

## Isoproterenol과 Melatonin의 첨가가 돼지 단위발생란의 체외발달에 미치는 영향

정다운 · 윤윤진 · 박희성<sup>†</sup>

경남과학기술대학교 동물생명과학과

### Effects of Isoproterenol and Melatonin Supplementation on *In Vitro* Development of Parthenogenetic Activated Oocytes in Pig

Da-Un Jeong, Yun-Jin Yun and Hee-Sung Park<sup>†</sup>

Dept. of Animal Science & Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

#### ABSTRACT

In this study, to improve the *in vitro* development of various cells including cloned embryos, the effects that isoproterenol and melatonin have on *in vitro* development of porcine parthenogenetic oocytes were investigated. Parthenogenetic activation was induced with electrical stimulation, BSA and 6-DMAP treatment.  $10^{-7}$  M of melatonin and isoproterenol ( $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  and  $10^{-14}$  M) were supplemented for *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* culture (IVC) medium, with different concentrations. When isoproterenol and melatonin were supplemented in IVM medium with different concentrations, there was no significant ( $P<0.05$ ) difference of maturation rate in the treatment groups as well as in that of only melatonin. As isoproterenol and melatonin were supplemented in IVM medium with different concentrations, blastocyst rates of isoproterenol  $10^{-12}$  M treatment group (37.1%) were significantly ( $P<0.05$ ) higher than control group (26.0%). Isoproterenol and melatonin were supplemented in IVC medium with different concentrations, then the cleavage rate of  $10^{-12}$  M isoproterenol treatment group (82.2%) was significantly ( $P<0.05$ ) higher than the group that melatonin was only supplemented (70.9%). There was no difference of blastocyst rate between the treatment groups. When isoproterenol and melatonin were supplemented for IVM+IVC medium with different concentrations, the cleavage rate of  $10^{-12}$  M isoproterenol treatment group (92.5%) was significantly ( $P<0.05$ ) higher than the control group (82.8%) and the group that melatonin was only treated (81.6%). The blastocyst rate of  $10^{-12}$  M as 45.6% was significantly ( $P<0.05$ ) higher than control group (25.2%) and melatonin treatment group (31.2%). The cell number of blastocyst in  $10^{-12}$  M isoproterenol treatment group  $35.5\pm 3.4$  was significantly ( $P<0.05$ ) highest. The results of this study showed that the development rate of IVC when both isoproterenol and melatonin were supplemented was higher than when melatonin was only supplemented. Therefore, it is concluded that isoproterenol is rather effective in the activation of melatonin.  $10^{-7}$  M melatonin and  $10^{-12}$  M isoproterenol were considered suitable concentration.

(Key words : melatonin, isoproterenol, parthenogenesis, *in vitro* culture, porcine)

#### 서 론

오늘날 생명공학기술의 눈부신 발전에 힘입어 복제동물 생산, 줄기세포를 이용한 질병치료, 형질전환동물 생산 등에 의한 치료용 단백질 생산, 멸종 위기 동물종 복원 등의 활발한 연구를 통하여 인간의 수명 연장을 비롯한 다양한 분야에 응용 가능성이 입증되었으며, 일부는 적용단계에 있으나 효율성은 아직도 극히 낮은 실정이다.

그 원인 중에 하나가 체외 배양 환경에서 난자 조작시 여러 가지 유해한 환경에 대한 노출에 있다. 일반적인 대기 환경에는 질소가 약 78%로 가장 높고, 산소가 21%로서 두 번째로 높은 농도를 차지하고 있다. 세포는 에너지를 얻기 위해 산소를 이용하여 세포호흡을 한다. 이 과정에서 hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), superoxide anion radical( $O_2^{\cdot -}$ ), hydroxyl radical(OH) 및 singlet oxygen( $^1O_2$ )과 같은 활성 산소종(ROS: Reactive Oxygen Species)들이 대사과정의 부산물로 쉽게 생성된다(Tengattini 등,

이 논문은 2014학년도 본 대학 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : hspark@gntech.ac.kr

