

Nitric Oxide 화합물 첨가가 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과

장현용 · 김중택 · 박춘근 · 정희태 · 김정익 · 양부근

강원대학교 동물자원과학대학

초 록

체외수정 후 체외배양 48시간에 난구세포의 제거 유·무에 따라 CR_{1aa} 배양액에 hemoglobin을 0, 1, 5 µg/ml를 첨가한 구의 상실배기 이상 체외발육성적은 난구세포를 제거한 구에서 23.8%, 33.3% 및 26.8%였으며, 난구세포를 제거하지 않은 구에서는 각각 39.5%, 54.8% 및 48.8%로서 난구세포를 제거하지 않은 구에 Hb를 1 µg/ml를 첨가한 구가 여타구보다 통계적으로 높은 결과를 얻었다($P < 0.05$). 체외수정 후 체외배양 96시간 후 난구세포를 제거 유·무에 따라 Hb를 0, 1, 5 µg/ml를 첨가하였을 때, 상실배기 이상 체외발육성적은 난구세포를 제거한 구에서 각각 28.6%, 46.2% 및 39.1%였으며, 난구세포를 제거하지 않은 구에서는 각각 33.9%, 67.2% 및 46.0%로서, 난구세포를 제거하지 않은 구에 Hb를 1 µg/ml 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$). CR_{1aa} 배양액에 L-NAME를 0, 10, 50 및 100 mM을 첨가한 구에서 상실배기 이상 발육된 체외발육성적은 각각 55.6%, 64.9%, 58.8% 및 66.7%로써 L-NAME 첨가구가 무첨가구에 비해 커다란 차이가 나타나지 않았다($P > 0.05$).

모든 처리구에 배반포까지 발육된 체외수정란의 세포수에는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

(주제어 : Bovine IVM/IVF embryos, Hemoglobin, L-NAME, CR_{1aa}, Nitric oxide)

서 론

최근에 Nitric oxide(NO)는 생식계를 포함한 다양한 생리체계에 중요한 조절자로서 인식되고 있다(Chatterjee 등, 1996 ; Moncada 등, 1991 ; Shukovski와 Tsafiriri 1994 ; Yallampalli 등 1993, 1994, 1998). Fostermann 등(1991)은 NOS를 Ca²⁺/calmodulin - dependent isotype과 Ca²⁺/calmodulin - independent isotype으로 구분하였다.

그 하나가 세포 내에 항상 존재하는 constitutive NOS (cNOS)로 신경세포에 있는 nNOS(Bredt 등, 1990)와 endothelial 세포에 있는 eNOS(Beckman 등, 1990)이다. 이들 효소활성은 세포내 calcium/calmodulin dependent의 농도에 의해 조절되며 생물학적 기능은 주로 신경전달물질(neurotransmitter)로 작용하여 동물의 기억력을 보강시켜 주는 기능을 하거나 혈관의 이완작용을 통하여 혈압을 하강시키는 기능을 갖고 있다. 또 하나의 calcium/calmodulin independent isotype은 주로 대식세포, 간세포(hepatocyte) 및 smooth muscle cell 등에서 면역활성제인 cytokine이나 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유발되는 유도성 효소인 inducible NOS (iNOS ; Hibbs 등, 1987)이다. iNOS에 의해서 생성된 NO는 유익한 물질로 선택적, 특이적으로 암세포를 사멸시키거나 감염된 세균을 죽이는 기능을 하고 있을 뿐만 아니라(Hibbs 등, 1989), 여러 가지 질병 즉 neuronal degenerative disease, 조직 및 기관 손상, 동맥경화 등을 유발시키는 기능을 가진 물질로 보고되고 있다

(Beckman 등, 1990 ; Bredt 등, 1990 ; Ischiropoulos 등, 1992).

