

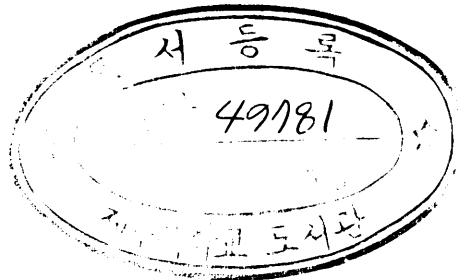
M
528-94
76832

碩士學位論文

돼지 卵母細胞의 体外成熟 및 生存性에
미치는 抗酸化劑의 影響



金 基 興



1998年 12月

돼지 卵母細胞의 体外成熟 및 生存性에
미치는 抗酸化劑의 影響

指導教授 康 珉 秀

金 基 興

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함



金基興의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 大學院

1998年 12月

The effects of antioxidants on the in vitro maturation
and viability of porcine oocyte

Ki-Heung Kim

(Supervised by professor Min-Soo Kang)



JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOTECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1998. 12.

目 次

Summary	1
I. 緒 論	3
II. 研究史	5
1. 난모세포의 핵 성숙능력	
2. 난모세포의 핵 성숙과 성숙 촉진인자	
3. 체외성숙 난모세포의 체외수정	
4. 난모세포의 응성전핵 형성능력	
5. 체외수정에 관여하는 요인 및 다정자 수정	
6. 항산화제	
III. 材料 및 方法	12
1. 실험방법 및 공시재료	
2. 체외성숙	
3. CellTiter AQ System에 의한 생존성 측정	
4. CFDA를 이용한 생존성 측정	
5. 체외수정	
6. 실험구	
7. 통계처리	
IV. 結果 및 考察	22
1. 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(Pb1)형성에 미치는 항산화제의 영향	
2. 항산화제 처리에 의한 난모세포 생존성 분석	
3. mTALP-PVA 배양액을 이용한 체외수정을	
V. 摘 要	39
參 考 文 獻	41

Summary

This study was conducted to investigate the effects of antioxidants (SOD, Catalase and Taurin) on the rates of in vitro maturation, viability and subsequent fertilization of oocytes cultured in mTLP-PVA medium.

The result are as follows:

1. The effect of SOD (Superoxide dismutase) on GVBD of oocytes : the rate of germinal vesicle (GV) was much higher in the medium containing 500 unit (8.7%) than control (2.7%) and 400 unit of SOD (0%) and the addition of 400 unit of SOD increased the oocytes showing GVBD(germinal vesicle breakdown) compared to other treatments.

2. The effect of SOD on the expulsion of first polar body (Pb 1) of oocytes : the addition of 200 unit of SOD significantly($p < 0.05$) increased the oocytes showing MII stage compared to control and 100 or 300 unit of SOD.

3. The effect of catalase on GVBD rate of oocytes : the rate of germinal vesicle (GV) was much higher in the medium containing 250 unit (23.7%) than control (2.7%) and 150 unit of catalase (11.4%). However, the addition of catalase significantly($p < 0.05$) decreased the oocytes showing GVBD stage (MI - MII) compared to the control.

4. The effect of catalase on polar body 1(Pb 1) of oocytes : the addition of 200 unit of catalase significantly($p < 0.05$) decreased the oocytes of MII stage compared to control, showing that catalase may have adverse effect on the maturation of oocytes.

5. The effect of taurine on the GVBD rate of oocytes : the percentage of germinal vesicle(GV) was much higher in the medium added 7.0 mM

of taurine. this concentration decreased the ratio of GVBD stage (MI-MII) compared to treatments.

6. The effect of taurine on the expulsion of first polar body (Pb 1) of oocytes : the addition of 2.5 mM of taurine significantly increased the oocytes maturing to second metaphase(MII) stage compared to the control.

7. The effect of antioxidants on the oocytes maturing to MII stage : the addition of SOD and taurine significantly($p < 0.05$) improved the nuclear maturation of oocytes, but not in addition of catalase.

8. The effect of antioxidants on the viability of oocytes using the Celltiter AQ System : the addition of SOD and taurine significantly($p < 0.05$) increased the viability of oocytes compared to the control, but catalase decreased .

9. The effect of antioxidants on the viability of oocytes using CFDA stain: the addition of SOD and taurine significantly($p < 0.025$) increased the viability of oocytes compared to the control, but catalase addition was not different from the control.

Results in the present study indicate that medium containing antioxidants such as SOD and taurine improved the maturation capability and viability of oocytes, indicating that antioxidants might remove the free radicals produced in culture environment , and so on.

I. 序 論

卵母細胞의 成熟·受精 과정에서, 세포성 및 화학적 요인을 구명하므로써, 體外에서 胚의 대량생산이 가능하며, 생산된 胚를 이용한 기초연구 및 동물번식육종 분야에 응용할 수 있는 범위가 증대된다.

돼지 卵母細胞를 체외에서 成熟·受精하여 발생이 가능하다는 것이 일부 연구자에 의해 보고되어 왔다(Mattioli 등, 1989; Nagai 등, 1990; Yoshida 등, 1990). 그러나 돼지 난모세포를 체외에서 성숙 시켰을 때, 體內成熟된 난모세포보다 비정상적인 成熟과 受精(Sato 등, 1978; Yoshida 등, 1989), 染色體異常(McGaughey와 Polge, 1971), 多情子受精 및 多卵核形成(Yoshida 등, 1990) 등이 높게 나타난다. 이러한 비정상적인 현상들이 결국은 4-cell block 등, 胚발생을 저하의 원인이 되며, 산자 생산도 그만큼 감소하게 된다. 현재 타가축 특히 소에서는 體外에서 생산된 受精卵를 移植하여 다수의 産仔를 얻고 있으며, 이미 실용화 단계에 있으나 돼지에서는 産仔를 얻은 성공예는 별로 없다 (Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1993).

따라서, 돼지 體外成熟(IVM; In Vitro Maturation) - 體外受精(IVF; In Vitro Fertilization) - 體外發生(IVC; In Vitro Culture)은 타가축에 비하여 어렵고 상기에 서술한 비정상적인 현상들에 대한 원인을 구명하지 않는 한 胚의 대량생산은 기대할 수 없다.

포유동물 수정란의 체외 배양시, 체외발육억제 현상이 발생하는데 그 원인중의 하나로 free radical이 시사되고 있다. Free radical은 배란, 수정능획득 등의 정상적인 생리작용에도 관여 하지만, 포유동물의 모든 세포에서 효소의 불활성화, 세포막 지질의 과산화화를 유발시켜 세포기능을 손상시키는 것으로 보고되고 있다(Corsby 등, 1988; Joenje, 1989; Bize 등, 1991; Miyazki 등, 1991).

체외배양액 내에서 형성되는 free radical의 생성을 억제 또는 중화 시키기 위해 여러 가지 방법이 모색되었다. 즉, 소에서 배의 체외발생을 유도하기 위해 난구세포(Berg와 Brem, 1990) 또는 난관상피세포(Lu 등, 1988; Goto 등, 1989; Fukui 등, 1990)와 수정란을 공배양한 결과 체외 발생율이 증가하여, 이들 체세포가 free radical의 형성을 억제하였기 때문에 발생율이 증가한 것으로 시사되었다.

