

한우 체외수정란 생산을 위한 α-Tocopherol 첨가와 동결 효과

정진우¹ · 손준규² · 최창용² · 서상원² · 최진석² · 조인철² · 한상현² · 강태영³ · 강민수³ ·
김덕임¹ · 김현종² · 조상래^{2*}

¹농협중앙회 한우개량사업소, ²농촌진흥청 국립축산과학원, ³제주대학교 수의학과

Effect of α-Tocopherol Treatment and Freezing for *In Vitro* Bovine Embryo Production in Korean Native Cows

Jin-Woo Jung¹, Jun-Kyu Son², Changyong Choe², Sangwon Suh², Jin-Seok Choi², In-Cheol Cho²,
Sang-Hyun Han², Tae-Young Kang³, Min-Soo Kang³, Duck-Im Kim, Hyun-Jong Kim and Sang-Rae Cho^{2*}

¹National Agricultural Cooperative Federation Hanwoo Genetic Improvement Center, Seosan 356-831, Korea

²National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

³Department of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-767, Korea

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of α-tocopherol on blastocysts development and subsequent cryo-survival of the vitrification. The α-tocopherol(0, 100, 200, 400 μM) was added in to culture medium for the bovine embryos. The blastocysts from the α-tocopherol and untreated control groups were then frozen-thawed, and their cryo-survival was assessed by *in vitro* culture for 48 h. There were no differences in the overall cleavage rate(56.14±4.66, 58.18±4.70, 62.97±6.86 and 51.17±7.28) among four treatment groups. However, in blastocyst development and total cell number were significantly higher in α-tocopherol 200 μM(38.60±7.12; 106.33±3.50) to culture medium than other treatment groups(29.30±5.24, 31.60±7.12 and 26.37±4.18; 101.36±5.12, 97.27±2.87, and 91.23±7.52 respectively). Before and after vitrification, the total cell number and blastocyst development of embryo were significantly higher in July to August than September to October. In conclusion, addition of α-tocopherol 200 μM to *in vitro* bovine embryo culture medium was beneficial for improving embryo quality by decreasing the embryo damage blastocysts cell number and improving the tolerance of the embryos to cryopreservation.

(Key words : Bovine, Embryos, *In vitro*, *In vivo*, Vitrification)

서론

가축 즉, 경제동물에서 번식의 궁극적인 목적은 가축의 양적 및 질적 증가이며, 또한 가축개량을 위한 수단으로서 오래전부터 가축의 우수한 경제형질 발현 빈도를 증가시키기 위해 선발 및 교배법이 이용되었다. 우수한 경제 형질을 가지고 있는 가축의 유전자원을 선발하여 후대에게 계획 교배함으로써 유전적으로 보다 우수한 형질의 가축이 생산되도록 하여 축산업의 생산성을 증진시키는 것은 국내 축산업의 국제 경쟁력 확보와 농가의 소득 증대에 기여할 수 있어 그 중요성이 매우 크다. 가축개량을 위하여 인공수정을 주로 실시하여 왔으나, 이는 형질이 우수한 종모축 개량에는 그 한계성이 있는 것으로 보고하기도 하였다(Ruane, 1988; Sreenan, 1988). 이러한 인공수정의 단점을 보완하는 기술로 수정란 이식(embryo

transfer)에 관련된 연구가 많이 진행되고 있다. 수정란 이식은 우수한 유전형질을 가진 종빈축으로부터 다수의 수정란을 회수하여 이를 동일품종 또는 타품종의 개체에 이식하여 자축을 생산함으로써 종빈축의 번식효율 향상과 유전형질이 동일한 다수의 자손을 단기간에 생산이 가능하므로 선발 강도를 높일 수 있고, 후보 종빈축의 후대검정을 효율적으로 수행하는 것이 가능하여 가축의 개량에 매우 유용한 방법이다(Simth, 1984; Gibson과 Smith, 1986; Christensen, 1991; Lohuis, 1997; 원, 1999). 가축 개량과 멸실위험 가축의 보존과 생명공학 기술을 활용함으로써 새로운 번식과 육종기술의 개발이 가능하게 되었다(Sturman 등, 2000). 기존의 후대검정으로는 유전적 능력이 확인될 때까지 오랜 기간(최소 7~8년)이 소요되지만, 수정란이식에 의해서 전형제우를 생산하여 형제검정법을 도입하면 2~3년이 단축되어 결과적으로 가축의 증식과 개량을 촉진시킬 수 있다. 또한, 유전공학 기법에 의한 복

