



돼지 난자의 체외성숙과 배아발달 동안 ROS와 항산화제의 영향

이원희¹ · 박지은¹ · 황보용¹ · 김화영¹ · 이지은¹ · 강병범¹ · 정희태² · 양부근¹ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학

Effects of Reactive Oxygen Species and Antioxidants during *In Vitro* Maturation Oocytes and Embryo Development in Pigs

Won-Hee Lee¹, Ji-Eun Park¹, Yong Hwangbo¹, Hwa-Young Kim¹, Ji-Eun Lee¹,
Byeong-Buhm Kang¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,*}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

ABSTRACT

The oocyte undergoes various events during *in vitro* maturation (IVM) and subsequent development. One of the events is production of reactive oxygen species (ROS) that is a normal process of cell metabolism. But imbalances between ROS production and antioxidant systems induce oxidative stress that negatively affect to mammalian reproductive process. *In vitro* environments, *in vitro* matured oocytes have many problems, such as excessive production of ROS and imperfect cytoplasmic maturation. Therefore, *in vitro* matured oocytes still have lower maturation rates and developmental competence than *in vivo* matured oocytes. In order to improve the IVM and *in vitro* culture (IVC) system, antioxidants, vitamins were added to the IVM, IVC medium. Antioxidant supplementation was effective in controlling the production of ROS and it continues to be explored as a potential strategy to overcome mammalian reproductive disorders. Based on these studies, we expect that the use of antioxidants in porcine oocytes could improve maturation and development rates.

(Key words : Reactive oxygen species, Antioxidant, *In vitro* maturation, Embryo development)

서 론

가축산업에 있어 배아의 체외 생산 기술은 중요한 기술 중 하나로 여겨지고 있으며, 특히 유전물질의 분배와 종의 보존, 가축의 대량생산, biomedical animal 등 다양한 분야에 이용되고 있다(Appeltant 등, 2015). 특히 돼지는 인간과 장기의 성질과 크기가 비슷하기 때문에(Kwak 등, 2012), 이종 장기 이식 동물 또는 인간의 질병 모델 개발을 위한 형질전환동물 분야에서 많이 연구되고 있다(Jeon 등, 2014). 다양한 분야에서 사용되는 배아를 성공적으로 체외 생산하기 위해 체외성숙, 수정 및 배양 과정을 거치게 되지만, 체내보다 높은 산소의 농도, 빛의 노출, 시약 또는 배양액의 오염, 연구자의 미숙한 기량 등

체외 환경에 의해 세포내에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 인해 손상 받게 된다. Hydrogen peroxide(H₂O₂), superoxide(O₂⁻), hydroxyl radical(·OH) 등을 포함하고 있는 ROS는 세포 내 산화스트레스를 유발한다고 알려져 있으며, 난자의 성숙과 발달을 저해한다(Kitagawa 등, 2004). 체외환경에서 생산된 세포 내 ROS로 인하여 체외 생산된 배아는 체내 유래 수정란보다 그 품질이 저하된다고 알려져 있으며, 난자의 체외 성숙과 배아발달 동안 산화스트레스를 감소시키기 위해 세포내에서 배양액에 항산화제(Spinaci 등, 2008) 및 비타민(Tareq 등, 2012) 등을 첨가한 연구가 많이 진행되고 있다. 따라서 본 논문은 배아의 체외 생산에 미치는 ROS와 항산화제의 영향에 대해 초점을 맞추어 작성되었다.

* This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (Ministry of Education)(2016R1D1A1B03931746).

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8627, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

ROS

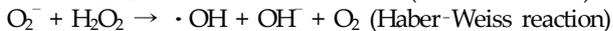
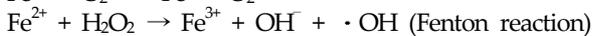
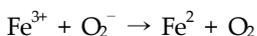
ROS는 세포에 손상을 입히는 모든 종류의 변형된 산소를 뜻하며, O_2^- , $\cdot OH$, RO_2 , HO_2 , H_2O_2 등이 ROS에 포함된다(Bayr, 2005). 체내에서 ROS는 세포의 대사작용이 일어나는 동안 생산되는데, 이때 생산된 ROS는 미토콘드리아의 전자전달, 효소적 반응, 핵 내 전사 인자의 활성화, 신호적 전달, 호중구와 대식세포의 항균작용에 관여를 한다(Bayr, 2005). 하지만 많은 양의 ROS는 세포의 apoptosis, 세포 손상, 지질 과산화, 효소의 불활성화 등 세포에 부정적 영향을 미치며(Tatetomo 등, 2000), 정자의 운동성 감소, 수정억제 및 배아 발달의 저하 등 체외배양 효율을 감소시킨다(Awda 등, 2009).