또한 Thompson 등(1990)은 체세포와의 공배양이 항산화물질을 생산한다고 보고했으며, 산화환원효소인 superoxide dismutase(SOD)는 과산화수소를 물과 산소로 변환시키는 효소로서 생체내에서는 glutathione, peroxidase,

catalase 등이 작용한다. 최근에는 이러한 산화환원효소인 SOD, catalase 및 taurine 등과 같은 항산화물질을 체외 배양액 내에 첨가하여 수정란의 체외발육 억제제를 극복하여 체외 수정란의 체외발육을 증진시킨다고 보고하고 있다(Li 등, 1993; Umoako 등, 1992). 그러나 특히 돼지 난모세포의 체외성숙 배양에 있어서, 이들 항산화 물질의 효과에 대해 구명한 연구결과는 거의 없으며, 배발생 연구의 결과에서처럼 이들 항산화 물질이 난모세포의 체외성숙에서도 효과를 보인다면, 돼지의 체외 수정란 생산은 한층 증대됨은 물론이고, 또한 체외배양 조건도 크게 개선되리라 기대된다.

따라서, 본 연구는 정상적인 수정란을 대량생산할 목적으로, 1) 난모세포의 체외성숙에 미치는 항산화제의 영향, 2) 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(Pb1) 형성에 미치는 항산화제의 영향, 3) 난모세포의 생존율에 미치는 항산화제의 영향, 4) mTLP-PVA 배양액에서 체외성숙한 난모세포의 체외수정율에 대하여 체외성숙 배양의 조건설정에 대해 실험을 실시하였다.



II. 研究 史

1. 난모세포의 핵 성숙능력

일반적으로 哺乳動物의 未成熟난모세포의 核은 출생 後에 第1成熟分裂前期(卵核胞期)의 상태에서 成熟分裂을 중지해서, 이후 수정가능한 상태가 되는 第2成熟分裂中期로의 成熟은 排卵直前까지 일어나지 않는다. 그러나 卵胞로부터 未成熟 난모세포를 채취하여 적당한 조건하에서 體外培養하면, 成熟分裂을 再開하여 第2成熟分裂中期에 도달한다(Pincus와 Enzmann, 1935). 이 현상은 돼지 未成熟 난모세포에 대해서도 다수의 연구자가 보고하고 있다(Edward, 1965; Foote와 Thibault, 1969; McGaughey와 Polge, 1971; Sato 등, 1978; Motlik 등, 1984; Eng 등, 1986). 그러나 돼지 未成熟 난모세포에서는 體外受精의 적기를 결정하는데 가장 중요한 요인중의 하나인 第2成熟分裂中期에 도달하는 시기가 보고자에 따라 다르다(McGaughey와 Polge, 1971; Sato 등, 1978). Yoshida 등(1989)은 돼지 未成熟 난모세포가 第2成熟分裂中期에 도달하는 시기를 경시적으로 조사한 결과, 핵성숙율은 培養 30시간후에 현저하게 증가했다고 보고했다. 한편 體內에서는 돼지 未成熟 난모세포의 핵성숙율이 급격히 증가하는 시기는 發情前期의 hCG 투여후 36시간이라고 보고되고 있다(Hunter와 Polge, 1966; MCGaughey, 1978). 그러나 Meinecke 와 Meinecke-Tillmann, (1979)은 hCG를 투여한 돼지에서 未成熟 난모세포가 成熟分裂 억제가 解除되어 핵성숙능력을 획득할 수 있는 시기는 hCG 투여 직후가 아니라 투여후 4~8시간 이후라고 보고하고 있다. 따라서, 成熟分裂抑制가 解除되는 시기를 기점으로 해서 핵성숙율의 증가시기를 算定할 경우, 體內에서는 30시간 後이지 만, 연구자 및 실험방법에 따라 다소 차이가 있고, 體外培養 24시간부터 48시간까지 핵성숙이 계속 진행되는 점으로 봐서 體外배양한 돼지 未成熟 난모세포의 핵성숙에 요하는 시간은 난모세포 개체간에 오차가 대단히 크다는 것을 시사한다.

2. 난모세포의 핵 성숙과 성숙 촉진인자(MPF)

생쥐, 토끼 및 돼지 未成熟 난모세포의 세포질내에는 成熟分裂 재개전에 成熟

促進因子(MPF: maturation promoting factor)가 출현한다고 보고되고 있다 (Fulka, 1983; Fulka 등, 1985, 1988). 또한, Motlik와 Fulka (1986)에 의하면, 체외배양한 돼지 未成熟 난모세포에서 MPF 축적에 요하는 시간이 난모세포 개체간에 현저히 다르다고 한다. Kishimoto (1989)에 의하면, 생쥐 난모세포의 成熟過程에 있어서 MPF 활성화는 成熟分裂再開 직전에 출현하여 第1成熟分裂中期에 최고치에 달한후 제1극체방출시에 일단 소멸한다고 한다. 그리고 第2成熟分裂開始와 함께 다시 출현하여 第2成熟分裂중기에 다시 최고치에 달한후 成熟分裂完了와 동시에 소멸한다. 또한, 생쥐 난모세포의 MPF 활성화는 난핵포기에는 蛋白質合成에 의존하지 않지만, 第1成熟分裂중기 이후에는 蛋白質合成에 의존성으로 전환된다고 보고되고 있다(Hashimoto와 Kishimoto, 1988). 한편, 돼지 난모세포의 핵성숙과정에 있어서, 난모세포의 단백질합성이 MPF를 활성화시킨다는 점으로 비추어 볼 때 MPF 활성화가 단백질합성에 의존하는 상태는 생쥐의 난모세포와는 다소 차이가 있는것으로 시사되고 있다. 최근, Mattioli 등 (1991)은 돼지에서 成熟分裂再開시기 및 第2成熟分裂中期로의 移行時期에 난모세포의 MPF가 活性化 되는데 단백질합성이 필요하다고 보고되고 있다(Mattioli 등, 1991).



3. 체외성숙 난모세포의 체외수정

體外受精에서 난모세포에 精子를 매정하는 기회는 많아야 1회 전후이다. 따라서 매정시기에 난모세포의 成熟狀態가 균일하게 하는 것이 체외수정을 효과적으로 실시하기 위해 매우 중요하다. 체외성숙한 돼지 난모세포를 체외수정하면, 수정능은 대단히 높지만 체외수정 상황을 상세하게 조사해 보면 2개 이상의 자성전핵이 형성되는 다란핵수정, 2개 이상의 精子侵入이 觀察되는 다정자수정 및 침입정자의 응성전핵으로의 발달이 불완전성등 受精異常의 난모세포가 빈번히 관찰된다. 이들 수정이상의 빈도는 成熟培養 시간을 조절해도 개선되지 않는다고 보고되고 있다(Yoshida 등, 1989). 돼지에서는 體內受精에 있어서도 수정시의 난모세포의 성숙상태가 不完全하면, 수정이상의 빈도가 높아진다고 보고되고 있다(Hunter, 1967; Hunter 등, 1976). 예를들면, 난포기 初期에 排卵 유기시(미성숙 난모세포의 수정) 및 遲延交配시(성숙 난모세포의 수정)에도 수정이상이 현저하게 높다고 지적되고 있다. 따라서, 돼지 체외성숙 난모세포의 체외수정에서 수정이상이 빈번히 관찰되는 원인중의 하나는 체외성숙 난모세포의 核과 細胞質의 성숙상태가 난모세포 개체간에 오차가 아주 크고, 성숙이 不完全한 상태에