포유동물의 수정란에 있어서 NO 대사의 증가는 수정란 발육을 억제하며(Lim 등, 1998), NO는 발육시기별 수정란 발달에 여러 대사작용에 영향을 주는 것으로 보고되어 있으며(Lim 등, 1999), 생쥐에서는 초기수정란의 체외발육에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다(Fukuda 등, 1996). 체외수정란의 체외배양시 배양액 내에 NO scavenger인 Hemoglobin을 첨가, 체외배양함으로써 체외수정란의 발육억제현상을 극복시켜 체외발육율을 향상시켰으며(Lim 등, 1999), 배양액 내에 난구세포의 공배양과 혈청을 첨가한 배양액 내에 nitric oxide scavenger(hemoglobin)와 inhibitor(L-NAME)를 첨가시, 초기수정란 발달에 미치는 영향을 검토한 결과, NO 화합물은 체외 발육율과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다(Lim 등, 1999).

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8 세포기 수정란을 체외배양액인 CR_{1aa}에 일정량의 NO 화합물의 scavenger와 inhibitor인 hemoglobin과 L-NAME를 첨가 배양이 체외발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

난포란의 채취 및 성숙 배양

[†] Corresponding author : College of Animal Resources Science, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon-Do, 200-701, Korea, TEL: 82-33-250-8623, E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

도축장에서 회수한 소의 난소를 2시간 이내에 실험실로 운반한 후, 직경이 2~7 mm의 난포로부터 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난포란은 실체현미경 하에서 난자 주위의 난구세포가 균일하게 둘러싸여 있는 것만을 선별하여, Dubelcco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS; Gibco, U.S.A)에 polyvinyl alcohol(PVA)이 첨가된 난소 운반액(PBS-PVA)과 난자 성숙용 배양액(TC-199, Gibco)으로 각각 2회 세척 후 성숙배양에 이용하였다.

난포란의 성숙배양을 위하여 TC-199(Sigma) 배양액에 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 호르몬(FSH 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LH 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 Estradiol 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma)이 함유된 성숙배양액을 만든 후 20~22시간 배양하여 성숙된 난포란을 선별한 후 실험에 공용하였다.

난포란의 체외수정

동결정액(0.5 ml)을 37°C의 항온수조에서 용해한 후, 10 mM caffeine(Sigma)이 함유된 Brackett와 Oliphant 배양액(BO 배양액, 1975)과 혼합, 원심분리(1,500 rpm, 10분)로 2회 세척 후 정자의 농도가 2.5×10^6 정자/ml가 되도록 정자 부유액을 준비하였다.

체외수정액은 BO 배양액에 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin(Sigma)과 20 mg/ml bovine serum albumin(BSA; Sigma)을 첨가해 배양접시 내에 50 μl 의 소적을 만든 후, 체외에서 성숙시킨 난포란을 선별하여 10개씩을 소적의 체외배양액에 옮긴 후 상기 방법으로 준비한 정액 50 μl 를 수정배양액 내에 첨가해 체외수정을 실시하였다. 수정 후 6~8시간에 CR_{1aa}(Rosenkrans와 First, 1991) 배양액으로 2~3회 세척한 후 44~48시간 동안 체외배양을 실시하여 생산된 2~8세포기 체외수정란을 난구세포를 제거한 후 체외발육 실험에 공용하였다.

체외수정란에 Nitric Oxide의 화합물 첨가배양

체외수정 후 44~48시간에 난구세포를 제거한 2~8 세포기의 체외수정란과 제거하지 않은 2~8 세포기의 체외수정란을 단순배양액인 CR_{1aa} 배양액에 nitric oxide scavenger인 hemoglobin(Sigma)을 체외배양을 48시간과 96시간에 0, 1, 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가하여 체외배양을 실시하여 nitric oxide scavenger의 적정농도를 조사하고, 체외배양 시간에 따른 hemoglobine의 첨가가 체외수정란의 체외발육율에 미치는 효과를 검토하였다. 또한 nitric oxide inhibitor인 L-NAME(Sigma) 0, 10, 50 및 100 mM을 체외배양 48시간에 첨가하여 5~6일간 체외배양을 실시하여 효과를 검토하였으며, 체외수정 후 생산된 배반포기 수정란의 일부를 형광염색에 의하여 세포수를 조사하였다.

