Reprod Dev Biol 38(3) : 115-121 (2014)
http://dx.doi.org/10.12749/RDB.2014.38.3.115
ISSN : 1738-2432 (Print)
ISSN : 2288-0151 (Online)

소에서 정자활성, 수정 양상 및 착상전 지속적 수정란 발달에 있어서 환삼덩굴 추출액의 효과

민성훈[1] · 김진우[1] · 도건엽[1] · 이용희[1] · 안재현[1] · 채성규[1] · 김병오[2] · 박흠대[1] · 구덕본[1,†]

[1]대구대학교 공과대학 생명공학과, [2]경북대학교 농업생명과학대학 식품공학부

Effect of *Humulus japonicus* Extract on Sperm Motility, Fertilization Status and Subsequent Preimplantation Embryo Development in Cattle

Sung-Hun Min[1], Jin-Woo Kim[1], Geon-Yeop Do[1], Yong-Hee Lee[1], Jae-Hyun Ahn[1], Sung-Kyu Chae[1], Byung Oh Kim[2], Humdai Park[1] and Deog-Bon Koo[1,†]

[1]*Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea*

[2]*School of Food Science & Biotechnology, College of Agriculture & Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

ABSTRACT

***Humulus japonicus* is an ornamental plant in the Cannabaceae family. Although the mode of action of *Humulus japonicus* is not fully understood, a strong relationship was observed between anti-inflammatory and anticancer in some types of cells. Recent studies also have shown that *Humulus japonicus* possesses anti-inflammatory activities and may significantly improve antioxidant potential in Raw 264.7 macrophage cells. Thus, the aim of this study was evaluated the effect of *Humulus japonicus* extract on sperm motility and subsequent preimplantation developmental competence of the bovine embryos. After *in vitro* maturation, the oocytes with sperms were exposed in *in vitro* fertilization (IVF) medium supplemented with *Humulus japonicus* extract (0.01, 0.05, 0.1 μg/mL, respectively) for 1 day. In our results, exposure of IVF medium to *Humulus japonicus* extract did not affect sperm motility and percentage of penetrated oocytes but ROS intensity was significantly decreased by 0.01 μg/mL compared with other groups ($p< 0.05$). Moreover, treatment with 0.01 μg/mL of *Humulus japonicus* extract was higher the frequency of blastocyst formation than the any other groups ($p<0.05$). Otherwise, treatment with 0.01 μg/mL of *Humulus japonicus* extract not increased the total cell number but reduced apoptotic-positive nuclei number. In conclusion, our results indicate that supplementation of *Humulus japonicus* extract in IVF medium may have important implications for improving early embryonic development in bovine embryos.**

(Key words : *Humulus japonicus*, *In vitro* fertilization, ROS, Apoptosis, Cattle)

서 론

포유동물에서 수정은 정자와 난자의 결합이 이루어지는 과정으로 전체적인 초기배 발생 과정에서 가장 중요한 과정 중의 하나이다. 특히, 체외수정에 있어서 불완전한 환경으로 인해 궁극적으로 생존력이 저하된 수정란을 생산함으로써, 이러한 수정란을 이식했을 때 낮은 착상 및 임신율로 이어진다고 할 수 있다. 또한, 체외에서 배양된 수정란은 태아로 발달할 수 있는 능력을 가지고 있지만, 불완전한 체외수정 및 배양 체계는 비정상적인 염색체 변이를 유도하기도 하며, 초기배 발육 동안 유전자 발현양상의 변화를 일으킬 수 있다(Carrell 등, 2005; Lonergan 등, 2006; Zheng과 Dean, 2007). 특히, 불완전한 체외수정 및 배양조건은 체외에서 생산된 수정란과 체내수정란 간의 질적 차이의 원인으로 보고되었다(Abeydeera 등, 1998; Kim 등, 2007). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위한 하나의 연구 분야로 천연물 추출물이 소 생식세포에 미치는 영향에 대한 연구를 제안하게 되었다.