2008). ROS는 체내에서 병원체를 파괴하는 등 여러 가지 살균 작용, 배란 과정 중 난포 파열에 관여 및 난자를 포함한 다른 세포에서 세포내 신호 전달 분자로서 중요한 매개체 역할을 한다. 하지만 ROS는 체외에서 감염에 의한 염증, 특정 의약품, 방사선 및 오염물질 등과 같은 여러 조건에 의해 과잉 생산되기 쉽고, 결과적으로 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 한다(Goud 등, 2008). 산화 스트레스는 난자의 성숙 촉진인자 저하, 칼슘의 항상성 유지 저해, 염색체 및 방추체의 구조 변경 유발, 특히 미토콘드리아 내에 중점적으로 과잉 생산되어 DNA 손실 또는 불활성화 및 돌연변이를 유발한다. 뿐만 아니라 직접적으로 DNA, 단백질 및 지질과 같은 난자의 세포내 소기관들을 손상시켜 난자의 노화를 촉진시키며, 세포막 손상을 일으켜 낮은 생존율 또는 수정란의 비정상적인 발달을 초래한다(Lord 등, 2013).

Melatonin(N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 활성산소의 제거 능력이 비타민 C 및 비타민 E보다 높으며, 세포막 및 세포 기관을 쉽게 통과하여 직접적인 활성산소 청소부 역할(free radical scavenger)을 하여 소를 비롯한 포유동물 수정란의 품질을 개선시켜 체외발달 효율을 증가시킨다. 또한 melatonin은 세포막 수용체를 매개로 여러 항산화 효소들을 자극하여 산화 방지제인 GSH(glutathione) 생산을 촉진시켜 생체내 산화환원반응에 중요한 역할을 한다(Reiter 등, 2009; Tamura 등, 2012). Melatonin은 포유동물에서 트립토판의 유도체로 빛의 자극이 없는 밤 시간대에 생체 시계역할을 하는 시교차 상핵(Suprachiasmatic nucleus)으로부터 자극을 받아 N-아세틸전이효소(N-Acetyltransferase) 및 여러 효소들의 작용에 의해 송과선으로부터 생성된다(García 등, 2014).

Isoproterenol(C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>, 3,4-dihydroxy- $\alpha$ -(isopropylamino)methyl]benzyl alcohol)은  $\beta$ -아드레날린 수용체에 특이적으로 작용하여 빛의 자극이 있는 낮 시간에도 NAT의 작용을 활성화 시켜 melatonin의 합성을 촉진한다(Gupta 등, 2005). 또한 밤 시간동안 빛을 노출시켜 melatonin의 합성과 분비를 중단시켰을 때 아드레날린 작용제인 isoproterenol로 자극하면 빛 노출에 대한 melatonin 분비 억제 경로를 방해할 수 있다(Kennaway 등, 2000).  $\beta$ 2-아드레날린 수용체는 착상 전 초기 수정란부터 배반포기단계까지 전사되며, 마우스 수정란의 발달에 영향을 미친다(Čikoš 등, 2005).

본 연구에서는 복제 수정란을 비롯한 각종 세포의 체외 발달율을 개선하기 위한 기초 연구로서 melatonin의 활성화 역할을 하는 isoproterenol을 melatonin과 함께 돼지 난포란의 체외 성숙 및 체외 배양용 배양액에 첨가하여 isoproterenol과 melatonin이 돼지 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 채란 및 체외 성숙

본 실험에서 사용된 모든 시약들은 특별한 표기가 없는 이상 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

난포란의 채집은 도축장에서 도축되는 돼지 난소를 채취하여 100 IU/ml penicillin G와 100  $\mu$ g/ml의 streptomycin이 첨가된 37°C로 가온된 0.9% 생리식염수에 침적하여 2시간 이내로 실험실로 운반하였다. 직경이 3~6 mm 크기의 난포로부터 난포란을 흡입하여 채집한 다음, 침전물은 TL-HEPES로 4~5회 세척 후 난구세포층이 치밀하고 세포질이 양호한 난포란들만 선별하여 실험에 사용하였다. 난포란의 체외 성숙용 배양액은 TCM-199(Gibco, U.S.A)을 기본배양액으로 하여 10% FBS(Gibco, U.S.A), 0.2 mM pyruvate, 10  $\mu$ g/ml FSH, 10  $\mu$ g/ml LH, 1  $\mu$ g/ml E<sub>2</sub>, 0.1 mM EGF 및 0.2 mM cystine을 첨가하여 사용하였다. 난포란의 체외 성숙은 5% CO<sub>2</sub>, 38.5°C 배양기 내에서 44시간 동안 배양을 실시하여 체외 성숙을 유도하였다.