체외수정란의 세포수 조사

체외수정란의 세포수 조사는 Papaioannou와 Ebert (1988)의 이중형광염색방법을 수정보완하여 조사하였다. 체외수정란의 투명대를 0.5% hyaluronidase(Sigma)에 처리하여 용해시킨 후, TNBS acid-PBS (1 : 9)와 3 mg/ml PVP액에 넣어 4°C에서 10분간 처리한 후, Anti-DNP-BSA (1 : 10)액내에서 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342(Sigma)와 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (Sigma)에서 4~5분간 염색을 실시하였다. slide glass 위에 3 μl mounting 용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 염색된 수정란을 옮긴 후, cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 400배 형광현미경하(Ziess, Germany)에서 내세포피와 영양배엽의 세포수를 조사하였다.

각 처리구의 체외수정란의 세포수 조사는 3회 이상 실시하였으며, 각 실험마다 5개 이상의 배반포기 수정란을 이용하였다.

통계

본 실험에서 얻어진 결과는 SAS 통계 package program을 이용하여 분석하였고, Duncan의 다중범위 검정방법을 실시하여 처리간 유의성을 검토하였다.

결 과

소 난포란을 회수하여 체외수정시킨 후 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR_{1aa}에 각각 다른 농도의 nitric oxide scavenger인 hemoglobin을 체외배양 48시간에 첨가하여 체외배양한 후 얻은 체외발육 성적과 배반포기 세포수를 Table 1과 Fig. 1에 요약하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이 CR_{1aa} 배양액에 hemoglobin을 체외배양 48시간에 0, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 난구세포를 제거한 구와 제거하지 않은 구에서 상실배기 이상 체외발육 성적은 각각 23.8%, 33.3% 및 26.8%와 39.5%, 54.8% 및 48.8%로서 난구세포를 제거하지 않은 구의 Hb 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 구가 여타구에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$). 한편 난구세포의 유·무에 대한 효과는 상실배기 이상 발육된 체외수정란의 체외발육 성적은 28.0% (35/125)와 47.6%(60/126)로서 난구세포를 제거하지 않은 구의 상실배기 이상 발육성적이 높은 결과를 얻었고 ($P < 0.05$), 또한 CR_{1aa} 배양액에 난구세포의 유무와 관계없이 Hb를 0, 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가하였을 경우, 상실배기 이상의 체외발육 성적이 31.8%, 44.1% 및 37.8%로서 Hb를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가구가 여타구에 비해 통계적으로 높은 발육성적을 얻었다($P < 0.05$).

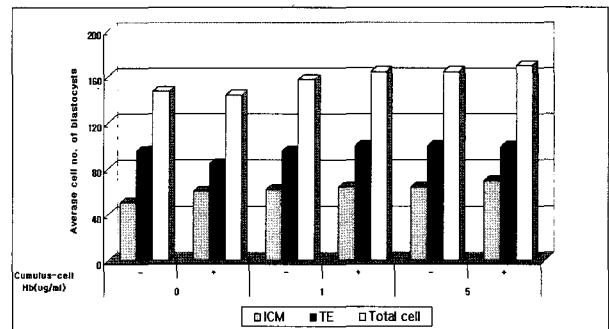


Fig. 1. Number of inner cell mass and trophectoderm cell of bovine IVM/IVF embryos in CR_{1aa} plus nitric oxide scavenger with or without cumulus cells at 48hr for *in vitro* culture.

Table 1. Effect of nitric oxide scavenger on the development of bovine IVM/IVF embryos cultured in CR_{1aa} supplemented with hemoglobin at 48hr for *in vitro* culture