* Corresponding author : Phone: +82-64-754-5711, E-mail: chosr@korea.kr

제동물, 형질전환 동물과 인체 대체 장기생산 등으로 수정란을 이용한 번식기술과 육종기술의 개선뿐만 아니라 인간의 질병 치료에도 많은 공헌을 하게 되었다(Forsberg, 2005; Wang와 Zhou, 2003). 포유동물의 수정란 체외배양 시 수정란의 발육에 영향을 미치는 요인으로는 온도, 가스 조건, 배양액의 성분 및 배양액에 첨가되는 호르몬 및 여러 종류의 단백질 등이 보고되었다(Nakao와 Nakatsuji, 1990 ; Thibodeaux 등, 1993). 체외발육억제 현상의 원인은 아직 명확하게 규명되어 있지는 않지만, 초기배 수정란에서 체외배양 동안 산소를 함유한 활성산소(free radical)가 다량 생성되어 발생하는 산화적 스트레스(nitric oxide)와 같은 수정란의 발육에 독성을 제공하는 요소들에 의해서 일어난다고 보고하였다(Corsby 등, 1988; Joenje, 1989). 미성숙 난자와 수정란의 체외 발달 중 유발되는 산화 스트레스는 미토콘드리아의 호흡 작용 억제, DNA의 손상을 초래하여 난자의 성숙 및 체외발달시에 저해 요인으로 작용된다. 수정란의 세포막 지질의 과산화, 효소 불활성화, RNA의 손상 및 생체내 지질과 단백질 등 주요 물질의 변성과 파괴의 원인으로 알려진 활성산소는 특정한 발육 단계에서 체외수정란의 발육을 억제하는 요인으로 보고되고 있으며(Jones, 1985; Bize 등, 1991; Miyazake 등, 1991), 이러한 활성 산소를 제거하기 위한 방법으로서 체외배양액 내에 α -tocopherol, glutathione, β -carotene, catalase, taurin 등과 같은 항산화제를 첨가하여 체외배양의 조건을 개선시키는 연구가 활발히 진행되고 있다(Saikhuna1 등, 2008; Thiagarajan와 Valivittan, 2009; Marques 등, 2010). 수정란을 실온이나 저온에서 보존하면 생존율과 수태율이 급격히 저하되기 때문에 수정란의 동결보존기술 개발로 수정란을 안전하게 보존하게 되었다(Voelkel과 Hu, 1992; Kuwayama 1995; Carvalho 등, 1996). 그러나 현재까지의 기술로는 신선수정란에 비하여 동결 보존된 수정란의 생존성과 수태율이 낮은 경향을 보이고 있다. 그래서 현재 수정란의 생존성과 수태율을 높이기 위한 다각적인 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 한우의 난포란을 체외에서 성숙수정시킬 때 항산화제인 α -tocopherol의 첨가 배양이 체외배양 및 수정란의 동결 보존 및 융해시 체외 발육에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

난포란의 체외성숙과 수정

본 실험에 공시된 난소는 7월에서 10월까지의 도축된 한우 난소를 사용하였다. 적출된 난소는 항생제가 첨가된 PBS(25~28°C)에 담아 실험실로 운반하였다. 난포란은 직경이 2~6 mm 가시난포에서 채취하였다. 난포란의 체외성숙을 위해서 LH 10 μ g/ml, FSH 10 μ g/ml와 10% FBS가 첨가된 TCM-199를 사용하였다. 난포란은 CO₂ 5% incubator에서 22시간 배양 후, 체외수정에 공시하였다. 체외수정은 성숙된 난포란의 난구세포의 일부를 제거하고, IVF100 배양액에서 체외수정을 하였다. 체외수정에 사용된 정액은 한우 동결정액(KPN)를 이용하였다. 체외수정을 위해서 사용된 정자의 최종 농도는 2.0×10^6 /ml 되도록

조정하였고, 6시간 동안 CO₂ 5% incubator 내에서 수정을 유도하였다.

수정란의 체외 배양

체외수정된 난포란은 난구세포 일부를 제거한 후, CR1aa 배양액으로 옮겨 CO₂ 5%, O₂ 5% incubator에서 48시간 동안 배양을 실시하였다. 체외수정 48시간 후에 정상적으로 분할된 2~8세포기 수정란만을 선별하여 분할을 조사하였다. 분할이 확인된 수정란은 10% Fetal Calf Serum(FBS, Gibco)가 첨가된 신선한 CR1aa 배양액으로 교체한 후 매 48시간 간격으로 배양액을 교환하였다. 배반포기 수정란 확인은 6~8일간 실시하였고, 7~9일째 생산된 배반포 수정란을 선별하여 실험에 공시하였다.