Superoxide(O_2^-)

활성 산소의 1종으로 O_2^- 는 전자 하나가 O_2 분자로 이동함에 따라 발생이 되며, 전자 전달계로부터 전자가 새어나와 superoxide radical이 형성이 된다. 일반적으로 생체 내에서의 여러 가지 산화환원효소에 의한 반응결과로 생산되며, 반응성이 아주 높고, 많은 화합물을 산화시킨다. O_2^- 은 매우 반응성이 높은 홀수 전자 상태이며, 이 반응에 의해 세포 내외로 ROS의 형성과 확산이 시작되고, 또한 대부분의 O_2^- 는 ROS의 시작점 및 산화연쇄반응의 매개체로 작용한다. 백혈구가 세균과 접하였을 때 O_2^- 은 살균작용에 중요한 역할을 하는데, 과잉으로 존재하면 세포 자체에 장애작용을 일으키게 된다. 또한 O_2^- 의 불균등화는 H_2O_2 를 생산하게 되며(McCord 등, 1969), 호기성 생물에서는 superoxide dismutase(SOD)라는 효소에 의해 O_2 와 H_2O_2 로 분해된다.

Hydrogen Peroxide(H_2O_2)

O_2^- 와 달리 H_2O_2 는 안정되어 있고, 세포막 사이를 이동할 수 있으며, 생체 내에서는 O_2^- 의 불균등화 반응 및 다양한 산화효소에 의해 생성된다. 하지만 아주 적은 농도의 철(Iron)이 존재할 때는 Haber-Weiss 반응에 의해 O_2^- 와 H_2O_2 로부터 산화적 손상을 일으키는 hydroxyl radical ($\cdot OH$)을 생성하게 된다(Halliwell 등, 1988; Kehrer 등, 2000). 이 ROS는 거의 모든 세포와 반응하며, 독성 영향은 매우 짧은 반감기를 가지고 있다. 일부 산화효소들은 즉시 hydroxyl peroxide radical을 형성할 수 있으며, catalase와 peroxidase 등에 의해 O_2 와 H_2O 로 분해된다.



Hydroxyl Radical ($\cdot OH$) (Haber - Weiss)

Hydroxyl radical은 superoxide(O_2^-) 음이온과 H_2O_2 반응에 의해 $\cdot OH$ 이 생성되는데, 반응성이 높고 매우 독성이 강한 하이드록실 라디칼을 형성한다. $\cdot OH$ 은 핵내 퓨린과 피리미딘을 변형시켜 결국 DNA에 손상을 주게 된다(Agarwal 등, 2004). 또한 $\cdot OH$ 은 탄수화물, 핵산, 지질 그리고 아미노산을 포함한 고분자에 손상을 줄 수 있

는데, 매우 짧은 반감기와 강한 독성으로 인해 생체 내에서 매우 위험하다.

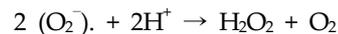
항산화 물질

항산화 작용이란 인체에서 산화스트레스 등으로 인해 생긴 free radical의 형성을 억제하고, free radical로 인한 손상을 제거하는 작용이다. 항산화제는 산화를 방지하는 물질의 총칭으로 free radical 제거, 활성산소를 발생시키는 원인을 억제, 세포의 손상 방지, apoptosis 등으로부터 세포를 보호하며, 종류로는 비타민(Tareq 등, 2012), Resveratrol(Lee 등, 2015), Epigallocatechin gallate(EGCG)(Lee 등, 2004), anthocyanin(Moyer 등, 2002) 등과 같은 천연물질(Lee 등, 2015), 효소 등이 존재한다. 항산화 효소는 효소계 항산화제와 비효소계 항산화제로 나눌 수 있다.