Hb ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Presence(+) or absence(-) of Cumulus-cell	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to (%) :			No. of morulae plus blastocysts (%)
			Pre-morula	Morula	Blastocysts	
0	-	42	32(76.2) ^a	3(7.1) ^a	7(16.7) ^d	10(23.8) ^c
	+	43	26(60.5) ^{ab}	6(14.0) ^a	11(25.6) ^d	17(39.5) ^{bc}
1	-	42	28(66.7) ^b	6(14.3) ^a	8(19.1) ^b	14(33.3) ^b
	+	42	19(45.2) ^c	6(14.3) ^a	17(40.5) ^a	23(54.8) ^a
5	-	41	20(48.8) ^{ab}	3(7.3) ^a	8(19.5) ^{cd}	11(26.8) ^{bc}
	+	41	21(51.2) ^b	6(14.6) ^a	14(34.6) ^{bc}	20(48.8) ^b
Over all means						
	-	125	90(72.0) ^a	12(9.6) ^a	23(18.4) ^a	35(28.0) ^b
	+	126	66(52.4) ^b	18(14.3) ^a	42(33.3) ^b	60(47.6) ^a
0		85	58(68.2) ^a	9(10.6) ^a	18(21.2) ^b	27(31.8) ^b
1		84	47(55.6) ^b	12(14.3) ^a	25(29.8) ^a	37(44.1) ^a
5		82	41(50.0) ^b	9(11.0) ^a	22(26.8) ^{ab}	31(37.8) ^b

^{a,b,c} Means with different superscripts within treatment groups are significantly differ, $P < 0.05$.

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 CR_{1aa} 배양액에 난구세포를 제거하지 않은 구와 제거한 구에 Hb를 체외배양 48시간 후 0, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 구의 배반포 수정란의 내세포괴 세포수(Mean \pm SE)는 각각 51 \pm 9.8, 60 \pm 12.6, 62 \pm 6.7와 64 \pm 9.5, 64 \pm 4.6 및 70 \pm 16.7, 영양배엽의 세포수는 각각 96 \pm 5.3, 84 \pm 12.8, 96 \pm 6.1와 100 \pm 3.8, 100 \pm 8.1 및 99 \pm 2.5로 나타났으며, 총세포수는 각각 147 \pm 8.6, 144 \pm 24, 158 \pm 9.9와 164 \pm 6.5, 164 \pm 9.7 및 169 \pm 14.7로서 난구세포를 제거하지 않은

구에 있어 Hb 첨가구가 무첨가구에 비해 다소 높은 경향을 나타냈지만 통계적 유의성은 나타나지 않았다($P > 0.05$). 체외수정 후 체외배양 96시간에 체외배양액인 CR_{1aa}에 각각 다른 농도의 hemoglobin을 첨가하여 체외배양 후 얻은 체외발육 성적과 배반포기 세포수를 Table 2 및 Fig. 2에 요약하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이 난구세포를 제거하지 않은 구와 제거한 구에 체외배양 96시간 후에 Hb를 0, 1 및 5 μg

Table 2. Effects of nitric oxide scavenger on the development of bovine IVM/IVF embryos cultured in CR_{1aa} supplemented with hemoglobin at 96hr for *in vitro* culture

Hb ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Presence(+) or absence(-) of Cumulus-cell	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to (%) :			No. of morulae plus blastocysts (%)
			Pre-morulae	Morulae	Blastocysts	
0	-	63	45(71.4) ^a	6(9.5) ^a	12(19.1) ^d	18(28.6) ^c
	+	65	43(66.2) ^a	8(12.3) ^a	14(21.5) ^d	22(33.9) ^{bc}
1	-	65	35(53.9) ^b	4(6.2) ^a	26(40.0) ^b	30(46.2) ^b
	+	64	21(32.8) ^c	6(9.4) ^a	37(57.8) ^a	43(67.2) ^a
5	-	64	39(60.9) ^{ab}	7(10.9) ^a	18(28.1) ^{cd}	25(39.1) ^{bc}
	+	63	34(54.0) ^b	6(9.5) ^a	23(36.5) ^{bc}	29(46.0) ^b
Over all means						
	-	192	119(62.0) ^a	17(8.9) ^a	56(29.2) ^b	73(38.0) ^b
	+	192	98(51.0) ^b	20(10.4) ^a	74(38.5) ^a	94(49.0) ^a
0		128	88(68.8) ^a	14(10.9) ^a	26(20.3) ^c	40(31.3) ^c
1		129	56(43.4) ^c	10(7.8) ^a	63(48.8) ^a	73(56.6) ^a
5		127	73(57.5) ^b	13(10.2) ^a	41(32.0) ^b	54(42.2) ^b

^{a,b,c} Means with different superscripts within treatment groups are significantly differ, $P < 0.05$.