α -Tocopherol 첨가 배양

본 실험에 사용한 α -tocopherol(Sigma, U.S.A)은 실험 18~20시간 전에 ethanol에 용해하여 차광 후 5°C 이하 냉장보관하여 본 실험에 사용하였다. α -Tocopherol의 첨가는 체외성숙과 체외배양액에 각각 0, 100, 200 and 400 μ M 농도로 첨가하여 사용하였다.

초자화 동결 및 융해

수정란의 초자화 동결을 위해서 0.25 ml straw를 사용한 초자화 동결방법을 이용하였다. D-PBS에 ethylene glycol과 glycine 용해하여 vitrification solution을 제조하여 체외수정 후 7~9일 경과된 확장 배반포기 수정란 중에서 형태학적으로 우수한 수정란만을 선별하여 초자화 동결을 실시하였다. 초자화 동결은 vitrification solution에서 수정란을 0.25 ml straw에서 장전된 다음 액체질소 상단부에서 약 5초 동안 과냉각 후 액체질소 속으로 즉시 침지하여 동결 보존을 실시하였으며, 융해 후 생존성 평가 실험을 위해서 최소 1주일 이상 액체질소 탱크에서 보존을 실시하였다. 수정란 융해에 사용된 완충액은 TCM-199 배양액에 10% FBS와 0.3% sucrose를 각각 용해하여 제조하였다. 수정란의 융해는 동결된 수정란이 들어있는 0.25 ml straw를 실온 공기 중에 5초간 노출 후 37.5°C의 항온수조에 침지하여 10초간 융해시켰다. 융해된 수정란은 0.25 M sucrose 완충액에서 5분간 노출시키고, 0.15 M sucrose 완충액에서 5분간 평형 및 동결보호제를 제거한 다음, CR1aa 배양액으로 옮겨 CO₂ incubator에서 12시간 이상 배양을 실시한 후, 형태학적으로 이상이 없는 재확장 및 부화된 수정란을 생존한 것으로 평가하였다.

수정란의 세포수 조사

수정란의 세포수 조사는 Long 등(1999)의 방법에 준하여 실시하였다. 초자화동결 후 생존된 수정란을 Hoechst 33342 염색 시약을 사용하였다. 염색된 세포수 확인을 위하여 346 nm 자외선 파장 필터가 장착되어 있는 형광현미경(Olympus, Japan)에서 200배 배율로 관찰하였다.

통계 분석

본 실험에서 얻어진 수정란의 난할률, 배반포발생률과 수정란의 총 세포수 조사결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences) 12.0(Chicago University, 1968) two-way ANOVA(Analysis of variance, R.A. Fisher) Tu-

key-Kramer Multiple Comparisons test를 적용하여 유의성을 검정하였다. $p < 0.05$ 일 때 각 처리구 간의 유의성을 인정하였고, 평균과 표준편차(Mean \pm S.D)를 나타내었다.

결과 및 고찰

α -Tocopherol 첨가에 따른 분할율

Table 1에서는 α -tocopherol을 체외성숙액에 첨가한 후 각 농도별과 월별 평균 분할율을 비교한 결과는 다음과 같다. 농도별 분할율에서는 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 62.97 \pm 6.86%로서 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 56.14 \pm 5.66%; 100 μ M, 58.18 \pm 8.00%; 400 μ M, 51.17 \pm 7.28%)보다 높게 나타났으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이와 비슷하게 Thiyagarajan 등(2009)도 α -tocopherol 100 μ M 처리하였을 때가 다른 처리구에 비해서 유의적인 차이는 보이지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 체외배양시 α -tocopherol 200 μ M 첨가 처리구에서 분할율이 다른 처리구보다 높은 경향을 보였다. 이는 난구세포가 산화 스트레스에 의해 발생된 apoptosis로부터 난포란을 보호하는 역할을 한다고 보고하였다(Tatemoto 등, 2000). 그리고 월별 α -tocopherol 첨가 농도에 따른 분할율을 비교 조사한 결과, 여름 계절이 시작되는 시점인 7월에는 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 55.80 \pm 5.05%로서, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 54.29 \pm 4.66%; 100 μ M, 52.41 \pm 4.70%; 400 μ M, 46.07 \pm 4.82%)보다 높게 나타났으며, 여름 계절의 절정 시점인 8월 실시된 α -tocopherol 첨가 결과는 200 μ M 처리구가 72.00 \pm 11.71%로서, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 61.82 \pm 8.12%; 100 μ M, 65.52 \pm 13.38%; 400 μ M 58.89 \pm 12.29%)보다 유의적으로 높게($p < 0.05$) 나타났다. 또한, 가을 계절의 시작 시점인 9월의 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 60.49 \pm 3.95%로서, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 46.97 \pm 2.35%; 100 μ M, 54.68 \pm 5.23%; 400 μ M, 51.62 \pm 1.85%)보다 높은 경향을 보였다. 가을 계절의 정점인 10월의 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 63.61 \pm 5.34%로서 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 61.46 \pm 5.22%; 100 μ M, 60.12 \pm 9.19%; 400 μ M, 48.11 \pm 8.85%)보다 높게 나타났다. 7~10월 대조구와 처리구의 분석 결과, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 난포란의 체외성숙을 위한 가장 중요한 요소는 체외성숙 배양액의 성분 조성과 미성숙 난포란의 질(quality) 등에 의해 좌우됨으로 수정란의 성공적으로 생산을 위해서는 중요하게 고려되어