환삼덩굴(*Humulus japonicus*)은 삼과 한해살이풀로 흔

* 본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(112130031HD030) 및 농촌진흥청 차세대바이오그린 21 사업(PJ009530012013) 지원에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-+82-53-850-6557, E-mail: dbkoo@daegu.ac.kr

히 길가나 도랑가, 논두렁 등지에서 덩굴을 이루어 자라며, 길이는 수 미터까지 뻗어나가는데, 돌기에 거꾸로 된 갈고리 모양의 가시가 있어 이를 이용하여 다른 물체에 붙어 자란다. 환삼덩굴은 글루코시드, 코스모신, 탄닌질 및 사포닌 등의 성분을 가지고 있으며, 환삼덩굴의 추출물은 혈압을 낮추거나, 이뇨작용이 있으며, 그람 음성, 양성균 및 진균에 대한 항균 작용 등의 약리작용이 알려져 있다(Park 등, 2000). 또한, 환삼덩굴의 효능을 보면 세포 보호작용, 항산화작용 및 항암효과 등이 밝혀져 있지만(Yu 등, 2007), 최근까지 이러한 물질이 포유동물 생식세포의 활성 및 배발달에 미치는 영향에 대한 연구는 전무한 실정이었다. 특히, 이러한 천연물질이 소 생식세포에서 활성산소종(ROS)의 제거 능력에 대한 연구가 필요하였다.

활성산소는 산소의 정상적인 대사 과정에서 자연적인 부산물이며, 세포의 신호전달에 중요한 역할을 하지만, 활성산소의 농도가 증가하면 세포 구조에 영향을 주어 신호전달에 악영향을 미치게 된다(Agarwal 등, 2005). 체외수정 및 수정란의 배양 과정에서 발생하는 ROS의 수준은 체내 환경과 비교하여 상당히 높아서, 이러한 산화적 스트레스에 지속적으로 노출된 체외수정란에서의 ROS의 수준이 증가할 수밖에 없다. 또한, 이러한 산화적 스트레스는 세포막을 통하여 ROS를 쉽게 통과시킬 수 있기 때문에 체외수정란 발달에 악 영향을 미치고, 생성된 ROS는 지질, 단백질 그리고 핵산과 같은 세포의 분자 수준을 변형시킴으로 인하여 미토콘드리아 손상, 수정란 발달 장애, ATP 결손 그리고 세포 사멸을 일으킨다(Takahashi, 2012). 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione reductase 등의 효소 계열의 예방적 항산화제(Duh 등, 1999)와 phenol성 화합물, tocopherol류, ascorbic acid, carotenoid, glutathione 및 아미노산 등의 천연항산화제가 있으며(Osborn과 Akoh, 2003), 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisloe와 butylated hydroxy toruene 등은 안전성에 대한 논란이 제기되어, 허용대상 식품이나 사용량이 법적으로 엄격히 규제되었다(Yen과 Hsieh, 1998). 따라서 천연물질로부터 산화반응 및 radical의 반응성을 억제할 수 있는 항산화 효과에 대한 연구가 다양한 암세포 등에서 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 그러나 포유동물 생식세포에 천연물질을 처리하여 다양한 양상을 조사한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 소 체외수정 배지에 환삼덩굴 추출액을 첨가하여 소 정자의 활성도와 수정 양상 그리고 배반포로의 배 발달율과 배반포의 질적 수준을 세포 사멸과 항산화지수에 미치는 영향 등에 대해 비교 검토하였다.

재료 및 방법

배양액

본 논문에서 언급하지 않은 모든 시약은 Sigma Aldrich Korea(Yongin, Korea)에서 구입하였다. 난자 성숙 배지는 TCM-199(GIbco-BRL, Grand Island, NY, USA) 용액에 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Hyclon, Logan, UT, USA), 0.6 mM cysteine, 10 IU/mL pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG), 10 ng/mL β-mercaptoethanol, 10 ng/mL EGF, 1 μg/mL 17 β-estradiol, 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (hCG), 25 μg/mL gentamycin을 첨가하여 사용하였다. 체외수정 배지는 114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 0.4 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 2 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM sodium lactate로 구성된 Fert-TALP 용액에 0.2 mM sodium pyruvate, 6 mg/mL BSA, 25 μg/mL gentamycin과 25 μg/mL heparin, 2 mM penicillamine, 0.1 mM hypotaurine, 0.05 mM epinephrine (PHE)를 첨가한 후 사용하였다. 수정란의 체외배양 배지는 수정 후 3일째까지는 0.3% BSA가 첨가된 CR1-aa를 사용하였고, 수정 후 4일째부터는 BSA 대신 10% FBS가 첨가된 CR1-aa 용액에 4일간 추가 배양하였다.