서 精子的 침입을 받기 때문이라고 추측된다

4. 난모세포의 응성전핵 형성능력

돼지 체외성숙 난모세포의 응성전핵 형성능력은 체내 성숙난에 비해 낮고, 돼지 난모세포의 체외성숙·체외수정에서 개선해야할 課題이다. Yoshida 등(1992)은 성숙배지의 조성이 돼지 체외성숙 난모세포의 응성전핵 형성에 큰 영향을 미친다고 보고하였다. 즉, 체외수정 후의 응성전핵 형성율은 돼지 난포액(PFF: porcine follicular fluid) 첨가의 유무와 상관없이 타배양액과 비교해서 Waymouth 배양액에서 유의하게 높았으며 현저하게 개선효과가 있었다고 한다. Waymouth 배양액은 생쥐 L929세포의 증식용 배양액으로 개발된 것이다(Waymouth, 1959)는 이 培養液은 많은 成分이 질적, 양적으로 TCM-199 배양액과 다르며, 특히 Waymouth 배양액에는 glutathione 과 GSH합성기질인 cysteine (CySH)이 TCM-199 배양액보다 고농도로 함유되어 있다. Yoshida 등(1992)은 Waymouth 배양액과 비교하기 위해서, 단순한 조성으로 구성된 mTLP-PVA 배양액에 GSH 또는 CySH를 첨가하여 배양한 결과, CySH는 응성전핵형성 능력을 개선하는 효과가 있었으며 Waymouth 배양액의 결과와 비교해도 손색이 없었다고 한다.

한편, CySH는 GSH의 합성기질이며(Meister와 Anderson, 1983), 생쥐와 햄스터에서는 난모세포내의 GSH가 수정후의 精子的 응성전핵 형성으로의 발달에 중요한 요인이라고 시사되었다(Calvin 등, 1986; Perreault 등, 1988; Perreault 등, 1990). GSH는 細胞膜 透過性이 낮고 세포내의 GSH농도는 CySH에 의존하며(Meister, 1983), 생체내에 가장 많이 존재하는 tripeptide의 SH기 化合物이다. Meister와 Anderson (1983)에 의하면, GSH는 1) 세포내의 蛋白質 및 타물질의 SH기를 보호한다, 2) SH기, S-S결합의 反應에 參與한다, 3) 過酸化水素, 타의 過酸化物質 및 유리기 (free radical) 등의 解毒(산화방지)에 參與한다, 4) 細胞分裂, DNA합성, 蛋白質合成에 參與하는 등 여러가지 生理的 機能에 關係한다고 했다.

5. 체외수정에 관여하는 요인 및 다정자수정

일반적으로 哺乳動物의 난모세포는 배란 후에 수정부위인 난관팽대부에서 수정능을 획득하여 침체반응을 일으킨 1개의 精子와 수정 후, 발생을 계속하여 산자에 이른다. 체내수정 및 소 체외성숙 난모세포의 체외수정과는 달리, 돼지 체외성숙난의 체외수정에서는 다정자수정율이 높아 결과적으로 정상수정율이 낮다는 결점이 문제시 되어 왔다. 또한 돼지 난모세포의 다정자수정의 방어기작에 대한 보고는 적고 단정자수정율을 효과적으로 증진시키는 방법은 아직 確立되어 있지 않다.

돼지 난모세포의 체내수정에서는 난관협부의 作用에 의해 수정부위인 난관팽대부로 移行할 수 있는 정자수가 制御된다(Hunter, 1990). 난관협부를 실험적으로 제어하거나, 난관에 다수의 정자를 외과적으로 注入하면, 체내수정에 있어서도 다정자수정의 빈도가 증가한다고 보고되고 있다(Hunter, 1990). 체외수정의 경우, 난모세포에 정자의 매정기회는 1회뿐이며 일정 수준의 수정율을 유지하기 위해서 체내수정의 경우 보다 다수의 精子를 필요로 한다. 포유동물 난모세포의 체외수정 成敗는 난모세포의 성숙능력 뿐만 아니라 정자의 수정능력에도 크게 의존한다. 종래부터 체외에서 돼지 정자의 수정능획득, 침체반응 유기에는 정자 전배양의 필요성이 指摘되어 왔다(Nagai 등, 1984; Cheng, 1985). 그러나 최근에는 射精直後의 新鮮精液에 있어서는 전배양을 할 필요성이 없다고 하는 경향이 다.

體外受精 體系에 있어서, 일정수준 이상으로 유지하면서 다정자수정의 빈도를 줄이기 위한 手段으로서, 가능한 난모세포와 정자의 접촉시간을 한정하는 방법도 예상된다. 실제로 精子 染色體 分析을 하기 위해 이종간 체외수정을 실시한 實驗에서, 早期에 수정 배지를 交換하므로써 단정자수정율이 유의하게 높았다고 보고하고 있다(Tateno와 Mikamo, 1987). 돼지 체외수정에서는 매정 후 6~8시간에 수정배지를 交換하고 있지만(Cheng 등, 1985; Nagai 등, 1988; Mattioli 등, 1989; Yoshida 등, 1990), 매정 후 早期에 수정배지 交換의 영향에 대해서는 결과가 일정치 않다.

Ca^{2+} 은 정자의 수정능획득, 침체반응 유기 뿐만 아니라, 난모세포의 다정자 방어기작 발현에 관여하는 表層反應(cortical reaction)에 중요한 역할을 한다(Guraya, 1983). 표층반응에서, 表層果粒의 세포외방출 현상은 다정자 방어기작의 하나인 투명대반응을 유기한다고 생각되고 있다(Austin과 Braden, 1956; Barros와 Yanagimachi, 1972). 한편, Cran과 Cheng (1986)은 수정배지의 Ca^{2+} 濃度を 증가시키면 돼지 난모세포의 표층반응 및 위란강내로 표층과립의 擴散이 빨라진다고 보고했다. 그러나 Yoshida 등(1993)은 Cran과 Cheng

(1986)이 보고한 Ca^{2+} 濃度 7.61mM을 수정배지에 첨가하여 체외수정한 결과, 다정자수정율은 減少되지 않았다고 보고했다. 보고자간에 결과가 다른 이유는 수정배지에 함유되어 있는 Ca^{2+} 은 난모세포 보다는 精子에 優先적으로 영향을 미쳐, 그 결과 정자의 수정능 획득 및 침체반응 유기를 효율적으로 促進 시켰기 때문이라고 사료된다.

난모세포내의 표층과립은 다정자 수정의 방어기작 발현에 중요한 역할을 하는데(Cran, 1989; Cran과 Esper, 1990), 표층과립 연구에는 투과형 전자현미경(TEM)이 사용되어 왔다(Zamboni 와 Thompson, 1972; Cran 등, 1980; Kruip 등, 1983; Cran과 Cheng, 1985; Okada 등, 1986). 그러나 TEM을 사용하였을 때, 成熟 및 受精에 수반하여 경시적으로 변화하는 표층과립의 分布 및 표층과립 성분의 物質組成을 조사하는데는 한계가 있다. 이후 생쥐와 햄스터 난모세포의 표층과립에는 糖鎖構造를 갖는 물질이 含有되어 있어서, 螢光物質로 표지한 lectin을 probe로 사용하여 형광현미경하에서 표층과립의 檢出이 가능하였다고 보고되었다(Cheer 등, 1988; Ducibella, 1988, 1990). Yoshida 등(1992)은 소와 돼지 난모세포에서 FITC-PNA(peanut agglutinin) probe가 표층과립 검출에 有效하였다고 보고하였다. 즉 이들은 FITC-PNA probe 및 레저현미경에 의한 畫像解析技術을 이용하여 돼지 난모세포의 成熟과 受精에 따른 표층과립 분포의 變化를 分析하였다. 분석결과, 1) 난모세포의 成熟이 진행됨에 따라 표층과립은 遠心性 移動을 한다, 2) 표층과립의 원심성 이동의 시기 및 형태는 난모세포 개체간에 오차가 없다, 3) 체외수정후, 위란강에 放出된 표층과립은 금방 소실되지 않고, 일정기간 위란강내에 검출된다, 4) 체외수정 후, 위란강의 표층과립 방출시기, 형태 및 체재기간은 단정자와 다정자 수정란간에 차이가 없었다고 하였다. 그러나 체외성숙난의 체외수정에서 다정자수정이 발생하는 원인중의 하나로서 표층과립 성분의 양적인 문제도 미해결된 課題로 남아 있다.