### 2. 성숙 난자의 단위 발생 유기

체의 성숙이 완료된 난자들은 0.5% hyaluronidase로 난구세포를 제거한 다음 세포질 상태가 양호하고, 극체가 뚜렷하게 보이는 난자만을 선별하여 단위 발생에 사용하였다. 활성화 처리는 0.3 M mannitol 용액(0.3 M mannitol, 0.05 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub> 및 0.5 mM Hepes)을 사용하였으며, 전기 세포 융합기(BTX 2001, U.S.A)를 사용하여 직류전류(DC) 1.74 kv/cm, 30  $\mu$ sec, 1회 전기 자극을 준 다음 BSA용액에서 3분, 2 mM 6-DMAP 용액에서 2시간 동안 처리하여 활성화를 유도하였다.

### 3. 단위발생란의 체외 배양 및 핵 수 조사

활성화 처리가 완료된 난자들의 체외 배양용 배양액은 PZM-5에 3 mg FAF-BSA를 첨가하여 사용하였으며, 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 7일간 배양하였다. 분할율 및 배반포기 발달율은 배양 2일째 및 7일째에 각각 조사하였으며, isoproterenol과 melatonin은 실험설계에 따라 농도별로 배양액에 각각 첨가하여 사용하였다. 배양 7일째 배반포기란은 Hoechst 33342를 사용하여 염색을 실시하였다. Slide glass에 0.1% trypan blue 용액을 15  $\mu$ l 떨어뜨린 후, 배반포기를 옮겨 실온에서 3~4분 배양한 다음 1 mg Hoechst 33342 15  $\mu$ l를 0.75 ml의 2.3% sodium citrate dihydrate와 0.25 ml ethanol에 희석한 용액으로 37°C에서 3~5분간 배양한 후 permount로 고정하여 형광 도립 현미경하에서 핵 수를 조사하였다.

### 4. 실험 설계

Isoproterenol은 95% ethanol로, melatonin은 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 각각 용해하여 실험에 사용하였다. Melatonin의 첨가 농도는 이전 연구(정 등, 2014)에서 최적의 농도로 확인된  $10^{-7}$  M 농도로 희석하여 사용하였으며, isoproterenol은  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  및  $10^{-14}$  M 농도로 melatonin과 함께 첨가하여 적정 농도를 확인하였다.

Isoproterenol과 melatonin의 첨가방법은 체외 성숙시, 체외 배양시 및 체외 성숙과 체외 배양 동시에 상기의 각각 농도별로 첨가하여 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하였다.

### 5. 통계학적 분석

본 실험의 데이터는 SAS package(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 Chi-square 분석 및 ANOVA test에서 Duncan 검증을 실시하여 각 요인의 유의성 검정을 실시하였다.

## 결 과

### 1. 돼지 난포란의 체외 성숙에 있어서 Isoproterenol과 Melatonin의 첨가 농도에 따른 체외 성숙율

돼지 난포란의 체외 성숙시 isoproterenol과 melatonin을 첨가하였을 때 체외 성숙율은 Table 1에서 보는 바와 같다. Melatonin  $10^{-7}$  M과 isoproterenol을  $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  및  $10^{-14}$  M을 첨가하였을 때 체외 성숙율은 69.4%, 71.3% 및 68.6%로써 처리구간에 유의적( $P<0.05$ )인 차이가 없었으며, melatonin(70.7%) 단독 첨가구와도 차이가 없었다.