정자의 운동성 평가

정자의 운동성 평가는 환삼덩굴 추출액을 체외수정용 배지에 정자와 함께 38.5℃ 온도와 5% CO_2조건하에서 24시간 동안 배양 후 실체 현미경하에서 markler chamber을 이용하여 평가하였다. Markler chamber에 10 μL의 각각 처리된 용액을 넣어 10칸을 3회 counting하여 평균값을 낸다. 10칸에 있는 전체 정자 수에서 살아있는 정자 수의 비율을 계산하였다.

체외성숙, 수정 및 배양

도축장에서 회수한 소 난소를 75 μg/mL potassium penicillin G가 첨가된 생리식염수에 넣어 25-30℃ 온도의 상태로 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 난소는 멸균된 37℃의 생리식염수로 3번 이상 세척한 뒤, 난포의 직경이 3~6 mm 정도되는 것을 18 게이지 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입한 후 실체 현미경 하에서 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 Tyrode's lactate(TL)-Hepes 용액으로 3회 세척한 뒤 체외성숙 배양액으로 3회 이상 세척하였다. 체외성숙 배양액 50 μL 소적에 10~15개의 난포란을 넣어 38.5℃ 온도와 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. 체외성숙이 완료된 난포란은 수정용 배양액에 3번 세척 후 수정용 배양액 소적(44 μL)에 10개씩 옮겨두고, 동결된 소의 정자를 2×10^6/mL의 최종 농도로 맞추어 25 μg/mL heparin과 PHE를 함께 첨가한 후 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 22시간 동안 수정을 유도하였다. 또한, 체외수정 유도 후 16~18 시간째 정상 및 다정자 수정 여부를 확인하기 위하여 0.1% orcein 염색 방법을 수행하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 난구세포를 제거한 후 3 mg/mL BSA가 첨가된 CR1-aa 배양액에 세척하였으며, 체외배양 용액 50 μL 소적에 10~15개씩 옮겨 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 48시간 배양한 후 수정란의 난할 정도를 확인하였다. 이후 10% FBS가 첨가된 CR1-aa 용액에 96시간 추가 배양을 실시한 후 배반포 형성을 조사하였다. 환삼덩굴 추출물의 처리는 체외수정

과정 동안 처리하였다.

ROS 발현 수준 분석

체외수정 후 수정란을 회수하고 남은 배지에 10 mM dichlorohydrofluorescein diacetate(DCHFDA)를 첨가하여 침지시키고, 배양 20분 후 배지를 형광현미경(Olympus, Japan)으로 조사하였다. 기록된 형광 이미지는 Image J software(National Institutes of Health, Bethesda, MD)로 분석하였다.

TUNEL 분석

TUNEL kit는 *In Situ* Cell Death Detection Kit(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)의 Fluorescent 1번과 2번을 사용하였으며, 혼합은 1:9의 비율로 희석하였다. 체외수정 후 배양 6일째 생산된 배반포를 0.1% polyvinylpyrrolidone(PVA)이 첨가된 dPBS(Gibco Life Technologies Co., Grand Island, NY, USA) 용액으로 3회 세척한 후 4% paraformaldehyde가 첨가된 dPBS 용액에 침지시켜 4℃에서 1시간 고정시켰다. 고정된 배반포를 PVA-dPBS 용액으로 3회 세척하여 0.1% Triton X-100이 첨가된 dPBS 용액에 다시 침지시켜 4℃에서 30분간 냉장 보관한다. 그리고 PVA-dPBS 용액으로 3회 세척하여 TUNEL kit를 혼합한 용액에 침지시켜 39℃, 5% CO_2 배양기에서 1시간 배양 후 PVA-dPBS 용액으로 3회 세척한 후 DAPI가 첨가된 10 μL mounting medium으로 고정된 배반포를 옮겨 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 배반포의 전체 세포 수와 세포사멸 수를 조사하였다.

실험 설계

실험 1. 체외수정 시기에 환삼덩굴 추출액 처리농도는 0, 0.01, 0.05 그리고 0.1 μg/mL 단위로 처리하여 정자의 운동성과 배지에서의 ROS 발현 정도를 관찰하였다.

실험 2. 체외수정 시기에 환삼덩굴 추출액을 각각의 농도를 처리한 용액에서 수정을 유도한 후 16~18 시간째에 0.1% orcein 염색을 수행하여 정상 및 다정자 수정 여부를 관찰하였다.

실험 3. 체외수정 시기에 환삼덩굴 추출액이 각각의 농도로 처리된 군에서 수정을 유도한 후 2일째에 난할율을 확인하였으며, 7일째 배반포 형성율과 TUNEL 분석을 통해 배반포의 질적 수준을 확인하였다.