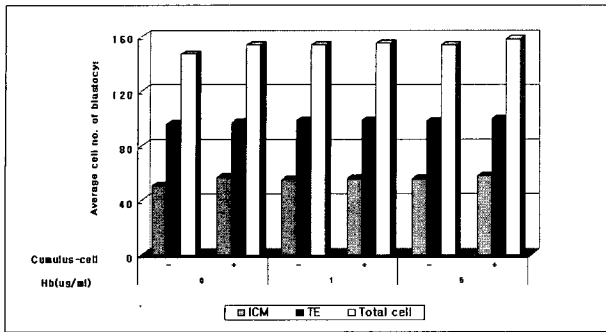


Fig. 2. Number of inner cell mass and trophoctoderm cell of bovine IVM/IVF embryos in CR₁aa plus nitric oxide scavenger with or without cumulus cells at 96hr for *in vitro* culture.

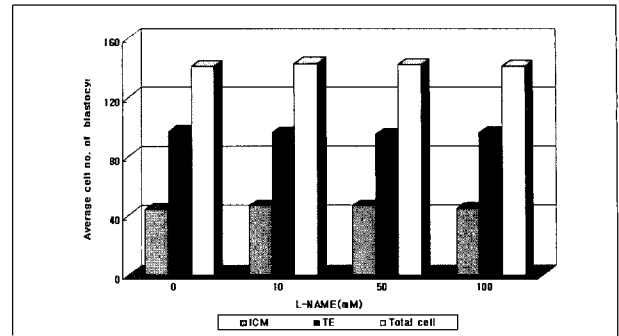


Fig. 3. Number of inner cell mass and trophoctoderm cell of bovine IVM/IVF embryos in CR₁aa with different concentrations of L-NAME.

/ml를 첨가한 구의 상실배기 이상 체외발육 성적은 난구세포를 제거한 구에서 28.6%, 46.2% 및 39.1%였으며, 난구세포를 제거하지 않은 구에서는 각각 33.9%, 67.2% 및 46.0%로서 난구세포를 제거하지 않은 구에 Hb를 1 μg/ml를 첨가한 구가 여타구보다 통계적으로 높은 결과를 얻었다 ($P < 0.05$). 또한 난구세포의 유·무에 대한 효과는 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적은 38.0%와 49.0%로서 난구세포를 제거하지 않은 구에서 상실배기 이상의 발육성적이 높게 나타났으며($P < 0.05$), CR₁aa 배양액에 Hb를 0, 1 및 5 μg/ml 첨가했을 때 상실배기 이상 발육된 체외발육 성적은 31.3%, 56.6% 및 42.2%로서 Hb를 첨가한 구가 무첨가구에 비해 통계적으로 높은 발육성적을 얻어($P < 0.05$), 체외수정 48시간 후 Hb를 첨가했을 때와 비슷한 경향을 나타냈지만, 체외수정 48시간 후 Hb를 첨가했을 때보다 96시간 후 Hb를 첨가했을 때 다소 높은 발육율을 나타냈다.

Fig. 2에서 나타난 바와 같이 난구세포의 유·무에 있어서, CR₁aa 배양액에 체외배양 96시간에 Hb를 0, 1, 5 μg/ml 첨가한 구의 배반포기 수정란의 내세포괴의 세포수는 51 ± 7.7, 57 ± 5.4, 55 ± 7.7과 56 ± 3.8, 56 ± 5.7 및 58 ± 9.7이었고 영양배엽의 세포수는 각각 96 ± 3.5, 97 ± 2.8, 99 ± 7.0과 99 ± 5.8, 98 ± 3.5 및 100 ± 6.1로 나타났으며, 총세포수는 147 ± 10.5, 154 ± 5.1, 154 ± 14와 155 ± 5.3, 154 ± 4.8 및 158 ± 12.4로써 난구세포를 제거하지 않은 구에 Hb 첨가한 구가 무첨가구에 비해 다소 높은 성적을 나타냈다.