6. 항산화제

아미노산과 지방의 분해에서 몇가지 산화반응은 free radical과 과산화수소(H_2O_2)를 생성하는데, 이것들은 매우 반응성이 높은 화합물이고 세포를 손상시킨다.

이들의 부산물로부터 세포를 보호하기 위해서 peroxisome이라 불리우는 막으로 둘러싸인 작은 소포내에 그와같은 반응을 격리시킨다. 과산화수소는 peroxisome 과 glioxisomes에 풍부하게 들어 있는 catalase 효소에 의해 $2\text{H}_2\text{O}_2$ 를 $2\text{H}_2\text{O}$ 와 O_2 로 분해시킨다.

과산화수소와 hydroxi radical, superoxi radical 등의 활성산소화합물은 (excited-oxygen species)은 강한 광선의 조사나 호기성대사의 부산물로서 생성된다. 세포는 이와 같은 활성산소화합물을 파괴하기 위해서 catalase와 SOD 등의 방어 메카니즘을 가지고 있다.

SOD를 배양배지에 첨가했을 때 이 효소는 mouse의 2-cell block을 해제시켜 분열을 촉진하여 발생능을 증가시키는 작용을 갖고 있다(Natsuyama 등, 1992; Goto 등, 1992). 즉, 이 효소는 배양중에 유리기가 형성될 때, S기가 산화되어 S결합이 생기는 것을 줄인다(Natsuyama 등, 1992).

또한, SOD는 mouse의 난관에 다량 존재하고 있다는 것이 입증 되었으며(Noda 등, 1991), 정상적인 생체조건하에서 SOD는 과산화기의 변형($2H^+ + 2O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉진시키는 것으로 추정된다. 생체내의 이와 같은 반응에서 SOD는 H_2O_2 가 해로운 농도까지 축적되지 않게 하여 세포의 손상으로부터 배를 보호한다고 시사되고 있다. 배 그자체가 H_2O_2 를 H_2O 와 산소분자로 분해할 수 있는지에 대해서는 아직 정확히 구명되어 있지 않지만, H_2O_2 에 대한 분해효소를 사용함으로써 배의 그것에 대한 분해능력 여부를 확인할 수 있다.

Catalase는 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 분자로 빠르게 환원시킨다. 체내 배발생시 또는 체외에서 배 배양시, 난관액 또는 배양액 중에 H_2O_2 가 생성되며, 특히 체외 배양시 산소농도가 높은 기상조건에서 배양하면 생성되는 H_2O_2 량은 더 많아지는게 일반적이다. 이론적으로 catalase의 첨가는 이러한 조건하에서 이로울 수도 있지만, catalase의 첨가 효과를 입증 할 수는 없었다고 보고되고 있다(Li 등, 1993). 이러한 견해는 Leggr와 Sellens(1991)가 mouse의 배에 관해 보고한 결과와 일치한다. 이들 연구자의 실험에서 배지에 첨가한 1mM glutathione은 mouse의 zygote가 blastocyst로 발생을 증진시키는데 아주 효과적이라고 하고 있다. 그러나, catalase가 2세포기의 mouse 배에 주입되면, 내부의 H_2O_2 의 생산은 억제되지만, 배지에 catalase 첨가에 의해서는 억제되지 않는다. 그러므로 배외부에 축적된 H_2O_2 를 제거하는 내부적인 기작이 필요하며, 첨가된 catalase는 효과가 없는 것이다(Li 등, 1993).

아미노산의 일종인 taurine이 포유동물의 세포내 삼투압조절물질로서 역할을 한다고 Chan 등(1979)이 보고 하였고 Fain (1973)은 taurine이 β -adrenaline 수용체를 통하여 adenylate cyclase 의 활력을 상승 시킴으로서 세포내 cAMP 수준의 상승을 유발시켜, hormone 감수성 lipase인 cataacholamine의 지방분해능력을 증진시킨다고 보고 하였다.

Li 등(1993)은 taurine은 oxidation이나 peroxidation의 생성물질로부터 세포막을 보호하고, Ding 등(1993)은 독성물질로부터 세포막의 손상을 방지한다고 보고 하고 있다. taurine과 그 전구물질인 hypotaurine은 황이 들어 있는 β -아미노산이

며 몇몇 포유류의 암컷 생식기관(Meizel, 1980; Casslen, 1987; Miller 와 Schultz, 1987)과 인간의 정자(Hervann 등, 1986) 그리고 정자의 첨체부분(Velazquez 등, 1986)에 비교적 고농도로 존재한다.

정자의 능력과 타종간의 인공수정에 관한 taurine의 역할이 많이 알려져 있다(Mrsny 등, 1979). Hamster의 정자는 활력, 운동성 및 생존력을 유지하기 위해 배양배지내에 taurine과 hypotaurine이 필요하다(Leibfried와 Bavister, 1981, 1982). 또한 taurine과 hypotaurine은 hamster 정자의 수정능력도 증가시켜준다. 소에서도 배지내에 hypotaurine의 존재는 수정 및 수태율을 증가시켰다(Ball 등, 1983). 한편 mouse 정자는 완전한 수정능력을 나타내는데는 taurine 첨가가 필요치 않다고 보고되고 있다(Fraser, 1986). 사람 정자의 경우 taurine이 첨가된 배지에서 수정이 빨라지는 것으로 보고되고 있지만(Mortimer, 1986; Chan, 1985), taurine에 의해 수정율이 증가되는 것으로는 보이지 않는다(Mahadevan 와 Trounson, 1985). 따라서, 착상전 포유류 배발생에 있어서 taurine의 역할은 확실히 밝혀져 있지 않다고 할 수 있다.

Taurine은 암컷 생식관과 배에서 고농도로 발견된다. taurine은 쥐과의 난관과 토끼의 자궁 그리고 이 두 종의 난모세포의 유리아미노산의 주요 구성분이며 고농도로 존재하며 항산화제로 작용한다(Oza 등, 1985). 예를들면 산소기(oxygen radical)들은 황 결합을 촉진하는데, Nastuyama 등(1992)은 산화환원제 thioreduxin이 단백질의 S-S결합을 감소시켜, mouse의 2-cell block을 해제시킨다고 보고했다. RD 배지에는 taurine이 들어 있지 않지만 황 화합물인 glutathione이 들어 있다. 이 glutathione은 단백질의 산화를 방지하지만, RD배지에는 미세한 농도(1mM)로 존재한다. Dumoulin 등(1992)은 taurine이 생식기관에서 높은 K^+ 농도로부터 mouse의 배를 보호한다는 증거를 제시했다.

taurine이 쥐(Eppig 등, 1990)와 돼지(Reed 등, 1992), 그리고 토끼에 사용되는 배양배지를 개선시켜 준다는 것이 이미 알려져 있다. Hypotaurine은 인공수정시킨 hamster 배의 발생에 필수적이며(Barnett 등, 1992), taurine은 비교적 간단한 화합물이기 때문에 taurine을 첨가한 RD배지는 거대분자의 유용한 배지가 된다고 하였다(Li 등, 1993). 따라서 taurine은 특히 배 발생에 깊이 관련되어 있으며, 배발생율을 증가시킬 수 있는 물질이라고 할 수 있다.