야 할 사항이다(Cho 등, 2010). 최근에는 체외성숙 중에 일어난 산화 스트레스의 원인에 의해 체외 생산된 배아의 낮은 분할율과 배반포 발달율에 영향을 주었으며, 외부의 장시간 노출 및 환경적 요인에 의해서도 결정될 수 있다고 보고하였다. Quinn 등(2005)은 초기 생쥐 수정란의 체외배양에 대한 연구에서 5% 산소농도가 발육에 적절하다고 보고하였으며, 최근에는 산화작용을 하는 free radical을 제거하고, 체외수정란의 발달율을 향상시키기 위하여 배양액 내에 여러 가지 성장인자 및 항산화제의 첨가 등으로 좋은 체외발육 성적을 얻게 되었다(Choi 등 2001). 그리고 항산화제인 비타민 첨가는 전자반응에 의해 산화 효과로 세포의 손상을 줄일 수 있다고 보고하였다(Carlson 등, 1993; Rodgers 등, 1995), 그 중 α -tocopherol은 강력한 지질 용해 항산화제로 낮은 농도에도 불구하고 주요 산화 방지제로서의 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Kontush 등, 1996).

α -Tocopherol 첨가에 따른 배반포 발달율

Table 2에서는 α -tocopherol을 체외배양액에 첨가한 후 각 농도별과 월별 평균 배반포 발생율을 조사한 결과이다. 평균적으로 α -tocopherol 200 μ M 처리구 38.60 \pm 7.12%의 발생율을 보여, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 29.30 \pm 5.24%; 100 μ M, 31.60 \pm 5.14%; 400 μ M, 26.37 \pm 4.18%)보다 높게 나타났으나, 각 처리구간의 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 이러한 체외수정란의 발달율의 차이는 체외 발육중지 현상으로서 초기배 수정란의 genome 활성화 유·무와 free radical에 의해 일어난다고 알려져 있고, 또한 산화 과정을 통해 pyruvate와 포도당을 연소하여 ATP는 생산 과정에서 산소와 에너지의 증가에 의해서 free radical이 생성의 영향을 받는다고 보고하였다(Thompson 등, 1996). 또한, ATP 작용은 체외수정란 생산에 기여하고, 세포내 산화 환원 상태에서는 세포의 활성화 차이를 나타낼 수 있다고 보고하였다(Wales, 1975; Leese, 1995). 월별 α -tocopherol 첨가 농도에 따른 배반포 발생율을 비교 조사한 결과, 7월의 배반포 발생율은 Table 1에서 분할율과 동일하게 α -tocopherol 200 μ M 처리구 42.17 \pm 1.58%가 대조구와 다른 처리구들(0 μ M, 38.83 \pm 1.20%; 100 μ M, 40.87 \pm 3.03%; 400 μ M, 33.65 \pm 1.52%)보다 높게 나타났으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 8월의 배반포 발생율은 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 55.31 \pm 6.62%로서, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 34.69 \pm 1.12%; 100 μ M, 37.36 \pm 1.15%; 400 μ M, 32.48 \pm 0.74%)보다 유의적으로 높은($p < 0.05$) 발달율을 보였으며, 9월

Table 1. Effect of α -tocopherol on cleavage rate by months

α -Tocopherol concentration(μ M)	No. of oocytes inseminated(n)	No. of development to cleavage				
		Average	July	August	September	October
0	650	56.14 \pm 5.66	54.29 \pm 4.66	61.82 \pm 8.12	46.97 \pm 2.35	61.46 \pm 5.22
100	650	58.18 \pm 8.00	52.41 \pm 4.70	65.52 \pm 13.38	54.68 \pm 5.23	60.12 \pm 9.19
200	650	62.97 \pm 6.86	55.80 \pm 5.05	72.00 \pm 11.71	60.49 \pm 3.95	63.61 \pm 5.34
400	650	51.17 \pm 7.28	46.07 \pm 4.82	58.89 \pm 12.29	51.62 \pm 1.85	48.11 \pm 8.85

Values are listed as Mean \pm S.E.M.