통계처리

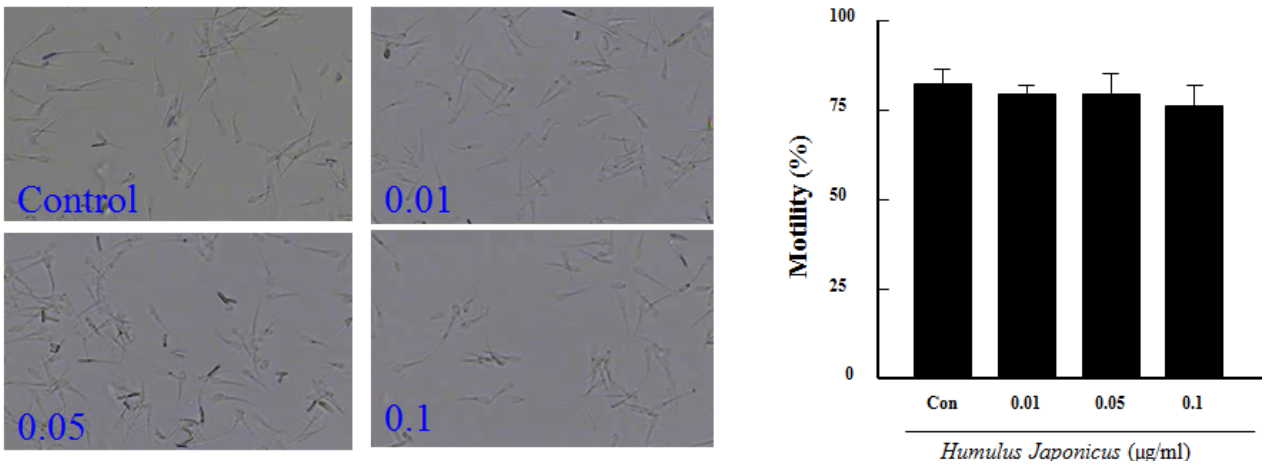
본 실험에서의 각 처리 구는 최소한 4회 이상 반복 실시하였다. 실험결과에 대한 통계학적 분석은 χ^2-test를 이용하여 실시하였으며, SigmaPlot 2001 program을 이용하여 유의차를 검정하였다.

결 과

소 정자의 활동성 및 체외수정 양상 및 배발달에 있어서 환삼덩굴 추출액 처리 효과

체외수정 배지에 환삼덩굴 추출액을 처리한 결과, 정자의 운동성에는 각각의 처리군이 대조군과 비슷하였지만(Fig. 1), ROS 발생에 있어서는 0.01 μg/mL 농도 처리군의 경우가 대조군보다 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 2; $p<0.05$). 한편, 각각의 농도를 처리하여 수정 양상을 확인한 결과, 대조군과 유사한 양상을 보였다(Table 1).

체외수정 배지에 환삼덩굴 추출액 처리후 배반포로의 발달율은 Table 2와 같다. 0.01 μg/mL 농도의 처리군에서의 난할율은 대조군과 비슷하였지만, 배반포로의 발생율은 대조군보다 유의하게 높게 생성되었다($p<0.05$). 그러나 0.1 μg/mL 처리군에서의 난할율(76.8±3.9%)과 배반포 발생율(25.7±1.4%)는 대조군(85.7±3.9%, 35.5±1.8%)보다 유의하게 낮게 나타났다($p<0.05$).



Motility (%) = Live sperms/Total sperms X 100

Fig. 1. Effect of *Humulus japonicus* extract on motility of bovine sperm in IVF medium.

Table 1. Effect of various concentrations of *Humulus japonicus* extract supplemented with fertilization medium on bovine oocytes fertilization parameter

Group (μg/mL)	No. of oocytes examined	% of pronuclear formation				% of oocytes penetrated	% of polyspermic oocytes
		MII	1PN	2PN	3PN		
0	20	10.0	10.0	60.0	20.0	90.0	33.3
0.01	20	10.0	10.0	70.0	10.0	90.0	22.2
0.05	20	10.0	10.0	60.0	20.0	90.0	33.3
0.1	20	20.0	10.0	50.0	20.0	80.0	37.5

Table 2. Effect of various concentrations of *Humulus japonicus* extract during *in vitro* fertilization on development of bovine embryos

Group (μg/mL)	No. of embryos examined	No. (%)of embryos cleaved	No. (%)of blastocysts produced
0	84	72 (85.7±3.9)[a]	30 (35.5±1.8)[a]
0.01	86	73 (85.3±3.4)[a]	34 (39.6±1.1)[b]
0.05	80	66 (82.5±2.0)[a]	24 (30.1±2.0)[c]
0.1	78	60 (76.8±3.9)[b]	19 (25.7±1.4)[d]

Data are the means±SD. Values with different superscripts within a column differ significantly (p<0.05).