효소계 항산화제는 금속 중심을 가지고 있는데, 이것은 해독과정을 위해 분자의 균형을 맞추는 전자를 전달하는 능력을 가지고 있다. 또한 과도한 ROS를 중화시키고, 세포에 대한 손상을 예방하는 기능을 가지고 있으며, 항산화 효소는 SOD, GPx, CAT 등이 있다(Agarwal 등, 2012).

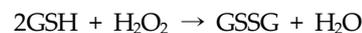
Superoxide Dismutase(SOD)

SOD는 O_2^- 를 안정화된 H_2O_2 와 O_2 로 변환시키며, 세포 내와 세포외의 과산화 라디칼을 제거하고, 원형질막의 지질과산화막을 막아주는 역할을 한다. SOD는 세 가지 iso-enzyme이 존재하는데, SOD1(CuZnSOD)은 Cu와 Zinc를 함유하고 있으며, 금속보조인자로서 세포질에 위치한다. SOD2(MnSOD)는 mitochondrial isoform으로 manganese(Mn)을 함유하고 있다. SOD3(ECSOD)는 세포 외 형태로 encode되어 있으며, 구조적으로 Cu, Zn-SOD와 유사하다(Fujii 등, 2005). 이들 중에서 Cu/Zn-SOD와 Mn-SOD가 주된 형태이다.



Glutathione Peroxidase (GPx)

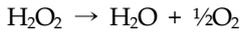
GPx는 Glutathione(GSH)로부터 유도된 형태로서 과산화물을 해독하는 역할을 하며, 5가지 isoform 형태로 존재한다(Fujii 등, 2005). GPx1은 세포질의 isoform으로써 조직 내에 넓게 분포되어 있다. 반면에, GPx2는 위와 장의 형태를 encode하지만 특이한 기능을 갖고 있지 않다. GPx3는 원형질과 정소상체 유체에 존재한다. GPx4는 특히 생물막내의 과산화된 인지질을 해독하는 작용을 하며, GPx5는 정소상체에서 발견되었다(Perkins, 2006).



Catalase(Cat)

CAT는 잘 알려진 항산화 효소로서 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 변환시키며(Alvarez 등, 2015), 산소에 노출된 거의 모든 생물체에서 발견되는 일반적인 효소이다. ROS에 의한

산화스트레스로부터 세포를 보호하는데 매우 중요한 효소이며, 효소 회전수가 매우 높아, 하나의 CAT 분자는 초당 100만 H₂O₂를 분해할 수 있다(Goodsell, 2004). 또한 과산화수소에 대한 보호에 연루되어 있지만, 그 위치는 peroxisome으로 제한이 된다. CAT은 간과 같은 기관에서 역할을 하지만, 남성 생식 기관에서의 특정 역할은 잘 알려져 있지 않다(Fujii 등, 2003).



비효소계 항산화제는 합성 항산화제 또는 식이보조제로서 알려져 있다. 이것은 즉각적으로 ROS를 제거하고, ROS에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 작용을 한다. (Sies 등, 1995). 비효소계 항산화제는 vitamins, glutathione(GSH), cysteine, cysteamine, taurine, hypotaurine 등이 존재한다 (Sharma 등, 2004).

Vitamins

1) Vitamin C (Ascorbic Acid)

Vitamin C는 과산화과정을 중단시키는 chain-breaking 항산화제로서 세포 내와 세포 외에서 찾아볼 수 있으며, 산화 환원 촉매제로서 ROS를 줄이고 중화할 수 있다. 또한 산화과정이 확산되는 것을 막아주고, 산화된 vitamine E와 GSH의 재사용을 돕는다(Chan, 1993). Vitamin C의 감소된 형태는 GSH와의 반응을 통해 유지되며, 단백질 이황화 이성질화 효소와 glutaredoxins에 의해 촉매작용을 할 수 있다. 또한 과산화 라디칼로부터 유도된 지질이 과산화 되는 것을 막아주며, H₂O₂로 인한 DNA 손상을 막아주는 역할을 한다.