### 2. 돼지 난포란의 체외 성숙에 있어서 Isoproterenol과 Melatonin의 첨가 농도에 따른 단위발생란의 체외 발달율

Table 1. Effects of isoproterenol (I) and melatonin (M) supplementation to IVM medium on the maturation of porcine oocytes

Treatment (M)	No. of oocytes matured	No. of polar body extruded (%)	No. of polar body non-extruded (%)	No. of lysis (%)
Control	225	149(66.2)	50(22.2)	26(10.2)
M	188	133(70.7)	31(16.5)	24(12.8)
I $10^{-10}$ + M	222	154(69.4)	46(20.7)	22( 9.9)
I $10^{-12}$ + M	188	134(71.3)	39(20.7)	15( 8.0)
I $10^{-14}$ + M	191	131(68.6)	31(16.2)	29(15.2)

\* M : Melatonin,  $10^{-7}$  M.

\*\* Values in the same column are not significantly different ( $P>0.05$ ).

돼지 난포란의 체외 성숙시 isoproterenol과 melatonin을 첨가하였을 때 체외 발달율은 Table 2에서 보는 바와 같다. 체외 성숙시 isoproterenol과 melatonin을 농도별로 각각 첨가하였을 때 분할율은 차이가 없었다. 배반포기로의 발달율은 isoproterenol  $10^{-12}$  M 처리구가 37.1%로서 대조구의 26.0%보다 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다. Isoproterenol 처리구간에도  $10^{-12}$  M이  $10^{-10}$  M(22.5%)보다 유의적으로 높았다. 배반포기의 핵수에 있어서는 처리구간 차이가 없었다.

### 3. 돼지 단위발생란의 체외 배양에 있어서 Isoproterenol과 Melatonin의 첨가 농도에 따른 체외 발달율

돼지 단위발생란의 체외 배양시 isoproterenol과 melatonin을 첨가하였을 때 체외 발달율은 Table 3에서 보는 바와 같다. 단위 발생란의 체외 배양시 isoproterenol과 melatonin을 농도별로 각각 첨가하였을 때 분할율은  $10^{-12}$  M이 82.2%로서 melatonin 단독 첨가구의 70.9%보다 유의적( $P<0.05$ )으로 높았다. 그러나 isoproterenol  $10^{-10}$  M(77.0%),  $10^{-14}$  M(79.5%) 처리구 및 대조구(76.1%)와는 차이가 없었다. 배반포기 발달율은 처리구 및 대조구간에 차이가 없었으며, 배반포기의 핵수도 차이가 없었다.

### 4. 돼지 난포란의 체외 성숙과 배양시 Isoproterenol과 Melatonin의 첨가 농도에 따른 단위발생란의 체외 발달율

돼지 난포란의 체외 성숙 및 배양용 배양액에 isoproterenol과 melatonin을 첨가했을 때 체외 발달율은 Table 4에서 보는 바와 같다. 단위발생란의 체외 성숙 및 체외 배양 전체 기간 동안 isoproterenol과 melatonin을 농도별로 첨가하였을 때 분할율은 isoproterenol  $10^{-12}$  M 첨가구가 92.5%로서 대조구(82.8

Table 2. Effects of isoproterenol and melatonin supplementation to IVM medium on the development of porcine parthenogenetic oocytes

Treatment (M)	No. of cultured oocytes	No. of cleaved oocytes (%)	No. of development to blastocyst (%)	Cell number of blastocysts (mean±S.D.)
Control	150	122(81.3)	39(26.0) <sup>bc</sup>	27.7±2.5
M	170	142(83.5)	55(32.4) <sup>abc</sup>	27.3±3.2
I $10^{-10}$ + M	111	89(80.2)	25(22.5) <sup>c</sup>	24.3±3.1
I $10^{-12}$ + M	159	128(80.5)	59(37.1) <sup>a</sup>	32.0±7.5
I $10^{-14}$ + M	159	140(88.1)	54(34.0) <sup>ab</sup>	31.0±6.6

\* Values with different superscripts in the same column are significantly different( $P<0.05$ ).