난구세포의 유·무에 있어서 배반포기 수정란의 세포수는 152 ± 10.1과 156 ± 8.1로서 커다란 차이는 인정되지 않았으며, CR₁aa 배양액에 Hb를 0, 1 및 5 μg/ml 첨가했을 때 배반포기 수정란의 세포수는 151 ± 8.0, 155 ± 10.0 및 156 ± 9.2

로서 무첨가구와 첨가구사이의 세포수는 차이가 인정되지 않았다.

체외배양액인 CR₁aa에 nitric oxide inhibitor인 L-NAME을 일정량 첨가하여 체외수정란을 체외배양한 후 얻은 체외발육 성적과 배반포 수정란의 세포수를 Table 3와 Fig. 3에 요약하였다.

Table 3에 나타난 바와 같이 CR₁aa 배양액에 L-NAME를 0, 10, 50 및 100 mM을 첨가한 구에서 상실배 이상 발육된 체외발육 성적은 각각 55.6%, 64.9%, 58.8% 및 66.7%로 나타나 첨가구와 무첨가구 간에 커다란 차이가 인정되지 않았으나($P > 0.05$), 배반포기까지 발육된 성적을 보면 L-NAME 10 mM 첨가구가 62.2%(23/37)로서 대조구의 47.2%(17/36), 50 mM 첨가구의 52.9%(18/34) 및 100 mM 첨가구의 55.6%(20/36)보다 다소 높은 성적을 나타내었다.

Fig. 3에서와 같이 CR₁aa 배양액에 L-NAME를 0, 10, 50 및 100 mM을 첨가 배양하여 얻은 배반포기 수정란의 내세포괴 세포수는 각각 44 ± 3.6, 47 ± 4.3, 47 ± 4.0 및 45 ± 5.5였으며, 영양배엽의 세포수는 각각 97 ± 2.4, 96 ± 4.3, 95 ± 3.9 및 96 ± 3.9였고, 총세포수는 141 ± 5.1, 143 ± 0.9, 142 ± 2.3 및 141 ± 4.9로서 무첨가구와 첨가구간의 세포수는 차이가 인정되지 않았다.

고찰

본 연구는 소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 체외배양액에 nitric oxide의 scavenger와 inhibitor

Table 3. Effect of nitric oxide inhibitor(L-nitro-L-arginine methyl-ester) on the development of bovine IVM/IVF embryos

L-NAME (mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes developed to(%)			No. of morulae plus blastocysts
		Pre-morulae	Morulae	Blastocysts	
0	36	16(44.4) ^a	3(8.3) ^{ab}	17(47.2) ^c	20(55.6) ^b
10	37	13(35.1) ^b	1(2.7) ^b	23(62.2) ^a	24(64.9) ^{ab}
50	34	14(41.2) ^{ab}	2(5.9) ^{ab}	18(52.9) ^{bc}	20(58.8) ^{ab}
100	36	12(33.3) ^b	4(11.1) ^a	20(55.6) ^{ab}	24(66.7) ^{ab}

^{a,b,c} Means with different superscripts within treatment groups are significantly differ, $P < 0.05$.

를 일정량 첨가하여 체외수정란의 발육성적에 미치는 영향을 검토하였다.

임신기간 동안 NO는 사람의 태반, 탈락막, 자궁내막 등 번식기관에서 생성된다(Norman과 Cameron, 1996). Sladex 등(1997)은 임신동안에는 NO 합성이 증가하고, 임신 말기에는 NO가 감소한다고 보고하였고, 쥐의 자궁에서는 임신기간동안 NO 합성의 최고점이 발견되었다고 보고하였다(Novaro 등, 1997). 또한 생쥐에 있어서 초기수정란의 발육억제는 자궁의 탈락막에서 NO의 생산 때문이라는 연구 보고가 있을 뿐만 아니라(Gouge 등, 1998), 자궁에서의 tumor necrosis factor- α 는 NO synthase의 활성에 의한 영향으로 나타난다고 보고했다(Haddad 등, 1997).