Ⅲ. 材料 및 方法

1. 공시재료 및 실험방법

난소채취 : 공시난소는 도축장에서 도살된 돼지(체중 70~100kg) 난소를 20분 이내에 채취하여 멸균 생리식염수(0.9% NaCl, penicillin Gk : 0.075g/l, streptomycin sulfate 0.05g/l)가 들어 있는 보온병(30℃~37℃)에 침지하여 1시간내에 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다(Fig. 1).

시약 및 기구: superoxide dismutase(SOD, Sigma), catalase(Sigma), taurine(Sigma), CellTiter Aq System Kit(Promega), ELISA, CFDA(Sigma).

정액 : 제주도 축산진흥원에서 제공받은 액상정액을 체외수정에 사용하였다. 채취하여 30분 이내에 실험실내로 운반하여 BSA와 항생제를 첨가한 생리식염수로 원심분리(1500rpm, 5분간) 2회 실시 후 실험에 공시하였다. 실험에 사용한 배양액 조성표는 Table 1, 2, 3에 나타났다.

2. 체외성숙

난모세포 채취 : 난모세포 채취는 적출된 난소를 멸균된 여과지로 난소의 혈액과 수분을 제거한 다음 18gauge 주사바늘이 부착된 10ml 주사기를 사용하였다. 배양액은 0.22 μ m millipore filter로 여과 멸균 한후 ph 7.2-7.4로 조정하여 배양기에서 6시간 동안 평형 시켰다. 난포액과 난모세포를 흡인하여 glass test tube에 옮겨 5분간 정치 후 HEPES mTALP-PVA 세척용 배지로 2회 세척 후 실체현미경하에서 mTLP-PVA 성숙배양액에서 1회 세척, 호르몬 첨가된 성숙배양액에서 난구세포가 충실한 난모세포를 1회 세척 선발 배양하였다(Fig. 3, A).

난포액(PFF) : 난포액은 15ml tube에 넣어 3000rpm에서 10분간 원심분리 후 0.45 μ m millipore filter로 여과 후 다시 0.22 μ m millipore filter로 최종 여과 후 56℃ water bath 에서 30분간 비동화 처리하여 -20℃에 보존 사용하였으며 사용시는 배양액 전체 volume에 10% 첨가 사용하였다.

성숙배양 : 난모세포는 멸균된 배양액에서 선발하여 petri-dish에 Paraffine

oil(sigma)로 피복한 후 SOD, catalase, taurine의 농도에 따라 난모세포를 침지 적응시킨 후 농도에 따라 각각 $100\mu\text{l}$ 배양액 소적에 난자를 10개씩 넣어 CO_2 배양기내(95% humidity, 5% CO_2 , 38°C)에서 48시간 배양(Fig. 3, B)하였다.

성숙판정 : 48시간 배양 후 fine narrow pasture pippette로 난자의 난구세포를 0.1% hyaluronidase로 제거한 다음 slide glass로 옮겨 cover glass를 덮고 가볍게 눌러 난자를 보정시키고 고정액(acetic acid 1: ethyl alcohol 3)을 흘린 다음 acetic alcohol 용액에 2~3일간 고정하여 탈수시킨 후 1% aceto-orcein으로 염색을 한 후 manicure로 봉인하였다. 그 후 위상차현미경(400-1000배)에서 난자의 핵상을 판정하였다. 난모세포의 판정은 Hunter와 Polage (1966)의 방법에 따라, 제2감수분열 중기(metaphase II)인 것을 성숙된 난모세포로 판정하였다.

3. CellTiter AQ Kit를 이용한 생존성 측정

Tetrazolium Compound(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt : MTS) + phenazine methosulfate: PMS를 실온에서 용해시킨 후 희석 사용하였으며 각 처리구에 대하여 성숙배양 48시간에 측정 하였다.

mTLP-PVA 배양액 $100\mu\text{l}$ drop에 MTS+PMS 혼합액을 $20\mu\text{l}$ 첨가하여 배양기에서 1~4시간 동안 반응 시킨 후, ELISA Reader(450nm)에서 측정 하였다(Fig. 2). 이 반응의 원리를 간략하게 서술하면 다음과 같다.

MTS(Tetrazolium salt)를 세포와 반응 시키면, 살아있는 세포일수록 dehydrogenase가 많기 때문에 이 효소가 MTS를 분해하면 formazan이 형성된다. 따라서 ELISA에서는 형성된 formazan을 측정하게 된다.

4. CFDA(carboxyfluorescein diacetate) 를 이용한 생존성 측정

CFDA-test에서는 김 등(1995)의 방법을 일부 수정하여 각 처리구에 대하여 성숙배양 48시간에 생존성을 측정 하였다. CFDA-stock을 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해한 CFDA $20\mu\text{M}$ 과 formaldehyde(37%) 1.7mM를 PBS에

최종 회석 후, 난모세포에 적당량 첨가하여 10분간 배양기에서 형광반응 시킨 후 B-filter를 사용하여 형광관찰을 하였다(Fig. 2).

5. 체외수정

체외수정 정액 및 정자처리 : 체중 약 200kg의 랜드레이스로부터 채취한 사출 정액(제주도 축산진흥원 종돈장에서 사육중인 종모돈)을 이용하였다. 정액을 원심분리하여 정장을 제거한 후, 정자를 생리식염수(100mg/l, BSA 100mg/l 및 kanamycin sulfate 첨가)로 2회 세척(1500rpm, 5분 원심분리) 후, 5×10^7 cells/ml이 되도록 정자를 회석하였다(Fig. 1).

수정배지 : mTALP-PVA액(3mg BSA/ml, 2mM caffeine 100 μ g/ml, kanamycin sulfate 첨가)을 사용하였으며, pH는 7.8이 되도록 조정하여 배양기에서 6시간동안 평형시켰다.

체외수정 : 성숙배양(48시간)이 끝난 난모세포를 2회 mTALP-PVA 수정배지로 세척 후, mTALP-PVA 수정배지 drop(0.1ml)에 10~15개씩 넣어 수정을 실시하였다. 최종정자 농도는 $2 \sim 5 \times 10^4$ /ml이 되도록 조정하여 성숙배양과 같은 기상조건에서 6시간 난자-정자의 공배양을 실시하였다. 공배양 6시간 후에 난모세포의 표면에 있는 정자 및 난구세포를 제거하여 발생배지(mTCM-199+10% FBS)로 2회 세척한 후, 계속해서 동발생배지에서 12시간 추가 배양하였다(Fig. 1).

난모세포의 수정판정 : 수정 후 18시간에 수정란을 ethanol+acetic acid (3:1)로 2~3일간 고정한 후, 1% orcein 염색액으로 염색하여 위상차현미경으로 관찰하였다. 성숙된 난모세포중에서 정자두부 또는 융성전핵(미부일치)이 관찰된 경우, 정자 침입란으로 하고, 난자내에 침입한 정자가 1개인 경우 단정자 수정란으로 하였으며, 미부가 일치하는 전핵을 융성전핵 형성란으로 판정하였다.