2) Vitamin E (α-Tocopherol)

Vitamin E는 주요 chain-breaking 항산화제이며 지용성 비타민이다. 이것은 8가지 tocopherols과 tocotrienols로 구성되어 있으며, 지질과산화 과정을 방해하여 지질과산화동안 형성되는 과산화 라디칼에 항산화 작용을 하는 역할을 한다(Behrman 등, 2001). 또한 조직에서 free radical이 생성되는 것과 산화과정이 유지되는 것을 막는다. Vitamin E는 세포막에도 존재하는데, 산화적 손상으로부터 세포막을 보호하며, 방사선 치료 중에 세포와 조직의 손상을 예방하고 치료하는데 사용이 되고 있다.

GSH (Glutathione)

GSH는 sulphydryl계열의 비효소적 항산화제로 cysteine을 저장하는 역할을 하고(De Matos 등, 2000), 특히 세포 내에서 산화 환원 상태를 유지하고 있으며, 아미노산 수송, DNA와 단백질의 합성에도 관여한다고 보고되었다. 또한 대부분의 포유동물의 세포에 존재하며, O₂⁻형성으로부터 산소독성을 막아주는 역할을 한다. GSH는 세포에서 free radical, 과산화물, 지질 과산화물 및 중금속과 같은 반응성 산소 종에 의해 야기되는 손상을 예방할 수 있으며, 세포 내의 산화된 GSH와 GSH의 비율은 종종 세포 산화 스트레스의 척도로 사용된다.

Cysteine and Cysteamine (CSH)

Cysteine과 cysteamine(CSH)은 GSH 함량을 증가시키며, 방사선으로부터 보호하는 작용으로 잘 알려진 Cysteamine은 scavenger로서 높은 GSH 수준을 유지하기 위해 필수적인 항산화제이다. 또한 ·OH를 제거하며, H₂O₂와도 반응한다. Cysteine은 세포막을 쉽게 통과할 수 있으며, 막의 지질과 단백질을 보호하는 작용을 한다. 또한 CSH는 hypotaurine과 같은 다른 항산화제로 변환될 수 있다(Guerin 등, 2001; Orsi 등, 2005).

Taurine

Taurine은 포유동물의 조직에 높은 농도로 분포하며, 특히 신경조직과 망막 및 호중구에 존재한다. Taurine을 포함한 많은 아미노산들의 농도는 folliculogenesis 동안 많은 변동을 거듭하게 되는데, taurine과 hypotaurine은 scavengers로서 생식세포에서 산화 환원 항상성을 유지하는데 도움을 주며, 지질 과산화 물질을 중화하는 작용을 한다. 또한 catalase 수준을 증가시킴으로써 항산화 역할을 한다. Hypotaurine은 O₂⁻ 또는 H₂O₂와 반응을 하지 않지만 ·OH를 중화하는 작용을 한다(Orsi 등, 2005).

난자의 체외성숙과 배아발달동안 ROS의 영향

난자에서 가장 많이 생산되는 ROS의 종류로는 O₂⁻, H₂O₂, ·OH(Manes 등, 1995)이며, 난자 내에 ROS는 체내보다 체외환경에서 더 많이 생산이 된다(Hu 등, 2012). 그 이유는 체외성숙 과정에서는 체내의 산소농도보다 더 높은 농도에 난자가 노출이 되기 때문에, 산소에 의한 산화 스트레스로 인해 ROS가 많이 생산된다. 포유동물의 암컷 번식기관의 내강 산소농도는 체외 산소농도(20%)보다 1/3인 3~9%이며, 햄스터, 토끼, 돼지의 생식기관의 산소농도는 대기에 존재하는 산소농도의 절반 미만이라고 보고되었다(Combelles 등, 2009). 또한 ROS를 일으키는 산소 농도보다 5~7%의 낮은 산소 농도에서 배아 발달 시 더 긍정적인 결과를 쥐(Auerbach 등, 1968), 햄스터(Bavister, 1988), 돼지(Wright, 1977), 양(Thompson 등, 1990), 염소(Batt 등, 1991), 소(Thompson 등, 1990), 인간 등에서 나타내었다(Noda 등, 1994). ROS에 의해 지질 과산화가 되면 세포 분할율과 대사활동 그리고 미토콘드리아 기능에 영향을 미치는데, 쥐에서 지질의 과산화가 증가함에 따라 2세포기에서 분할이 중단이 되었으며(Nasr-Esfahani 등, 1990), 쥐의 배아 발달 과정에도 부정적인 영향을 미쳤다(Blondin 등, 1997). 또한 쥐에서 체외성숙 동안 ROS 처리에 의해 배반포의 총 세포 수가 감소하였고(Banwell 등, 2007), 햄스터에서 배아발달 동안 ROS에 의해 DNA 손상율이 증가하였다(Takahashi, 2012). 배반포에서 세포질의 손상은 세포사멸로 이어지는데, H₂O₂의 농도가 증가함에 따라 인간의 배아가 손상되었다(Yang 등, 1998). ROS에 의해 DNA 또한 손상이 가는데, 체외