본 실험의 결과에서 체외배양 48시간 후 CR_{1aa} 배양액에 Hb를 0, 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가했을 때 상실배기 이상의 체외발육 성적은 31.8%, 44.1% 및 37.8%로서 Hb를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가구가 여타구에 비해 높은 발육성적을 얻었고, 난구세포의 유무에 대한 효과는 상실배기 이상의 수정란의 체외발육성적이 난구세포를 제거한 구와 난구세포를 제거하지 않은 구에서 각각 28.0%과 47.6%로서 난구세포가 부착되어 있을 때 상실배기 이상 체외발육 성적이 높게 나타났다.

체외배양 96시간 후 CR_{1aa} 배양액에 Hb를 0, 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가했을 때 상실배기 이상의 체외발육 성적은 31.3%, 56.6% 및 42.2%로서 Hb를 첨가한 구가 무첨가구에 비해 높은 발육성적을 얻었고, 난구세포의 유·무에 대한 효과는 상실배기 이상 수정란의 체외발육 성적이 난구세포를 제거한 구와 제거하지 않은 구에서 각각 38.0%와 49.0%로서 난구세포가 부착되어 있을 때 체외발육 성적이 높게 나타났다. Lim 등(1998, 1999)이 소의 체외수정란에 있어서 배양액 내에 Hb 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가했을 때, 체외수정란의 체외발육 성적이 높았다는 보고와 본 실험의 결과가 일치하는 경향을 보였고, 체외수정 48시간 후보다 96시간 후 배양액 내에 Hb를 첨가한 실험에서 체외수정란의 체외발육 성적이 높은 결과와 Lim 등(1999)의 연구보고에서의 체외수정 144시간 후 Hb의 배양액내의 첨가가 소 체외수정란의 체외발육이 높았다는 보고와 유사한 결과를 얻었다.

CR_{1aa} 배양액에 L-NAME를 0, 10, 50 및 100 mM 첨가한 실험에서 상실배기 이상 수정란의 체외발육율은 각각 55.6%, 64.9%, 58.8% 및 66.7%로서 L-NAME 첨가구가 무첨가구보다 다소 높은 성적을 나타냈지만, 통계적 유의성은 인정되지 않았다. Lim 등(1999)은 소 체외수정란에 있어서 L-NAME 첨가배양이 체외수정란 발육 억제 현상의 극복효과는 나타나지 않았다고 보고해 본 실험과 유사한 경향을 보였다.

본 실험의 결과로 볼 때 체외배양액에 Hb의 첨가 배양은 배양액 내에 생성된 NO를 제거하여 체외수정란의 체외발육율을 향상시켰으며, 난구세포와 공동배양 체계에 있어 Hb의 첨가 배양은 난구세포를 제거한 구보다 난구세포를 제거하지 않고 공동 배양한 구에서 체외수정란의 체외발육율이 증가하였다. 이상의 결과는 난구세포 공동배양 체계에서 난구세포가 NO의 생성을 증가하여 수정란의 체외발육율을 저해시키는 것을 방지할 수 있었다. 또한 nitric oxide inhibitor인 L-NAME는 수정란 또는 난구세포에서 생성되는 NO의 합성을 억제시키지 못하므로 체외수정란의 체외발육율에는 크게 영향을 미치지 못한 것으로 사료된다.

Effects of Nitric Oxide Scavenger and Inhibitor on the Development of Bovine IVM/IVF Embryos