Table 3. Effect of isoproterenol and melatonin supplementation to IVC medium on the development of porcine parthenogenetic oocytes

Treatment (M)	No. of cultured oocytes	No. of cleaved oocytes (%)	No. of development to blastocyst (%)	Cell number of blastocysts (mean±S.D.)
Control	113	86(76.1) <sup>ab</sup>	26(23.0)	26.0±2.9
M	117	83(70.9) <sup>b</sup>	29(24.8)	25.6±3.3
I 10 <sup>-10</sup> + M	113	87(77.0) <sup>ab</sup>	27(23.9)	27.6±4.2
I 10 <sup>-12</sup> + M	129	106(82.2) <sup>a</sup>	43(33.3)	29.0±3.5
I 10 <sup>-14</sup> + M	122	97(79.5) <sup>ab</sup>	30(24.6)	26.2±0.8

\* Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

% 및 melatonin 단독 처리구(81.6%)보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다. 배반포기로의 발달율에 있어서도 10<sup>-12</sup> M이 45.6%로서 대조구(26.2%) 및 melatonin 단독 처리구(31.2%)보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다. Isoproterenol 처리구간에 있어서 10<sup>-14</sup> M(40.7%)과는 차이가 없었으나, 10<sup>-10</sup> M(24.8%)이 가장 낮았다( $P < 0.05$ ). 뿐만 아니라, 핵 수에 있어서는 isoproterenol 10<sup>-14</sup> M 첨가구가 37.8±6.7개로서 대조구(26.8±2.8개), melatonin 단독 처리구(25.8±1.7개)보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다.

## 고 찰

본 연구에서는 복제 수정란을 비롯한 각종 세포의 체외 발달율을 개선하기 위한 기초 연구로서 melatonin 합성과정에서 활성화 역할을 하는 isoproterenol을 melatonin과 함께 돼지 난포란의 체외 성숙 및 체외 배양용 배양액에 첨가하여 isoproterenol과 melatonin이 돼지 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하였다.

정 등(2015b)은 돼지 난포란의 체외 성숙시 isoproterenol만 단독으로 10<sup>-12</sup> 및 10<sup>-14</sup> M을 첨가하였을 때 65.8% 및 68.2%로써 처리구간 차이가 없었으며, 대조구의 66.2%와도 차이가 없었다고 하였다. 이는 체외 성숙에 있어서 isoproterenol만으로는 향상화 효과가 없는 것으로 판단된다. Takada 등(2010)은 melatonin을 소 난포란의 체외 성숙시 10<sup>-9</sup> M의 농도로 첨가하면 핵 성숙율이 90.5%로서 성선자극호르몬(FSH 및 LH)만 첨가한 처리구의 88.9%와 유사한 수준으로 성선자극호르몬의 대체 효과가 있는 것으로 나타났다고 하였지만, FSH 및 LH와 melatonin을 병용하여 첨가하였을 때 89.0%로서 melatonin을 병용 첨가하여도 핵 성숙율에는 더 이상의 개선 효과

Table 4. Effect of isoproterenol and melatonin supplementation to IVM+IVC medium on the development of porcine parthenogenetic oocytes

Treatment (M)	No. of cultured oocytes	No. of cleaved oocytes (%)	No. of development to blastocyst (%)	Cell number of blastocysts (mean±S.D.)
Control	145	120(82.8) <sup>b</sup>	38(26.2) <sup>c</sup>	26.8±2.8 <sup>b</sup>
M	141	115(81.6) <sup>b</sup>	44(31.2) <sup>bc</sup>	25.8±1.7 <sup>b</sup>
I 10 <sup>-10</sup> + M	109	89(81.7) <sup>b</sup>	27(24.8) <sup>c</sup>	24.0±1.4 <sup>b</sup>
I 10 <sup>-12</sup> + M	147	136(92.5) <sup>a</sup>	67(45.6) <sup>a</sup>	35.5±3.4 <sup>a</sup>
I 10 <sup>-14</sup> + M	150	131(87.3) <sup>ab</sup>	61(40.7) <sup>ab</sup>	37.8±6.7 <sup>a</sup>

\* Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

가 없었다고 하였다. Nakano 등(2012)의 결과에서도 돼지 난포란의 체외 성숙시 melatonin을 체외 성숙용 배양액에 각각의 농도(10<sup>-4</sup> ~ 10<sup>-13</sup> M)로 첨가하였을 때 체외 성숙율(56 ~ 60%)에 대한 개선 효과는 없었다고 하였다. Manju-natha 등(2009)은 버팔로 난포란의 체외 성숙시 melatonin 50 μM의 농도로 첨가했을 때 88.8%로서 대조구(75.0%)보다 높은 체외 성숙율을 보였다고 하였다. Farahavar 등(2010)은 소 난포란의 체외 성숙시 고 농도의 산소(20%) 환경에서 melatonin(0.01 ~ 100 μM)을 첨가하였을 때 난구세포 확장율은 처리구(83.11 ~ 82.72%)와 대조구(82.94%)간에 차이가 없었으며, 체외 성숙율에 있어서도 첨가구(73.11 ~ 65.24%)와 대조구(72.24%)간에 차이가 없었다고 하였다. 100 μM을 첨가하였을 때 오히려 낮은 성숙율 65.24%를 나타냈다고 하였다. 이는 동물종 및 실험 환경 등에 따라 성숙율의 개선 효과가 다르게 나타나는 것으로 생각된다. 정 등(2015a)은 돼지 난포란을 1 및 3등급으로 구분하여 체외 성숙시 isoproterenol(10<sup>-12</sup> M)과 melatonin (10<sup>-7</sup> M)을 첨가하였을 때 3등급 난포란은 약 8% 정도의 성숙율 개선 효과가 있었으나, 1등급의 경우 약 1% 정도의 개선 효과가 있는 것으로 나타났다고 하였다. 이러한 결과는 품질이 양호한 난포란보다는 품질이 떨어지는 난포란에 isoproterenol과 melatonin을 병용 첨가하면 난포란의 품질개선 효과가 높을 것으로 생각된다. 따라서 적정 첨가 농도, 난포란의 품질 등을 좀 더 세분해서 연구를 실시하면 멸종위기종과 같은 난포란의 다량 채집이 어려운 동물의 경우, 난자의 효율성 제고에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

Nakano 등(2012)은 돼지 난포란의 체외 성숙시 본 연구와 유사한 농도인 melatonin 10<sup>-7</sup> M에서 4-세포기로의 분할율(44%) 및 배반포기 발달율(17%)이 대조구(35% 및 17%)와 차

이가 없었다고 하였고, Shi 등(2009)은 melatonin  $10^{-9}$  M의 농도를 돼지 난포란의 체외 성숙용 배양액에 첨가하였을 때 대조구의 분할율(57%) 및 배반포기 발달율(18%)에 비해 70% 및 28%로 체외 발달율이 크게 개선되었다고 하였다. 이는 실험 방법상의 차이로 배양 환경의 따라 melatonin에 의한 난포란의 잠재적인 발달 효율이 어느 정도 다르게 나타날 수 있다고 생각된다. 정 등(2015b)은 돼지 난포란의 체외 성숙시 isoproterenol을  $10^{-14}$  M을 첨가하였을 때 분할율이 92.4%로서 대조구의 84.2%보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다. 그러나  $10^{-12}$  M 처리구(90.1%)와는 차이가 없었다고 하였다. 배반포기 발달율은 대조구 및 처리구간에 차이가 없었다고 하였다. 이러한 결과는 isoproterenol 단독으로는 항산화 효과가 melatonin 단독 처리했을 때와 같이 적은 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서와 같이 melatonin에 isoproterenol을 첨가하면 체외 발달이 다소 개선되는 것으로 보아서 isoproterenol이 melatonin의 활성화 효과가 있는 것으로 추측해 볼 수 있다. 그러나 이에 대한 연구는 앞으로 추가 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