체외수정 시 환삼덩굴 추출액 처리에 의해 생산된 수정란의 질적 분석

체외수정 시 환삼덩굴 추출액 처리에 의해 생산된 배반포의 질적 수준을 평가한 결과는 Fig. 3과 같다. 환삼덩굴 0.05, 0.1 μg/mL 농도의 추출액 처리군에서 생산된 배반포의 총 세포수는 대조군에서 생산된 배반포의 그것보다 낮았다. 또한, 환삼덩굴 0.05, 0.1 μg/mL 농도의 추출액 처리군에서 생산된 배반포의 세포사멸지수에 있어서는 대조군에서 생산된 배반포의 그것보다 높게 나타났다. 하지만, 환삼덩굴 0.01 μg/mL 추출액 처리군에서 생산된 배반포의 총 세포 수는 증가하였고, 세포사멸지수는 감소하는 경향을 보여주었다.

고 찰

본 연구에서는 소 체외수정 과정 중 환삼덩굴 추출물의 첨가에 따른 정자의 활성도, 난자에서의 수정 양상과 착상전 배발달 양상을 조사하였다. 결과적으로 환삼덩굴 추출물이 정자의 활력에 큰 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었으며, 체외수정 과정에 처리함으로써 착상전 배발달 능력과 배반포기 배의 질적 수준이 향상됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 환삼덩굴 추출물에 존재하는 물질 중 산화적 스트레스를 완화시키는 물질의 역할로

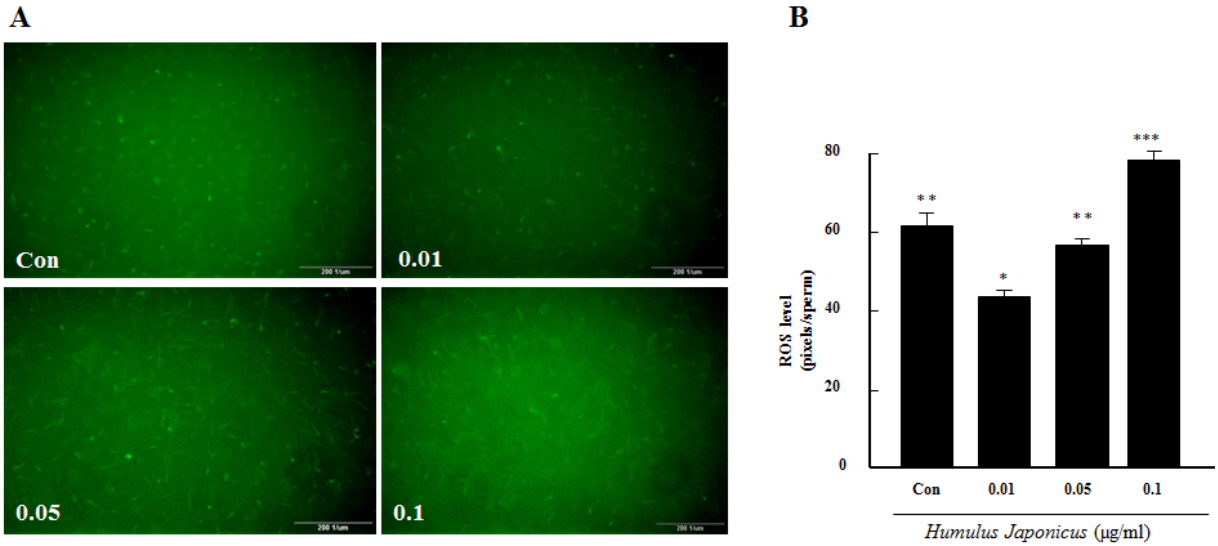


Fig. 2. Fluorescence microscopy images of ROS expression in bovine sperms. Fluorescence microscopy imaging of intracellular ROS expression **(A) and ROS relative intensity (B).** Data are the mean±SD. Statistically significant differences are indicated by asterisks (p<0.05).