Jang, H. Y., J. T. Kim, C. K. Park, H. T. Cheong, C. I. Kim and B. K. Yang

College of Animal Resources Science, Kangwon National University

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the effects of nitric oxide scavenger (hemoglobin) and inhibitor (L-nitro-L-arginine methyl ester; L-NAME) with or without cumulus cell on the development of bovine IVM/IVF embryos. When CR_{1aa} medium were supplemented with different dosage (1 $\mu\text{g}/\text{m}$, 5 $\mu\text{g}/\text{m}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of hemoglobin at 48hrs for *in vitro* culture, the proportion of embryos developing beyond morulae stage in 0, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ with or without cumulus cell were 23.8%, 33.3% and 26.8%, and 39.5%, 54.8% and 48.8%, respectively. There was a significantly difference the developmental rate of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemoglobin intact cumulus cells to any other groups ($P < 0.05$). On the other hand, when added to hemoglobin at 96 hrs, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemoglobin with cumulus cell group was significantly increased the percentage of developing into morulae and blastocysts to any other groups ($P < 0.05$), and similar trend that of added at 48hrs. The overall means of the percentage of developing into morulae and blastocysts in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hemoglobin group was significantly increased than those of any other groups ($P < 0.05$) and cumulus co-culture with hemoglobin was increased the *in vitro* developing rate of IVM/IVF embryos. In CR_{1aa} medium treated with L-NAME 0, 10, 50 and 100mM, the developmental rate of morula plus blastocysts were 55.6%, 64.9%, 58.8% and 66.7%, respectively. The L-NAME did not affect the developmental rate and the cell numbers of blastocysts in all treated groups. These results indicate that hemoglobin and cumulus co-culture can increase the proportion of embryos that developed into morulae and blastocysts, but cell numbers of blastocysts were not affect in all groups.

(Key words : Bovine IVM/IVF embryos, Hemoglobin, L-NAME, CR_{1aa}, Nitric oxide)

인용문헌

1. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci 87:1620-1624.
2. Brackett BG, Oliphant G (1982): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol Reprod 12:260-274.
3. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990): Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role of

- nitric oxide. *Nature* 347:768-770.
4. Chatterjee S, Gangula PRR, Dong YL, Yallampalli C (1996): Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the estrus cycle. *J Histochem* 28:715-723.
 5. Fostermann U, Schmith HH, Pllock JS (1991): Isoforms of nitric oxide synthase : characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42:1849-1857.
 6. Fukuda A, Hubbard TE, Breuel KF (1996): Production of nitric oxide from mouse embryo and effect of nitrite on mouse embryonic development *in vitro*. *Biol Reprod* 54:173(abstr).
 7. Gouge RCP, Marshburn Gordon BE, Nunly W, Huet-Hudson YM (1998): Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Bio Reprod* 58:875-879.
 8. Haddad EK, Ducios AJ, Baines MG (1997): Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. *J Exp Med* 58:875-879.
 9. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z (1987): Macrophage cytotoxicity : Role for L-arginine deiminase and imino oxidation to nitrite. *Science* 235:473-476.
 10. Hibbs JB, Jr, Taintor RR, Vivrin Z (1989): L- arginine is required for the expression of the activated macrophage effect or mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138: 550-565.
 11. Ischiropolous, Zhu HL, Chen J, Tsai M, Martin JCM, Smith CD, Beckman JS (1992): Peroxynitrite-mediated tyrosin nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298:431-437.
 12. Lim JM, Hansel W (1998): Improved development of *in vitro*-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell coculture system. *Mol Reprod Dev* 50:45-53.
 13. Lim JM, Mei Y, Chen B, Gododke RA, Hansel W (1999): Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system. *Theriogenology* 51:941-949.
 14. Moncada S, Palmer RMG, Higgs EA (1991): Nitric oxide; physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 : 109-142.
 15. Norman JE, Cameron IT (1996): Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod* 1:61-68.
 16. Novaro V, Gonzales E, Jawerbaum A, Rettori V, Canteros G, Gimeno MF (1997): Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Reprod Fertil Dev* 9:557-564.
 17. Papaioannou DE, Ebert KM (1988): The preimplantation pig embryo; cell number and allocation to trophoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102:793-803.
 18. Shukovski L, Tsafiri A (1994): The involvement of NO in the ovulatory process in rat. *Endocrinology* 135:2287-2290.
 19. Sladex SM, Magness RR, Conrad KP (1997): Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 272:R441-463.
 20. Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE (1993): An L-arginine-nitric oxide cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obst Gynec* 170:175-185.
 21. Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE (1994): Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 134:1971-1974.
 22. Yallampalli C, Dong YL, Gangula PR, Fang (1998): Role and regulation of nitric oxide in the uterus during pregnancy and parturition. *J Soc Gynecol Invest* 5:58-67.
- (접수일자: 2004. 3. 15. / 채택일자: 2004. 9. 20.)