6. 실험구

1) 난모세포의 체외성숙에 미치는 항산화제의 영향 : 항산화제로서는, SOD (100, 200, 300, 400, 500 U), catalase(50, 100, 150, 200, 250 U) 및 taurine (1.0, 2.5, 4.0, 5.5, 7.0mM)을 사용하였다.

2) 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1) 형성에 미치는 항산화제의 영향 : GV(미성숙난)와 GVBD~MⅡ난으로 분류하여 분석하였다.

3) 난모세포의 생존율에 미치는 항산화제의 영향 : 항산화제를 첨가하여 난모세포를 배양한 후, CFDA 및 CellTiter AQ System을 이용하여 ELISA에서 생존성을 측정하였다.

4) mTALP-PVA 배양액에서 체외성숙한 난모세포의 체외수정율 : 체외수정 18시간 후에 수정율(정자 침입율), 다정자 수정율 및 응성전핵 형성율에 대해 검토했다.

7. 통계처리

실험결과는 Chi-square 검정에 의하여 유의성을 나타내었다.



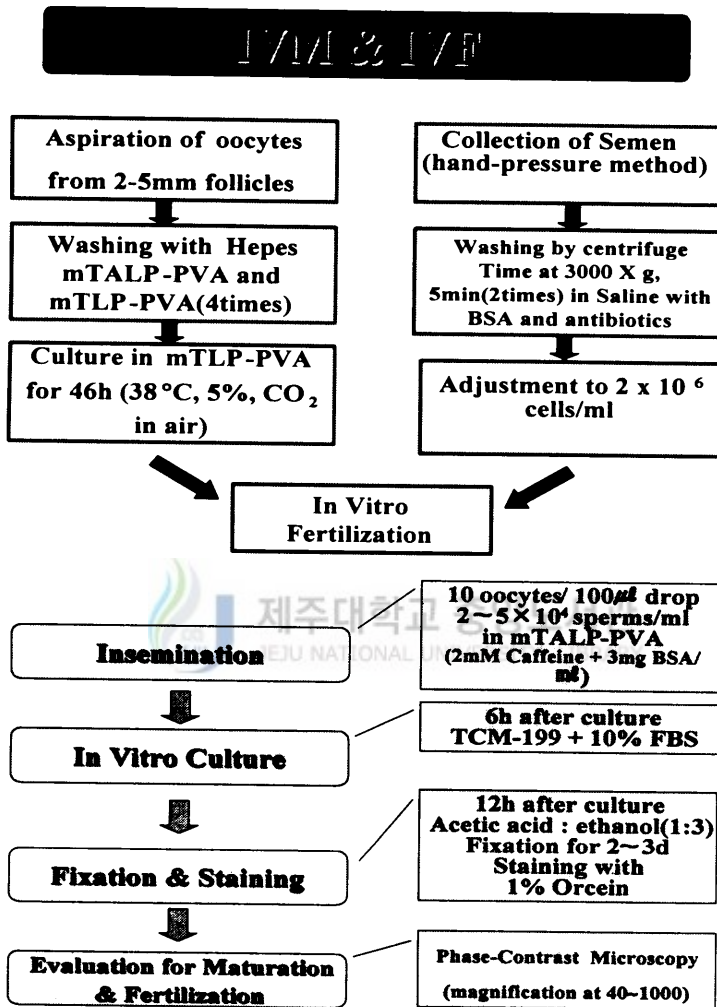


Figure 1. Processes of in vitro maturation and fertilization in porcine oocytes

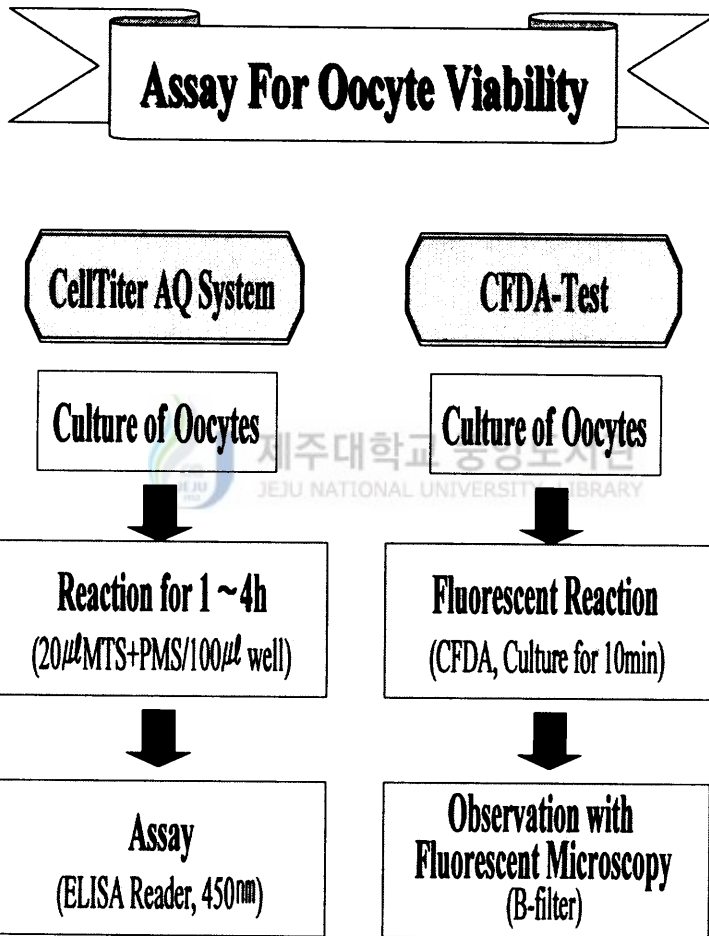


Figure 2. Methods for the viability assay of oocytes using CellTiter AQ System and CFDA-test

Table 1. Basic compositions of Hepes mTALP-PVA (washing)

Components	mM	g/500ml
NaCl	127.00	3.7109
KCl	3.16	0.1178
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.00	0.1470
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.50	0.0508
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.35	0.0273
NaHCO ₃	2.00	0.0840
Na pyruvate	0.10	0.0055
Na lactate	10.00	0.925ml
Glucose	5.00	0.4504
Hepes(Na salt)	5.00	0.6580
Hepes(free acid)	5.00	0.5980
Polyvinylalcohol	1mg/ml	0.5000
BSA	1mg/ml	0.5000
Kanamycin	100ug/ml	0.0500
Phenol red	10ug/ml	0.0050

Table 2. Basic compositions of maturation media (mTLP-PVA)

Components	mM	g/500ml
NaCl	114.00	3.3311
KCl	3.16	0.1178
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.00	0.1470
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.50	0.0508
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.35	0.0273
NaHCO ₃	25.00	1.0501
Na pyruvate	0.10	0.0055
Na lactate	10.00	0.925ml
Glucose	5.00	0.4504
Glutamine	1.00	0.0731
Isoleucine	0.20	0.0131
Methionine	0.05	0.0037
Phenylalanine	0.10	0.0083
Cysteine	0.57	0.0345
Polyvinylalcohol	1mg/ml	0.5000
Kanamycin	100ug/ml	0.0500
Phenol red	10ug/ml	0.0050

Table 3. Basic compositions of Fertilization media (mTALP-PVA)