배아발달 동안 DNA의 손상은 배아발달을 중단시켰다(Munnè 등, 1991). 소에서 ROS는 난자의 감수분열을 중단시켰으며, 배아발달과 염색체 손상, 세포사멸에도 영향을 미쳤다(Tarin 등, 1996). 또한 체외 환경에서 ROS는 발달 중인 배아의 유전자 발현에 많은 영향을 미쳤다고 쥐(Rinaudo 등, 2006), 토끼(Koerber 등, 1998), 소(Balasubramanian 등, 2007)에서 보고되었다. 돼지에서는 산화스트레스로 인해 IVM 동안 metaphase II 단계로 도달하는 난자의 비율이 감소하였고, 세포질 성숙과 발달능력에 영향을 주었다. 또한 apoptosis로 세포가 죽거나 DNA에 손상을 입었다고 보고되었다(Tatemoto 등, 2000, 2004). IVC 동안 높은 산소 농도는 세포내에 ROS를 축적시켰고, DNA에 손상을 주어 배아 발달에 영향을 미쳤다(Kitagawa 등, 2004). 또한 초기 배아 발달동안 높은 ROS 수준은 세포막의 지질과산화물을 유발했고(Nasr-Esfahani 등, 1990), DNA 손상, 단백질 합성과 RNA 전사에 장애를 일으켰다(Tatemoto 등, 2000) 이러한 원인은 완벽하게 성숙되지 않은 세포질의 항산화 효소(SOD, GPx, CAT) 때문이라고 돼지에서 보고되었다.

난자의 체외성숙과 배아발달에 미치는 항산화제의 효과

IVC 배양액에 SOD의 첨가는 체내와 체외에서 수정된 배아발달과정에서 생기는 산화스트레스로부터 보호작용을 한다고 쥐에서 보고되었으며(Nonogaki 등, 1992), 토끼에서 protein-free culture 배양액에 SOD의 첨가는 배반포단계로 발달하는 배아의 비율이 증가되었다(Lim 등, 1996). 또한 쥐와 소에서 SOD와 catalase 첨가 시 GSH 합성을 향상조절시킴으로써 배아발달을 향상시켰다(Goto 등, 1992; LIU 등, 1995). 쥐, 소, 돼지에서 SOD, catalase 및 thioredoxin의 첨가는 ROS를 제거함으로써 배아발달을 향상시켰고, 배아에 미치는 산화스트레스의 영향을 감소시켰다(Takahashi, 2012). 또한 난자의 체외성숙 동안 ROS 생성 시 GPx와 CAT와 같은 항산화 물질을 생성하는데, 이 효소들은 성숙 동안 ROS를 제어할 수 있는 능력을 갖고 있다고 보고되었다(Cetica 등, 2001).