정 등(2015b)은 단위발생란의 체외 배양에 있어서 isoproterenol만 단독으로  $10^{-12}$  M을 첨가하였을 때 42.6%가 배반포기로 발달하여 대조구의 31.0%보다 유의적으로 높았다고 하였으며, 그러나 분할율과 배반포기의 핵 수에는 차이가 없었다고 하였다. 이러한 결과는 앞서서도 지적한 바와 같이, isoproterenol 단독 첨가와 melatonin과의 병용 첨가시 체외 발달율의 차이는 여기에서는 단정할 수 없지만, 앞으로 isoproterenol 단독 첨가의 적정농도 및 항산화력 조사 등과 같은 추가 연구를 진행하여 규명할 예정이다. Čikoš 등(2005)은 과배란 처리에 의해 생산된 수정란의 체외 배양액에 isoproterenol을 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M의 농도로 첨가하여 사용하였을 때, 마우스 착상전 수정란의 세포수는 대조군에 비하여 상당히 감소되었으며, 세포 증식을 억제하였다고 하였다. 이는 본 연구에서 사용된 isoproterenol의 농도보다 높은 농도의 isoproterenol을 사용하였으며, 고농도의 isoproterenol이 수정란의 발달에 해로운 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. Shi 등(2009)의 연구에 따르면 돼지 단위발생란의 배양용 배양액에 melatonin  $10^{-7}$  M(29%)에서 가장 높은 배반포기 발달율을 나타내었으며, 이는 성숙시 10% 돼지 난포액을 첨가함으로써 돼지 난포액에 함유되어 있는 melatonin이 성숙시에 유의한 효과가 함께 작용된 것으로 생각되어 실험방법상에서 차이가 있는 것으로 생각된다. Pang 등(2013)은 돼지 복제 수정란의 배양기간 동안 melatonin  $10^{-9}$  M을 첨가하였을 때 분할율은 차이가 없었으나, 배반포기 발달율은 18.6%로서 대조구(11.6%)보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다고 하였다. Nakano 등(2012)은 돼지 단위발생란 및 SCNT 수정란 배양용 배양액에 melatonin을

$10^{-7}$  M로 첨가하였을 때 초기 수정란 발달 단계에서 ROS 수준을 크게 감소시켰으나, 분할율 및 배반포기 발달율에서는 차이가 없었다고 하였다. 이상에서 보는 바와 같이, 연구자에 따라서 발달율에 차이가 있으며, 본 연구의 결과에서도 체외 배양용 배양액에 melatonin과 isoproterenol을 첨가하였을 때 분할율에는 개선된 효과가 있었지만, 배반포기 발달율에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

정 등(2015b)이 이전에 수행한 연구에서도 체외 성숙 및 체외 배양시 isoproterenol만 단독으로 첨가하였을 때 배반포기 발달율은  $10^{-14}$  M의 45.6%로서 대조구의 29.6%보다 유의적( $P < 0.05$ )으로 높은 발달율을 보였다고 하였다. 이러한 결과는 isoproterenol 단독 첨가와 melatonin과 병용 첨가 방법이 다르기 때문에 직접적으로 비교할 수는 없지만, 병용 첨가에 의한 농도 차이와 melatonin의 작용에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서 isoproterenol도 항산화 효과가 어느 정도 있는 것으로 추측되지만, 앞으로 세밀한 추가 연구가 요구된다. Shi 등(2009)의 보고에서도 melatonin  $10^{-9}$  M을 배양 전체기간(IVM + IVC) 동안 첨가하면 체외 성숙 또는 체외 배양시에만 melatonin을 첨가했을 때보다 더 높은 개선 효과를 나타내었는데, 이는 melatonin이 체외 성숙기간 동안 난포란의 질을 크게 개선시켜 주었고, 배양 기간 동안 단위발생란의 발달을 개선시켜 줌으로써 melatonin의 유의한 효과가 연속적으로 나타낸 결과라고 하였다.

본 연구에서는 체외 수정란을 사용하였을 경우, 정자 침입에 의한 외부 유전자 도입 및 정자 두부의 투명대 부착에 의해 다른 결과를 나타낼 수도 있다고 생각되어, 비교적 동일한 실험조건으로 실시하고자 단위발생란을 사용하였으며, 체외 배양용 배양액에 melatonin만 단독 첨가하였을 때보다 melatonin을 활성화 시키는 isoproterenol을 함께 첨가하였을 때 더 높은 발달율을 나타내었으므로 melatonin과 isoproterenol을 병용 첨가하는 것이 돼지 단위발생란의 체외 발달 효율 향상에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구는 복제 수정란을 비롯한 각종 세포의 체외 발달율을 개선하고자 melatonin과 isoproterenol의 합성과정에서 활성화 역할을 하는 isoproterenol을 돼지 난포란의 체외 성숙 및 체외 배양용 배양액에 첨가하여 melatonin과 isoproterenol이 돼지 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 돼지 단위발생란의 체외 배양에 있어서 isoproterenol과 melatonin을 병용 첨가하였을 때 melatonin 단독 첨가하였을 때보다 발달율이 더 높게 나타난 것으로 보아, isoproterenol이 melatonin의 활성화 효과가 있는 것으로 판단된다. 또한 첨가농도는 melato-