Table 2. Effect of α -tocopherol in medium on IVP development to blastocyst by months

α -Tocopherol concentration(μ M)	No. of oocytes inseminated(n)	No.(%) of development to blastocyst				
		Average	July	August	September	October
0	650	29.30 \pm 5.24 ^{AB}	38.83 \pm 1.20 ^c	34.69 \pm 1.12 ^{bc,A}	30.48 \pm 2.29 ^{b,AB}	13.20 \pm 0.67 ^{a,AB}
100	650	31.60 \pm 5.14 ^{AB}	40.87 \pm 3.03 ^b	37.36 \pm 1.15 ^{b,A}	31.97 \pm 0.73 ^{b,AB}	16.19 \pm 0.87 ^{a,A}
200	650	38.60 \pm 7.12 ^B	42.17 \pm 1.58 ^c	55.31 \pm 6.62 ^{bc,B}	35.85 \pm 1.73 ^{ab,B}	21.05 \pm 1.20 ^{a,B}
400	650	26.37 \pm 4.18 ^A	33.65 \pm 1.52 ^c	32.48 \pm 0.74 ^{c,A}	25.28 \pm 1.18 ^{b,A}	14.06 \pm 0.73 ^{a,A}

^{A,B} : Means in the same column with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

^{a-c} : Means in the same row with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Values are listed as Mean \pm S.E.M.

의 배반포 발생율의 경우 α -tocopherol 200 μ M 처리구 35.85 \pm 1.73%로서, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 30.48 \pm 2.29%; 100 μ M, 31.97 \pm 0.73%; 400 μ M, 25.28 \pm 1.18%)보다 다소 높은 경향을 보였으나, 400 μ M 처리구를 제외한 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 10월의 배반포 발생율의 경우 α -tocopherol 200 μ M 처리구 21.05 \pm 1.20%로서, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 13.20 \pm 0.67%; 100 μ M, 16.19 \pm 0.87%; 400 μ M, 14.06 \pm 0.73%)보다 유의적으로 높은($p < 0.05$) 결과를 내었다.

이와 같은 결과로 볼 때, α -tocopherol의 첨가는 peroxidation(섬유원형질막의 지질의 과산화)을 방지하는 효과가 있어, α -tocopherol 200 μ M 첨가된 처리구에서 한우 수정란의 배발달을 증가는 항산화 효과가 원인일 수 있다고 사료되어진다. 월별 배반포 발생율이 7~8월의 고온의 날씨에도 불구하고, 9~10월보다 배반포기 발생율이 유의적으로 높게($p < 0.05$) 나타났다. 선행연구와 비교하여 보면, 과배란 처리 후 계절별 수정란 회수율에서 Monty 등(1987)은 총 난자수와 수정란수가 여름에 영향을 받지 않았으며, Basile 등(1998)도 기후 변화에 영향을 받지 않았다고 보고하였다. 손 등(2000)은 4계절 중 겨울철에 이식가능한 수정란을 가장 많이 채란되었다고 보고하였다. 체외수정란과는 상대적으로 체내수정란의 경우는 고온에 의한 스트레스로 인한 열충격단백질(heat shock protein, HSP)에 의해 수정란이 보호되어진다. HSP는 열충격과 같은 다양한 스트레스에 의해 유도 합성되는 단백질이면서, estrogen이나 progesterone과 같은 성호르몬의 표

적세포에서도 널리 관찰되고 있다(Ciocca 등, 1993). HSP는 고체온(hyperthermia)으로 부터 임신 중인 산모에 열 자극이 가해지면 신경계통에서 열충격단백질이 발현되어 신경세포를 보호하고, 기형을 예방하는 역할을 수행하지만, 본 실험에서와 같이 체외수정란의 경우 고온스트레스로부터 보호할 수 있는 특정 단백질을 첨가하지 않아 7~8월에 받은 고온 스트레스가 9~10월에 배반포기 발생율의 감소로 나타나는 것으로 사료되어진다.