적정 수준의 ROS의 유지와 산화스트레스로부터 세포를 보호한다고 알려진 Vitamin C를 IVM 배양액에 첨가하였을 때, ROS 수준을 감소시키면서 난자 내 GSH 수준을 증가시켰다. 또한 세포질 성숙율, 배반포 형성율, 총 세포수, 배아 발달율 등을 증가시켰다. IVC 배양액에 Vitamin C를 첨가하였을 때는 ROS 수준을 감소시키면서 배아 발달율을 향상시켰다. 또한 배아의 성숙율과 배반포 형성율 그리고 배반포의 총 세포수를 증가시킴으로 인해 배아의 질을 향상시켰다고 돼지에서 보고되었다(Hu 등, 2012). Vitamin E는 ROS로 유발된 세포막의 손상을 감소시켜주며, 체외에서 배아의 발달을 향상시킨다고 소에서 보고되었으며(Olson 등, 2000), 쥐에서 산화스트레스로부터의 손상을 감소시켰다. 하지만 돼지에서 IVM 동안 Vitamin E 처리시 성숙율, 수정율, 배반포 형성율, 총 세포

수에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Tareq 등, 2012).

Taurine, hypotaurine 및 transferrin은 주로 나팔관과 난포액에서 발견되며, ROS로부터 배아를 보호하는 작용을 한다(Guerin 등, 2001). 또한 taurine, hypotaurine은 체외 배아발달을 자극한다고 돼지에서 보고되었다(Nagashima 등, 1993). 소에서 cysteamine을 IVM 배양액에 첨가하였을 때 난자 내 GSH량이 증가하였고, 배반포 형성이 향상되었다(De Matos 등, 1996). 마찬가지로 돼지에서도 GSH 함량이 증가하였고, 수정 후 전핵 형성율이 증가하였으며, 배반포 형성율이 증가하였다(Yamauchi 등, 1999). Cysteine은 산화스트레스로부터 세포를 보호하는데, 돼지에서 IVC 배양액에 첨가하였을 때 난자 내 GSH 함량이 증가하였고, 세포질 성숙율이 향상되었으며 (Sawai 등, 1997), 수정 후 전핵 형성율이 향상되었다(Yoshida 등, 1993). 마찬가지로 돼지에서 IVM 배양액에 cysteine의 첨가는 난자내 GSH 수준을 증가시켰고, 난자의 성숙율과 배반포 형성율을 증가시켰다(Abeydeera 등, 1998).

햄스터, 돼지, 소 그리고 쥐의 난자에서 GSH는 난자가 성숙하는 동안 합성이 되며(De Matos 등, 2000), 배란에 가까워질수록 GSH의 수준이 증가하였다(Perreault, 1999). 또한 체외성숙 동안 GSH의 증가는 난자의 품질을 증가시키고, 배아와 배반포의 발달을 촉진시켰다(Anchordoguy 등, 2014). 배양액내 항산화제의 첨가는 GSH의 농도를 증진시켜 수정란의 생존율과 발달율을 저해하는 heat shock로부터 수정란을 보호하며, oxidative stress에 의해 일어나는 체외발달 억제현상을 극복하여 체외발달을 향상시킨다고 보고되었다(Ealy 등, 1992). 또한 돼지에서 산화스트레스로 인한 독성으로부터 난자를 보호하는 역할을 하며, GSH 수준이 증가함에 따라 수정 후 전핵 형성율이 증가되었다(Meister 등, 1976). 따라서 돼지 난자의 체외성숙, 배양 시 배양액내 항산화물질의 첨가는 미성숙 난자의 성숙율을 향상시켜 효과적인 첨가물질로 이용될 수 있을 것으로 보여진다.

결론

난자 성숙 배양액에 항산화제의 첨가는 배아발달 과정에서 생산된 산화스트레스로부터 보호작용을 하며, 세포내 GSH 수준을 증가시켜 배아 발달율을 향상시킨다. 많은 연구자들에 의하면 체외성숙과정에서 다양한 항산화제를 첨가하며, 햄스터, 돼지, 소 그리고 쥐 등에서 활발히 연구가 진행이 되고 있다. 산화스트레스는 난자의 지질과산화, DNA 손상, 대사활동 감소, 미토콘드리아 기능 저하 등을 비롯해 수정억제 및 배아 발달의 저하 등 체외 배양 효율을 감소시키는데, 특히 돼지에서는 다른 축종과는 달리 배반포율이 낮고, 체외 배양시 체내보다 많은 ROS가 생산되어 세포질이 미성숙하게 된다는 단점을 갖고 있다. 다양한 축종에서 이러한 단점들을 항산화제를 첨가함으로써 향상시킬 수 있음을 많은 연구자들에 의해 보고가 되었다. 이러한 연구를 바탕으로 돼지에서도 항산화제를 이용해 더 나은 성숙율과 발달율을 나타낼 것으로 생각된다. 더 나아가 체외 배아 생산에 있어 항산

화제의 적절한 활용은 유전물질의 분배와 중의 보존, 가족의 대량생산, biomedical animal 등의 발전에 많은 도움이 될 것으로 보여진다.