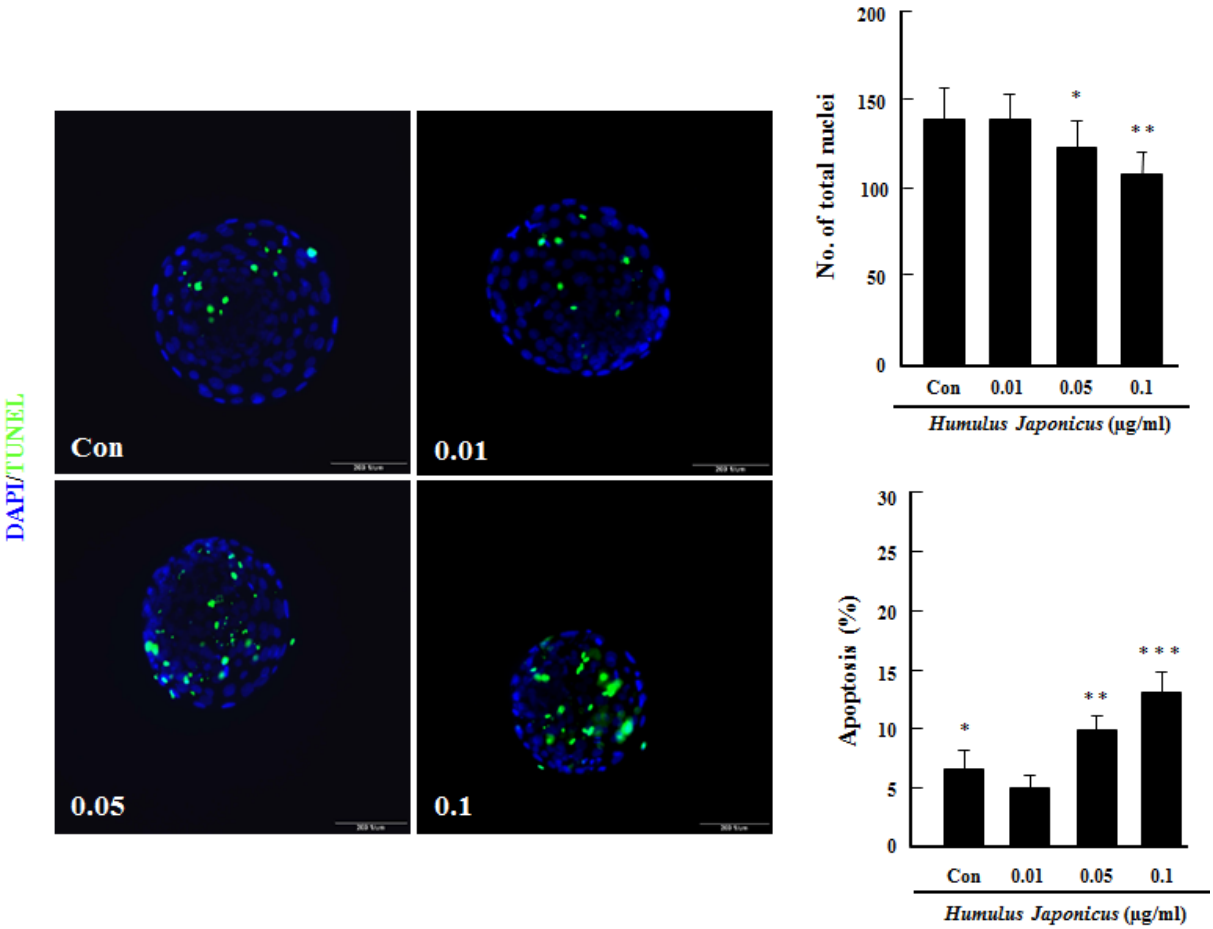


Fig. 3. Comparison of epifluorescent images on apoptotic index in bovine blastocysts derived from *Humulus japonicus* extract treated groups. The chromatin contentis stained by DAPI (blue), fragmented DNA is labeled by the TUNEL reaction (green), and colocalization with DAPI appears sky-blue. Data are the mean±SD. Statistically significant differences are indicated by asterisks (p<0.05). Scale bars=100 μm.

인해 나타나는 현상으로 예측된다.