α -Tocopherol 첨가에 따른 총 세포수

Table 3에서는 α -tocopherol을 체외배양액에 첨가한 후 발생한 배반포 수정란의 총세포수를 조사한 결과이다. α -Tocopherol 200 μ M을 첨가한 처리구는 115.80 \pm 6.61로서 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 109.14 \pm 5.89; 100 μ M, 104.23 \pm 6.57; 400 μ M, 96.00 \pm 7.06)보다 유의적으로 높게($p < 0.05$) 관찰되었다. 선행 연구에서 소의 수정란배양에서 비타민 E를 첨가한 결과, 초기배반포와 확장배반포가 더 많이 발달되었고, 돼지의 경우에 있어서도 체외배양액에 비타민 E와 함께 배양한 결과, 처리구에서 대조구보다 체세포핵 전달과 체외수정란의 배반포 질이 높다는 연구 보고가 있었다(Jeong 등, 2006). 월별 α -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수의 결과는 7월의 총세포수가 α -tocopherol 200 μ M에서 119.75 \pm 1.89로 높게 나타났으나, 400 μ M 처리구를 제외한 나머지 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 8월의 α -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M

Table 3. Effect of α -tocopherol in medium on total cell number by months

α -Tocopherol concentration (μ M)	No. of oocytes inseminated (n)	Total cell number				
		Average	July	August	September	October
0	650	109.14 \pm 5.89 ^B	116.00 \pm 2.29 ^{b,B}	110.50 \pm 1.94 ^{b,B}	108.25 \pm 1.03 ^{ab,BC}	101.67 \pm 2.02 ^{a,B}
100	650	104.23 \pm 6.57 ^B	108.75 \pm 4.55 ^{AB}	103.33 \pm 1.26 ^{AB}	104.33 \pm 0.76 ^{AB}	99.50 \pm 4.60 ^{AB}
200	650	115.80 \pm 6.61 ^C	119.75 \pm 1.89 ^{b,B}	119.50 \pm 2.10 ^{b,C}	116.00 \pm 1.78 ^{b,C}	105.33 \pm 2.02 ^{a,B}
400	650	96.00 \pm 7.06 ^A	100.67 \pm 2.36 ^{b,A}	99.67 \pm 1.53 ^{b,A}	96.75 \pm 3.17 ^{ab,A}	86.67 \pm 2.36 ^{a,A}

^{A-C} : Means in the same column with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

^{ab} : Means in the same row with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Values are listed as Mean \pm S.E.M.

처리구가 119.50±2.10로 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 110.50±1.94; 100 μ M, 103.33±1.26; 400 μ M, 99.67±1.53)보다 유의적으로 높게($p<0.05$) 나타났다. 9월의 α -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 116.00±1.78로 다른 처리구(100 μ M, 104.33±0.76; 400 μ M, 96.75±3.17)에서 대조구를 제외한 나머지 처리구에서 유의적으로 높게($p<0.05$) 나타났다. 10월의 α -tocopherol 첨가 농도에 따른 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 105.33±2.02로, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 101.67±2.02; 100 μ M, 99.50±4.60; 400 μ M, 86.67±2.36)보다 다소 높은 경향을 보였으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 월별 총세포수의 변화를 살펴보면 배반포기 발생율과 동일하게 7~8월에 비해 9~10월의 처리구와 대조구 모두 총세포수가 유의적으로($p<0.05$) 감소하는 결과를 보였다(Thiyagarajan 등, 2009), 또한 α -tocopherol 200 μ M 첨가는 대조구를 비롯한 다른 처리구들보다 높은 결과를 나타내는 것으로 보아, HSP와 비슷한 효과를 나타내는 것으로 보이며 여름 계절의 고온 스트레스로 인해 9~10월 배반포율이 감소와 마찬가지로, 세포수 감소로 이어지는 것으로 사료되어진다.