REFERENCES

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(4):395-401.
2. Agarwal A, Allamaneni SS (2004): Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertil Soc J* 9(3):187-197.
3. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S (2012): The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 10(1):49.
4. Alvarez GM, Morado SA, Soto MP, Dalvit GC, Cetica PD (2015): The control of reactive oxygen species influences porcine oocyte *in vitro* maturation. *Reprod Domest Anim* 50(2):200-205.
5. Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Picco SJ, Sirini MA, Errecalde AL, Furnus CC (2014): Influence of manganese on apoptosis and glutathione content of cumulus cells during *in vitro* maturation in bovine oocytes. *Cell Biol Int* 38(2):246-253.
6. Appeltant R, Somfai T, Kikuchi K, Maes D, Van Soom A (2015): Influence of co-culture with denuded oocytes during *in vitro* maturation on fertilization and developmental competence of cumulus-enclosed porcine oocytes in a defined system. *Anim Sci J*.
7. Auerbach S, Brinster RL (1968): Effect of oxygen concentration on the development of two-cell mouse embryos. *Nature* 217:465-466.
8. Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM (2009): Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod* 81(3):553-561.
9. Balasubramanian S, Son WJ, Kumar BM, Ock SA, Yoo JG, Im GS, Rho GJ (2007): Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 68(2):265-275.
10. Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG (2007): Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod* 22(10):2768-2775.
11. Batt PA, Gardner DK, Cameron AW (1991): Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 3(5):601-607.
12. Bavister BD (1988): Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 29(1):143-154.
13. Bayr H (2005): Reactive oxygen species. *Crit Care Med* 33(12):S498-S501.
14. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S (2001): Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 8(1 suppl): S40-S42.
15. Bertoldo MJ, Nadal-Desbarats L, Gérard N, Dubois A, Holyoake PK, Grupen CG (2013): Differences in the metabolomic signatures of porcine follicular fluid collected from environments associated with good and poor oocyte quality. *Reproduction* 146(3): 221-231.
16. Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA (1997): *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47(5):1061-1075.
17. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT (2001): Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. *IUBMB Life* 51(1):57-64.
18. Chan AC (1993): Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 71(9):725-731.
19. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A (2009): Could oxidative stress influence the *in-vitro* maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online* 18(6): 864-880.
20. De Matos DG, Furnus CC (2000): The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53(3):761-771.
21. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M (1996): Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 45(4):451-457.
22. Ealy AD, Drost M, Barros CM, Hansen PJ (1992): Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell Biol Int Rep* 16(2):125-131.
23. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T (2003): Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl* 5(3):231-242.
24. Fujii J, Iuchi Y, Okada F (2005): Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 3(1):43.
25. Gille JJ, Joenje H (1991): Biological significance of oxygen toxicity: an introduction. *Membrane Lipid Oxidation* 3:1-32.
26. Goodsell DS (2004): Catalase. *Molecule of the Mon-*