일반적으로 체외배양 과정에서 수정란은 체내 환경과 다르게 산화적 스트레스에 노출되고, 수정란 내에 ROS의 생산은 증가한다(Kitagawa 등, 2004). 활성산소는 free radical을 가진 산소를 의미하며, 광범위하게는 lipid peroxide, lipid peroxy radical, peroxynitrite 등이 포함된다. 활성산소는 불안정한 성격을 띠고 있으며, 주위의 물질과 반응성이 아주 강해 세포내 단백질이나 지질 분자는 물론이고, 유전정보를 함유한 DNA에도 산화적 손상을 입히며, 결과적으로 미토콘드리아 fission/fusion dynamic에 영향을 주어 ATP 결핍, 수정란 발달 정지 그리고 세포사멸을 일으킨다(Guerin 등, 2001). 한편, 산화적 스트레스는 착상 전 체외수정란에 해로운 영향을 미치고, 체외배양 환경에서 산화적 스트레스를 줄이는 것이 체외수정란 생산 환경에 있어서 중요한 요인으로 인식되어지고 있다(Olson 과 Seidel, 2000; Oris 와 Leese, 2001).

이전 많은 연구자들이 ROS가 정자와 착상전 체외수정란에 해로운 영향을 미치고, 체외배양 환경에서 ROS를 제거하는 것이 정자의 기능적 측면과 수정란의 발달상의 능력을 향상시킨다고 보고하였다(Deleuze와 Goudet, 2010; Takahashi, 2012). 환삼덩굴 추출액은 페놀성 화합물을 함유하고, 다양한 구조와 분자량을 가지고 있는 물질로 구성되어 있으며, 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기가 단백질과 같은 거대분자와의 결합을 통해 항산화, 항암 및 항균 등의 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Choi 등, 2003). 또한, 이전 연구에서는 플라보노이드 계열의 물질을 함유하고 있다고 보고하였다(Jung 등, 2004). 식물기원의 플라보노이드와 같은 물질은 산화적 스트레스를 제거하기 위한 중요한 항산화제로 이용되며, 세포배양과정에서 산화적 스트레스로부터 DNA 손상을 막을 수 있다고 보고되었다(Rice-Evans 등, 1996). 따라서 본 연구에서는 체외수정 후 착상전 배발달 양상에 있어서 환삼덩굴 추출액의 효과를 확인하기 위하여 체외수정 과정 동안 적정 농도의 환삼덩굴 추출액을 처리한 결과, 체외수정 배지에서 정자의 운동성에는 특별한 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다(Fig. 1). 반면에, 환삼덩굴 추출

액 적정농도(0.01 μg/mL)를 처리한 체외수정 배양 환경에서는 배양액 내의 ROS가 감소하였고(Fig. 2), 수정란의 착상전 배발달 능력이 향상됨을 확인할 수 있었다(Table 2). 따라서, 환삼덩굴 추출액은 활성산소를 제거하는 항산화 기능을 가지고 있다고 판단되며, 이로 인하여 배양액의 환경 개선을 통해 궁극적으로 수정란의 배발달 능력이 향상되었다고 판단된다.

포유동물 수정란에서 전체 세포 수는 배반포의 질적 수준과 생존 능력을 판단할 수 있는 지표이며, 수정란 발달 동안 세포사멸은 핵과 염색체 이상으로 인해 수정란의 질적 수준을 저하시킬 수 있고(Metwee 등, 2000), 수정란은 체외배양 동안 ROS 발생으로 인하여 세포사멸이 유도될 수 있다고 보고되었다(Tatemoto 등, 2000). 특히, ROS는 세포의 외부 요소들과 반응하여 미토콘드리아 의존적 세포사멸을 매개할 수 있다는 보고도 있다(Herrera 등, 2001). 이와는 대조적으로, 체외배양 배지에 항산화제 첨가는 산화적 스트레스의 예방으로 인해 생산된 수정란에서 세포사멸을 줄일 수 있다는 보고가 있었다(Liu 등, 2003; Uhm 등, 2007). 따라서, 본 연구에서는 체외수정 과정 동안 환삼덩굴 추출액을 첨가하여 생산된 배반포를 이용하여 DAPI/TUNEL 분석을 통하여 전체 세포 수와 세포사멸 지수를 확인하였다(Fig. 3). 환삼덩굴 추출액 0.01 μg/mL 처리군에서 DAPI/TUNEL 분석을 실시한 결과, 전체 세포 수는 증가하였으며, 세포사멸 지수는 대조군에 비해 다소 낮게 나타나는 양상을 보여주었다(Fig. 3). 한편, 환삼덩굴 0.05, 0.1 μg/mL 첨가군에서는 대조군에 비해 세포 수는 감소하고, 세포사멸 지수는 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 적정 농도에서의 환삼덩굴 추출액이 체외수정 과정 동안 산화적 스트레스를 완화시킴으로 인해 이후 생산된 배반포의 질적 수준이 향상된 것으로 예측된다.