α -Tocopherol 첨가에 따른 초자화 동결·융해 후 총세포수

Table 4에서는 월별 α -tocopherol 첨가 농도에 따른 동결 융해 후 생존한 수정란의 총세포수를 조사한 결과이다. 동결 융해 후 α -tocopherol의 첨가 농도에 따라 24시간 이상 배양 후 생존한 수정란을 선별하여 사용하였다. 초자화 동결에 따른 평균 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M 첨가한 처리구 106.33±3.50로서, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 101.36±5.12; 100 μ M, 97.27±2.87; 400 μ M, 91.23±7.52)보다 유의적으로 높게($p<0.05$) 나타났지만, 대조구와의 차이에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 월별 초자화 동결 융해 후 총세포수의 결과는 7월의 경우, α -tocopherol 200 μ M 처리구가 107.00±3.16로 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 101.33±4.07; 100 μ M, 99.00±2.00; 400 μ M, 95.33±3.25)보다 높게 나타났으나, 400 μ M 처리구를 제외한 나머지 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 8월의 초자화 동결 융해 후 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M 처리구 110.33±1.26로, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 103.67±2.08; 100 μ M, 101.33±2.02; 400 μ M, 96.33±2.08)보다 높게 나타났

으나, 400 μ M 처리구를 제외한 대조구 및 다른 처리구에서는 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 9월의 초자화 동결 융해 후 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 112.50±1.06로, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 102.00±2.83; 100 μ M, 98.00±2.83; 400 μ M, 92.25±0.48)에서 대조구를 제외한 나머지 처리구에서 유의적으로 높게($p<0.05$) 나타났다. 10월의 초자화 동결 융해 후 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M 처리구가 97.33±2.02로, 대조구 및 다른 처리구(0 μ M, 98.67±1.76; 100 μ M, 91.00±2.65; 400 μ M, 80.67±3.33)보다 높게 나타났으나, 400 μ M 처리구를 제외한 대조구 및 다른 처리구에서 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 초자화 동결은 세포가 동결되는 동안 동결용액의 점성을 점차 증가시켜 세포내·외의 빙정 형성을 방지하는 동결법으로 알려져 있다. 그러나 초자화된 동결용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에 해빙 과정동안 재결정화가 일어나 세포에 손상을 줄 수 있다. 따라서 융해과정에서 재빙정이 이루어지지 않도록 투과력이 높은 고농도의 동결 보존액을 사용해야 한다(Rall 등, 1987). 동결 융해된 수정란은 동결 융해 과정에서 미세소기관의 손상으로 발달지연 또는 중지되어 확장 배반포의 발달을 촉진하지 못하게 된다. 따라서 수정란의 동결보존의 이용 효율성 확보를 위해서는 다양한 수정란 동결개발 기술에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

적 요

본 연구는 한우의 체외수정란 생산에서 체외성숙, 체외 배양시 배양액에 항산화제인 α -Tocopherol의 첨가 농도에 따른 대조구와 처리구 난포란의 발달과 배반포 발생 및 초자화 동결 후 생존성에 미치는 영향을 구명하고자 실험을 실시하였다. α -Tocopherol 첨가 농도에 따른 분할율에서는 7~10월까지 비교한 결과, α -tocopherol 200 μ M 첨가된 처리구가 대조구 및 타 처리구보다 높은 경향을 보였으나, 유의적 차이는 없었다. 배반포 발생율에서는 8~10월에서 α -tocopherol 200 μ M 첨가된 처리구 38.60±7.12%가 대조구 및 타 처리구들보다 유의적으로 높게($p<0.05$) 나타났다. 초자화 동결 전·후의 총세포수는 α -tocopherol 200 μ M 처리구에서 115.80±6.61개, 106.33

Table 4. Effect of α -tocopherol in medium on total cell number after vitrification by months

α -Tocopherol concentration (uM)	No. of oocytes inseminated (n)	Total cell number after vitrification				
		Average	July	August	September	October
0	650	101.36±5.12 ^{BC}	101.33±4.07	103.67±2.08 ^{AB}	102.00±2.83 ^{AB}	98.67±1.76 ^B
100	650	97.27±2.87 ^{AB}	99.00±2.00	101.33±2.02 ^{AB}	98.00±2.83 ^A	91.00±2.65 ^{AB}
200	650	106.33±3.50 ^C	107.00±3.16 ^{ab}	110.33±1.26 ^{bB}	112.50±1.06 ^{bB}	97.33±2.02 ^{aB}
400	650	91.23±7.52 ^A	95.33±3.25 ^b	96.33±2.08 ^{bA}	92.25±0.48 ^{abA}	80.67±3.33 ^{aa}

^{A-C} : Means in the same column with different superscripts were significantly different ($p<0.05$).

^{ab} : Means in the same row with different superscripts were significantly different ($p<0.05$).

Values are listed as Mean ± S.E.M.

±3.50개로서, 다른 대조구 및 타 처리구보다 높은 세포수를 보였다. 월별에 따른 수정란의 배반포 발생률 및 동결 전후의 총세포수에서는 7~8월이 9~10월보다 유의적으로 높게($p<0.05$) 나타났다.