Components	mM	g/500ml
NaCl	114.00	3.3311
KCl	3.16	0.1178
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.72	0.3469
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.50	0.0508
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.35	0.0273
NaHCO ₃	25.00	1.0501
Na pyruvate	0.10	0.0055
Na lactate	10.00	0.925ml
Glucose	5.00	0.4504
Polyvinylalcohol	1mg/ml	0.5000
BSA	3mg/ml	1.5000
Caffeine	2.00	0.1942
Kanamycin	100ug/ml	0.0500
Phenol red	10ug/ml	0.0050

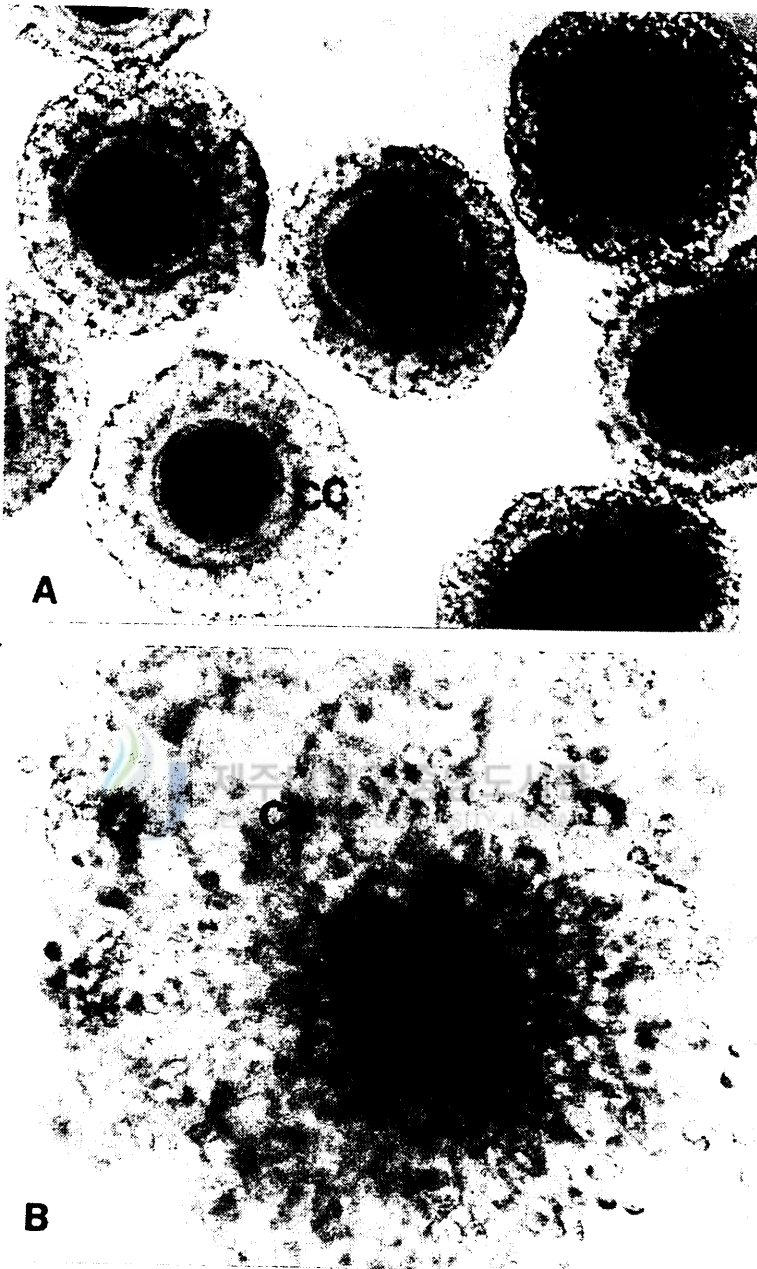


Figure 3. Morphology of porcine oocyte cumulus complexes.

A: Oocyte tightly enclosed by cumulus cells before culture.

B: Oocyte with fully expanded cumulus cells 48h after culture.

CC: cumulus cell layer.

IV. 結果 및 考察

1. 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1)형성에 미치는 항산화제의 영향

난모세포는 성숙배양 48시간 후 acetic alcohol 용액에 2~3일간 고정하여 탈수시킨 다음 1% aceto-orcein으로 염색하였다. 그 후 위상차현미경(400-1000배)에서 난자의 핵상을 판정하였다(Fig. 5, 6). 난모세포의 판정은 Hunter 와 Polage (1966)의 방법에 따라, 제2감수분열 중기(metaphase II)인 것을 성숙된 난모세포로 판정하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1) 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1)형성에 미치는 SOD의 영향

미성숙난자인 GV 비율은 0~8.7% 범위였으며, SOD 농도별로 보면 대조구 2.7%에 비해 400U일 때 0%로 가장 낮고, 500U일 때 8.7%로 가장 높았다. 한편, 감수분열을 재개한 난자, 즉 M I ~M II 비율은 91.3~100% 범위였으며, SOD 농도별로 보면 대조구 97.3%에 비해 500U일 때 91.3%로 가장 낮고, 400U일 때 100%로 가장 높았으나 처리구간 유의차는 인정되지 않았다(Table 4).

극체를 방출하여 완전히 성숙을 완료한 난자, 즉 M II 비율은 64.3~87.2% 범위였으며, SOD 농도별로 보면 대조구 67.1%에 비해 100U와 300U일 때 64.3%로 가장 낮고, 200U일 때 87.2%로 대조구에 비해 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 이상의 결과로부터, 돼지 난모세포의 성숙은 SOD 200U를 첨가 하였을 때 가장 효과적이었다.

항산화제로서 SOD는 거의 모든 동물조직에 분포하고 있으며(Thaete 등, 1985), superoxide anion radicals에 의한 세포손상에 대한 생물학적 방어체계로서 중요하다(Fridovich 등, 1983). SOD는 1) 생쥐 수정란의 2세포기 억제현상을 극복, 2) 생쥐 수정란의 배반포기까지 발육을 촉진(Goto 등, 1992; Noda 등, 1989), 3) 토끼의 수정란 발육촉진(Li와 Foote, 1993a) 등에 관여하며, 상세한 SOD의 작용에 대해서는 밝혀져 있지 않았지만, 이들 연구자들은 SOD가 배양액 중의 free radical을 중화 시켰기 때문에 배 발생이 향상되었다

고 추측하고 있다. 따라서 본 실험 결과에서도 SOD가 이와 같은 작용에 의해 특히 200U수준일 때 성숙이 촉진된 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of superoxid dismutase (SOD) on the rate of meiotic maturation of porcine oocyte

Concentration of SOD(U)	No. of oocytes examined	No. (%) of nuclear stage		
		GV	Met I ~ Met II	Met II
0	73	2(2.7)	71(97.3)	49(67.1) ^a
100	42	1(2.4)	41(97.6)	27(64.3) ^a
200	39	2(5.1)	37(94.9)	34(87.2) ^b
300	28	1(3.6)	27(96.4)	18(64.3) ^{ab}
400	30	0(0)	30(100)	22(73.3) ^{ab}
500	46	4(8.7)	42(91.3)	31(67.4) ^{ab}

Porcine oocyte were cultured for 48h in mTLP-PVA medium containing the various concentration of SOD, fixed for 24~48h and evaluated for the nuclear stages.

GV : germinal vesicle, Met I : first metaphase, Met II : second metaphase.

a, b Means with different letters are significantly different from each other($p < 0.05$).

