by thiols and disulfides *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 49: 579-581.
- Broome JD and Jeng MW. 1973. Promotion of replication in lymphoid cells by specific thiols and disulfides *in vitro*. Effects on mouse lymphoma cells in comparison with splenic lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 138:574-592.
- Chance B, Sies H and Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59:572-905.
- Claesson MH, Andersen V and Sonderstrup-Hansen G. 1978. Colony formation by subpopulations of human T lymphocytes. I. Effects of phytohaemagglutinin and lymphocytosis-promoting factor from *Bordetella pertussis*. *Clin. Exp. Immunol.*, 34:364-373.
- Click RE, Benck L and Alter BJ. 1972. Enhancement of antibody synthesis *in vitro* by mercaptoethanol. *Cell Immunol.*, 3:155-160.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA and Ayares DL. 2002. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.*, 20:251-255.
- Epstein AL and Kaplan HS. 1979. Feeder layer and nutritional requirements for the establishment and cloning of human malignant lymphoma cell lines. *Cancer Res.*, 39:1748- 1759.
- Gardner CS and Reed DJ. 1994. Status of glutathione during oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.*, 51: 1307-1314.
- Gmünder H, Eck HP and Dröge W. Low membrane transport and mitogenically stimulated human lymphocyte preparations and human T cell clones. *Eur. J. Biochem.*, 201:113-117.
- Goto Y, Noda Y, Mori T and Nakano M. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radic. Biol. Med.*, 15:69-75.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 125-126.
- Hamburger NW and Salmon SE. 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197:461-463.
- Heber-Katz E and Click RE. 1972. Immune responses *in vitro*. V. Role of mercaptoethanol in the mixed-leukocyte reaction. *Cell Immunol.*, 5:410-418.
- Ishii T, Bannai S and Sugita Y. 1981a. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 256: 12387-12392.
- Ishii T, Hishinuma I, Bannai S and Sugita Y. 1981b. Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells *in vitro* by feeder layer or 2-mercaptoethanol. *J. Cell Physiol.*, 107:283-293.
- Janjic D and Wollheim CB. 1992. Effect of 2-mercaptoethanol on glutathione levels, cystine uptake and insulin secretion in insulin-secreting cells. *Eur. J. Biochem.*, 210:297-304.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H and Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282:2095-2098.

- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Sameel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ and Prather RS. 2002. Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295(5557): 1089-1092.
- Larson RA, Lloyd RA, Marley KA and Tuveson RW. 1992. Ferric-ion-photosensitized damage to DNA by hydroxyl and non-hydroxyl radical mechanism. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol. Reprod.*, 14:245-247.
- Li J, Foote RH and Simken M. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 48:33-37.
- Liu L, Trimarchi JR and Keefe DL. 1999. Thiol oxidation-induced embryo cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. *Biol. Reprod.*, 61:1162-1169.
- Loven DP. 1988. A role for reduced oxygen species in heat induced cell killing and the induction of thermotolerance. *Med. Hypotheses*, 26: 39-50.
- McBrde TJ, Preston BD and Loeb LA. 1991. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry*, 30: 207-213.
- Nasr-Esfahani M, Aitken JR and Johnson MH. 1990. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development*, 109:501-507.
- Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J and Mori T. 1991. Involvement of Superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Fertil.*, 96:219-231.
- Ohmori H and Yamamoto I. 1993. Mechanism of augmentation of the antibody response *in vitro* by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. *Cell Immunol.*, 79:173-185.
- Oshima R. 1978. Stimulation of the clonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cells by beta-mercaptoethanol. *Differentiation*, 11:149-155.
- Phillips BJ, James TEB and Anderson D. 1984. Genetic damage in CHO cells exposed to enzymically generated active oxygen species. *Mutat. Res.*, 126:265-271.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KHS. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407:86-90.
- Pourreau-Schneider N. 1975. *In vitro* growth promotion of rat leukemia L5222 cells in the presence of 2-mercaptoethanol. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55:1467-1469.
- Rathbun WB and Murray DL. 1991. Age-related cysteine uptake as rate limiting in glutathione synthesis and glutathione half-life in the cultured human lens. *Exp. Eye Res.*, 53: 205-212.
- Rossmann TG and Goncharova EI. 1998. Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein. *Mutat. Res.*, 402:103-110.
- Sagara J, Miura K and Bannai S. 1993. Cysteine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J. Neurochem.*, 61:1667-1671.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L and Westhusin M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415:859.
- Suzuki K and Hei TK. 1996. Induction of heme oxygenase in mammalian cells by mineral fibers: Distinctive effect of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*, 17:661-667.
- Takahashi H, Kuwayama M, Hamano S, Takahashi M, Okano A, Kadokawa H, Karyu T and Nagai T. 1996. Effect of β -mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos

- during long-distance transportation in plastic straw. *Theriogenology*, 46:1009-1015.
- Toohey JJ. 1975. Sulfhydryl dependence in primary explant hematopoietic cells. Inhibition of growth *in vitro* with vitamin B₁₂ compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:73-77.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR and Yanagimachi R. 1998 Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- Wells DN, Misica PM and Tervit HR. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 60:996-1005.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
-
- (접수일: 2004. 6. 20 / 채택일: 2004. 8. 29)