인용문헌

- Basile JR, Chebel RJ, Basile LF (1998): Effect of season on embryo transfer in superovulated Holstein cows with PMSG. *Br J Vet Res Anim Sci* 35:257-259.
- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C (1991): Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol Reprod* 44:398-403.
- Carlson JC, Wu XM, Sawada M (1993): Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function. *Free Radic Biol Med* 14:79-84.
- Carvalho RV, Del Campo MR, Palasza AT, Planteb Y, Mapletofta RJ (1996): Survival rates and sex ratio of bovine IVE embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology* 45:489-498.
- Christensen LG (1991): Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology* 35:141-149.
- Ciocca DR, Oesterreich S (1993): Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp-27). *JNCI. J Natl Cancer Inst* 85(19):1558-1570.
- Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM (1988): Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 82:769-775.
- Forsberg EJ (2005): Commercial applications of nuclear transfer cloning: three examples. *Reprod Fertil and Develop* 17(2):59-68.
- Gibson JP, Smith C (1986): Technology and animal breeding; Application in livestock production. 3rd world Cong. on Genetics Applied to Livestock Prod 12:96-105.
- Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, Lee SH, Kang SK, Lee BC, Hwang WS (2006): Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 66:2104-2112.
- Joenje H (1989): Genetic toxicology of oxygen. *Mutation Research* 1219:193-208.
- Jones DP (1985): Oxygen supply In : *Oxidative Stress*, London: Academic Press. 167-170.
- Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschütter A, Beisiegel U (1996): Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res* 37:1436-1448.
- Kuwayama M (1995): Vitrification of IVMFC bovine embryos at various developmental stages and of different quality. *Theriogenology* 43:257-257.
- Lohuis MM (1997): Strategy for dairy cattle improvement utilizing MOTE in anada. *Anim Genetic and Breed* 1:224-226.
- Long CR, Dovrinsky JR, Johnson LA (1999): *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology* 51:1375-1390.
- Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE (1991): Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the *in-vitro* perfused rabbit ovary. *J Reprod Fert* 91:207-212.
- Monty Jr DE, Racowsky C (1987): *In vitro* evaluation of early embryo viability and development in summer heat stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology* 28:451-465.
- Nakao H, Nakasuji N (1990): Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 33:591-600.
- Quinn P, Gaye M (2005): The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J Experi Zoo* 206(1):73-80.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG (1987): Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil* 80:499-504.
- Rodgers RJ, Lavranos TC, Rodgers HF, Young FM, Vella CA (1995): The physiology of the ovary: maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:241-246.
- Ruane J (1988): Review of the use of embryo transfer in the genetic improvement of dairy cattle. *Anim Breed* 56:437-446.
- Smith C (1984): Genetic improvement of livestock, using nucleus breeding units. *World Anim Rev* 65:2-10.
- Sreenan JM (1988): Embryo transfer: its uses and recent development. *Veterinary Record* 122:624-629.
- Sturman H, Oltenacu EA, Foote RH (2000): Importance of inseminating only cows in estrus. *Theriogenology* 53(8):1657-1667.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N (2000): Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *In vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63:805.
- Thibodeaux JK, Del Vecchio RP, Hansel W (1993): Role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J Reprod Fertil* 98:61-66.
- Thiyagarajan B, Valivittan K (2009): Ameliorating effect of vitamin E on *in vitro* development of preimplantation Buffalo embryos. *J Assist Reprod Genet* 26:217-25.
- Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI,

- Leese HJ (1996): Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. J Reprod Fertil 106:299-306.
31. Voelkel SA, Hu YX (1992): Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology 37:23-37.
32. Wales RG (1975): Maturation of the mammalian embryo: biochemical aspects. Biol Reprod 12:66-81.
33. Wang B, Zhou J (2003): Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. Reprod Biol Endo 1:103.
34. 손동수, 김일화, 류일선, 연성흡, 서국현, 이동원, 최선호, 박수봉, 이충섭 (2000): 젖소 MOET scheme의 추진을 위한 수정란 생산 및 이식. 한국수정란이식학회지 15(1):57-65.
35. 조상래, 최창용, 김현중, 최선호, 손동수 (2010): 한우 수정란의 동결보존 후 발달 효율 비교. 한국수정란이식학회지 23(3): 223-227.
36. 최영진 (2001): 돼지 체외 수정란의 체외발육에 대한 항산화제의 첨가효과. 강원대학교 석사학위논문.
(접수일자: 2011. 9. 7 / 채택일자: 2011. 9. 19)