- th. RCSB Protein Data Bank. doi 10:2210.
27. Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T (1992): Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. *Free Radic Biol Med* 13(1):47-53.
 28. Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y (2001): Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7(2):175-189.
 29. Halliwell B, Gutteridge JMC (1988): Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol* 7:7-13.
 30. Hu J, Cheng D, Gao X, Bao J, Ma X and Wang H (2012): Vitamin C enhances the *In vitro* development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. *Reprod Domest Anim* 47(6): 873-879.
 31. Jeon Y, Yoon JD, Cai L, Hwang SU, Kim E, Zheng Z, Lee E, Kim DY, Hyun SH (2014): Supplementation of zinc on oocyte *in vitro* maturation improves preimplantation embryonic development in pigs. *Theriogenology* 82(6):866-874.
 32. Kehrer JP (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1):43-50.
 33. 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(7):1186-1197.
 34. Koerber S, Santos AN, Tetens F, Küchenhoff A, Fischer B (1998): Increased expression of NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (ND2) in preimplantation rabbit embryos cultured with 20% oxygen concentration. *Mol Reprod Dev* 49(4):394-399.
 35. Krisher RL, Bavister BD (1998): Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49(1):103-114.
 36. Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH (2012): The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 78(1):86-101.
 37. Lee H, Bae JH, Lee SR (2004): Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 77(6):892-900.
 38. Lee S, Park EJ, Moon JH, Kim SJ, Song K, Lee BC (2015): Sequential treatment with resveratrol-trolox improves development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 84(1):145-154.
 39. Lim JM, Liou SS, Hansel W (1996): Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 46(3):429-439.
 40. Liu Z, Foote RH (1995): Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 53(4):786-790.
 41. Manes C, Lai MC (1995): Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J Reprod Fertil* 104: 69-75.
 42. McCord JM, Fridovich I (1969): Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244(22):6049-6055.
 43. Meister A, Tate SS (1976): Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45(1):559-604.
 44. Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE (2002): Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J Agric Food Chem* 50(3):519-525.
 45. Munné S, Estop A (1991): Superoxide anion increases after sperm storage and produces chromosome abnormalities. *Biol Reprod* 44(Suppl 1):74.
 46. Nagashima H, Nagai T, Yamakawa H (1993): *In vitro* development of *in vivo* and *in vitro* fertilized porcine zygotes. *J Reprod Dev* 39(2):163-168.
 47. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH (1990): Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development* 109(2):501-507.
 48. Nasr-Esfahani MH, Johnson MH (1991): The origin of reactive oxygen species in mouse embryo cultured *in vitro*. *Development* 113:551-560.
 49. Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T (1994): Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil Steril* 62(5):1022-1027.
 50. Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T (1992): Effects of superoxide dismutase on mouse *in vitro* fertilization and embryo culture system. *J Assist Reprod Genet* 9(3):274-280.
 51. Olson SE, Seidel GE (2000): Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 62(2):248-252.
 52. Orsi NM, Gopichandran N, Leese HJ, Picton HM, Harris SE (2005): Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction* 129(2):219-228.
 53. Perkins AV (2006): Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 46(2):77-83.

54. Perreault SD (1999, January): Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization in: Bavister Cummins J, Roldon Ers (eds), Fertilization. Proceeding of International Symposium on Mammals.
55. Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM (2006): Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* 86(4):1265-e1.
56. Sawai K, Funahashi H, Niwa K (1997): Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biol Reprod* 57(1):1-6.
57. Sharma RK, Agarwal A (2004): Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reprod Med Biol* 3(4):177-199.
58. Sies H, Stahl W (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The Am J Clin Nutr* 62(6):1315S-1321S.
59. Spinaci M, Volpe S, De Ambrogi M, Tamanini C, and Galeati G (2008): Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 69(7):877-885.
60. Takahashi M (2012): Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. *J Reprod Dev* 58(1):1-9.
61. Tareq KMA, Akter QS, Khandoker MY, Tsujii H (2012): Selenium and vitamin E improve the *in vitro* maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes. *J Reprod Dev* 58(6):621-628.
62. Tarín JJ, Vendrell FJ, Ten J, Blanes R, Van Blerkom J, Cano A (1996): The oxidizing agent tertiary butyl hydroperoxide induces disturbances in spindle organization, c-meiosis, and aneuploidy in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* 2(12):895-901.
63. Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T (2004): Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod* 71(4):1150.
64. 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(3):805-810.
65. Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR (1990): Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil* 89(2):573-578.
66. Wright RW (1977): Successful culture of swine embryos to the blastocyst stage. *J Anim Sci* 44(5):854-858.
67. Yamauchi N, Nagai T (1999): Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 61(3):828-833.
68. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS (1998): Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 13(4):998-1002.
69. Yoshida M (1993): Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 35(1):76-81.

(Received: February 22 2017/

Revised February 27 2017/

Accepted February 28 2017)