결론적으로, 체외수정 기간 동안 적정 농도의(0.01 μg/mL) 환삼덩굴 추출액을 첨가함으로써 수정란의 착상전 배발달 능력과 질적 수준이 향상된다는 것을 본 연구를 통해 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 환삼덩굴 추출액의 항산화 효능에 의해 나타나는 현상으로 판단된다. 따라서 포유동물 초기배의 발달에 있어서 이러한 천연물의 효능을 확인할 수 있는 연구를 통해, 착상전 배아를 보다 효율적으로 생산할 수 있는 배양 체계를 개선할 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN (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 Reprod Dev 51:395-401.
2. Agarwal A, Allamaneni SS, Nallella KP, George AT, Mascha E (2005): Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after *in vitro* fertilization: a qualified meta-analysis. Fertil Steril 84:228-231.
3. Benzie I, Strain J (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. Anal Biochem 239:70-76.
4. Carrell DT, Liu L, Huang I, Peterson CM (2005): Comparison of maturation, meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two protocols for *in vitro* culture of mouse secondary follicles. J Assist Reprod Gen 22:347-354.
5. Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J (2003): The antioxidant activities of the some commercial teas. J Korean Soc Food Sci Nutr 32:723-727.
6. Deleuze S, Goudet G (2010): Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. Reprod Domest Anim 45:476-482.
7. Duh PD, Tu YY, Yen GC (1999): Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur(*Chrysanthemum morifolium* Ramat). Lebensm Wiss Technol 32:269-277.
8. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 7:175-89.
9. Herrera B, Alvarez AM, Sánchez A, Fernández M, Roncero C, Benito M, Fabregat I (2001): Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. FASEB J 15:741-751.
10. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI (2004): Screening for antioxidant activity of plant medical extracts. J Korean Soc Appl Biol Chem 47: 135-140.
11. Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC (2006): Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. Theriogenology 65:137-152.
12. Kim K, Lerou P, Yabuuchi A, Lengerke C, Ng K, West J, Kirby A, Daly MJ, Daley GQ (2007): Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. Science 315:482-486.
13. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T (2004): Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology 62:1186- 1197.
14. Liu L, Trimarchi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL (2003): Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. J Biol Chem 278:31998-32004.
15. Matwee C. Betts DH, King WA (2000): Apoptosis in the early bovine embryo. Zygote 8:57-68.
16. Olson SE, Seidel GE Jr (2000): Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients.

Biol Reprod 62:248-52.
17. Orsi NM, Leese HJ (2001): Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. Mol Reprod Dev 59:44-53.
18. Osborn-Barnes HT, Akoh CC (2000): Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol 43:141-147.
19. Pal RS, Arun Kumar R, Agrawal PK, Bhatt JC (2013) Antioxidant capacity and related phytochemicals analysis of methanilic extract of two wild edible fruits from north western indian himalaya. Int J Pharm Bio Sci 4:113-123.
20. Park SW, Chung SK, Park JC (2000): Active oxygen scavenging activity of leteolin-7-O-β-D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. J Korean Soc Food Sci Nutr 29:106-110.
21. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996): Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Bio Med 20:933-956.
22. Song K, Hyun SH, Shin T, Lee E (2009): Post-activation treatment with demecolcine improves development of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs by modifying the remodeling of donor nuclei. Mol Reprod Dev 76:611-619.
23. Takahashi M (2012): Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. J Reprod Dev 58:1-9.
24. 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 63:805-810.
25. Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, Lee SH, Lee HT (2007): Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. Mol Reprod Dev 74:1386-1394.
26. Yen GC, Hsieh CL (1998): Antioxidant activity of extracts from Du-zhong(*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. J Agtic Food Chem 46:3431-3436.
27. Yu BC, Yang MC, Lee KH, Kim KH, Choi SU, Lee KR (2007): Two new phenolic constituents of *Humulus japonicus* and their cytotoxicity test *in vitro*. Arch Pharm Res 30:1471-1475
28. Zheng P, Dean J (2007): Oocyte-specific genes affect folliculogenesis, fertilization, and early development. Semin Reprod Med 25:243-251.

(Received: 5 September 2014/ Accepted: September 17 2014)