nin  $10^{-7}$  M과 isoproterenol  $10^{-12}$  M이 적합하며, 첨가방법은 체외 성숙부터 체외 배양까지 전체기간동안 함께 첨가하는 것이 바람직한 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 적정 첨가 농도, 첨가 방법 및 난포란의 품질 등의 추가 연구를 통해서 효율개선 효과가 좀 더 향상되면 체외 수정란 및 복제 수정란의 생산효율 향상과 멸종위기종과 같은 동물의 난포란의 다량 채집이 어려운 동물의 경우에 난자의 효율성 제고에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Čikoš Š, Veselá J, Il'ková G, Reháč P, Czikková S and Koppel J. 2005. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 71:145-153.
- Farahavar A, Shahne AZ, Kohram H and Vahedi V. 2010. Effect of melatonin on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *African J. Biotechnology* 9:2579-2583.
- García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, García-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramírez JM and Bernal-Pérez M. 2014. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: A review. *Rev. J. Pineal Research* 56:225-237.
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gonik B and Abu-Soud HM. 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 44:1295-1304.
- Gupta BB, Spessert R and Vollrath L. 2005. Molecular components and mechanism of adrenergic signal transduction in mammalian pineal gland: regulation of melatonin synthesis. *Rev. Indian J. Experimental Biology* 43:115-149.
- Kennaway DJ and Rowe SA. 2000. Effect of stimulation of endogenous melatonin secretion during constant light exposure on 6 sulphatoxymelatonin rhythmicity in rats. *J. Pineal Research* 28:16-25.
- Lord T and Aitken RJ. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Rev. Reproduction* 146:217-227.
- Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP, Ravindra JP and Nandi S. 2009. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 44:12-16.
- Nakano M, Kato Y and Tsunoda Y. 2012. Effect of melatonin treatment on the developmental potential of parthenogenetic and somatic cell nuclear-transferred porcine oocytes *in vitro*. *Zygote* 20:199-207.
- Pang YW, An L, Wang P, Yu Y, Yin QD, Wang XH, Xin-Zhang, Yang ML, Min-Guo, Wu Z H and Tian JH. 2013. Treatment of porcine donor cells and reconstructed embryos with the antioxidant melatonin enhances cloning efficiency. *J. Pineal Research* 54:389-397.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC and Sainz RM. 2009. Melatonin and reproduction revisited. *Rev. Biology of Reproduction* 81:445-456.
- Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, Wang L, Gao C, Zhu SE, Zeng SM, Tian JH and Liu GS. 2009. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *J. Pineal Research* 47:318-323.
- Takada L, Martins-Junior A, Mingoti GZ, Balieiro JCC and Coelho LA. 2010. Melatonin in maturation media fails to improve oocyte maturation, embryo development rates and DNA damage of bovine embryos. *Scientia Agricola* 67: 393-398.
- Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Aasada H, Yamagata Y and Suginio N. 2012. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *Rev. J. Ovarian Research* 5:5.
- Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF and Rezzani R. 2008. Cardiovascular diseases: Protective effects of melatonin. *Rev. J. Pineal Research* 44:16-25.
- 정다운, 윤윤진, 안한솔, 박희성. 2014. Melatonin의 첨가가 돼지 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향. 제 14회 발생공학 국제심포지엄. Abst. pp111.
- 정다운, 윤윤진, 안한솔, 박희성. 2015a. 난포란의 등급에 따른 Melatonin의 첨가가 돼지 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향. 제 15회 발생공학 국제심포지엄. Abst. pp52.
- 정다운, 윤윤진, 안한솔, 박희성. 2015b. Isoproterenol의 첨가가 돼지 단위발생란의 체외 발달에 미치는 영향. *Reproductive and Developmental Biology*. Abst. 39:115.

---

Received February 15, 2016, Revised February 23, 2016, Accepted March 1, 2016