2) 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1)형성에 미치는 catalase의 영향

Table 5에서 보는 바와 같이 미성숙난자인 GV 비율은 2.7~23.7% 범위였으며, catalase의 첨가 농도별로 보면 대조구 2.7%에 비해 150U일 때 11.4%로 가장 낮고, 250U일 때 23.7%로 가장 높았다. 감수분열을 재개한 난자인 M I ~ M II 비율은 76.3~97.3%였으며, catalase 농도별로 보면 대조구 97.3%에 비해 250U일 때 76.3%로 가장 낮았다. 이상의 결과로부터, catalase를 250U 이상 첨가하였을 때는 오히려 감수분열을 재개한 난모세포는 대조구에 비해 전체첨가구에서 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

성숙난자인 MII 비율은 41~67.1%로 대조구와 유사한 경향이었으며, catalase 농도별로 보면 대조구 67.1%에 비해 200U일 때 41%로 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 이상의 결과로부터 catalase 처리구에서 성숙율이 저하되는 경향이 시사되어 catalase는 돼지 난모세포의 성숙에 negative 작용을 하는 것으로 여겨졌다.

Table 5. Effect of catalase on the rate of meiotic maturation of porcine oocyte

Concentration of catalase(U)	No. of oocytes examined	No. (%) of nuclear stage		
		GV	Met I ~ Met II	Met II
0	73	2(2.7) ^b	71(97.3) ^b	49(67.1) ^b
50	40	7(17.5) ^a	33(82.5) ^a	26(65.0) ^{ab}
100	39	6(15.4) ^a	33(84.6) ^a	23(59.0) ^{ab}
150	44	5(11.4) ^a	39(88.6) ^a	21(47.7) ^{ab}
200	39	7(17.9) ^a	32(82.1) ^a	16(41.0) ^a
250	38	9(23.7) ^a	29(76.3) ^a	20(52.6) ^{ab}

Porcine oocyte were cultured for 48h in mTLP-PVA medium containing the various concentration of catalase , fixed for 24~48h and evaluated for the nuclear stages.

GV : germinal vesicle, Met I : first metaphase, Met II : second metaphase. a, b Means with different letters are significantly different from each other($p < 0.025$).

Catalase는 모든 동물 조직에서 발견되고 있으며 H_2O_2 를 H_2O 로 환원시켜 과산화 지질에 의한 세포손상을 방어하는 효소로 알려져 있다(Aebi 등, 1974). 그러나 catalase의 첨가는 생쥐와 토끼의 체외수정란 발육에 비효과적이었다(Li 등, 1993a; Legge 등, 1991). catalase를 첨가하였을 때 acrosome 방출의 효과 연구에 있어서도 23~53%로 무첨가구에 비해 효과가 없었고, 또한 정자 LPC(lysophosphatidyl choline)의 효과에서도 무처리구에 비해 첨체반응에 효과가 없었다고 Bize 등(1991)이 보고 하였으며 Miyazaki 등(1991)은 catalase 단독 처리시 토끼의 배란에 있어서 SOD 또는 SOD+catalase 처리구에 비해 효과가 없었다고 보고하여, 본 연구의 결과도 이들 연구자들의 견해와 일치하였고,

catalase는 돼지 난모세포의 성숙 과정에서 과산화 지질 등에 대한 방어기작이 없는 것으로 추측된다.

3) 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1)형성에 미치는 taurine의 영향

미성숙난자인 GV 비율은 2.4~6.5%였는데, taurine 농도별로 보면 대조구 2.7%에 비해 1.0mM일 때 2.4%로 가장 낮고, 7.0mM일 때 6.5%로 가장 높았다. 감수분열 재개한 MI~MII 비율은 93.5~97.6%였는데, taurine 농도별로 보면 대조구 97.3%에 비해 7.0mM일 때 93.5%로 가장 낮고, 1.0mM일 때 97.6%로 가장 높았다. 본 결과로부터 taurine을 첨가 하였을 때 대부분의 난모세포에서 90% 이상 감수분열이 재개되었다(Table 6).

성숙난자인 MII 비율은 61.9~86.8%였는데, taurine 농도별로 보면 대조구 67.1%에 비해 1.0mM일 때 61.9%로 가장 낮고, 2.5mM일 때 대조구에 비해 86.8%로 유의하게 높았다($p < 0.05$). 이상과 같이 taurine 농도 2.5mM 이상일 때 성숙율이 증가되어 taurine이 돼지 난모세포의 성숙에 유효하다는 것이 인정되었다.

Taurine은 성장한 포유동물 조직에 높은 농도로 존재하며 외부의 높은 삼투압으로부터 세포를 보호하는 삼투압조절인자이다(Shihabi 등, 1989; Uchida 등, 1991). taurine의 세포배양학상 중요한 역할은 세포나 수정란의 체외배양시 발생하는 독성물질의 중화와 삼투압 조절자로서 세포막 보호작용을 하며 더욱이 정제된 insulin receptors의 결합과 insulin의 생리학적 작용을 매개한다(Gaull 등, 1989; Maturo 등, 1988). 배발생에 있어서, 착상전 생쥐수정란에 대한 taurine의 기능이 규명되지는 않았지만, Dumoulin 등(1992)은 taurine이 자성생식기에 존재하는 높은 K^+ 농도와 산화작용으로부터 생쥐 수정란을 보호한다고 하였다. insulin 등에 의한 당대사 조절에도 관여한다고 사료되지만, 본 연구에서 taurine은 독성물질의 중화 및 삼투압을 조절하여 돼지 난모세포의 성숙에 적절한 조건을 부여한 것으로 추측되어 Gaull 등(1989)과 Maturo 등(1988)의 견해를 지지한다.

Table 6. Effect of taurine on the rate of meiotic maturation of porcine oocyte

Concentration of taurine(mM)	No. of ddcytes examined	No. (%) of nuclear stage		
		GV	Met I ~ Met II	Met II
0	73	2(2.7)	71(97.3)	49(67.1) ^a
1.0	42	1(2.4)	41(97.6)	26(61.9) ^a
2.5	38	2(5.3)	36(94.7)	33(86.8) ^b
4.0	33	2(6.1)	31(93.9)	23(69.7) ^{ab}
5.5	38	1(2.6)	37(97.4)	26(68.4) ^{ab}
7.0	46	3(6.5)	43(93.5)	34(73.9) ^{ab}

Porcine oocyte were cultured for 48h in mTLP-PVA medium containing the various concentration of catalase , fixed for 24~48h and evaluated for the nuclear stages.

GV : germinal vesicle, Met I : first metaphase, Ana I : first anaphase, Met II : second metaphase. a, b Means with different letters are significantly different from each other($p < 0.05$).

4) 항산화제가 제2감수분열 중기에 미치는 영향

본연구 결과를 종합해 보면, 돼지 난모세포의 제2감수분열 중기에 미치는 영향은 대조구 67.1%에 비해 SOD 87.2% 및 taurine 86%로 유의하게 난모세포의 핵성숙을 높게 촉진시켰으며($p < 0.05$), catalase는 60%로 대조구와 유사한 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 SOD 와 taurine 처리시 Yoshida 등 (1989)의 77.2%~81.8%와 유사한 성숙율을 보이고 있다(Figure 4). 이들 항산화제는, (1) Free radical 및 독성물질의 중화, (2) 배양액의 삼투압 조절, (3) 당대사 촉진 및 세포막 보호 작용의 기능이 있는 것으로 추측된다.

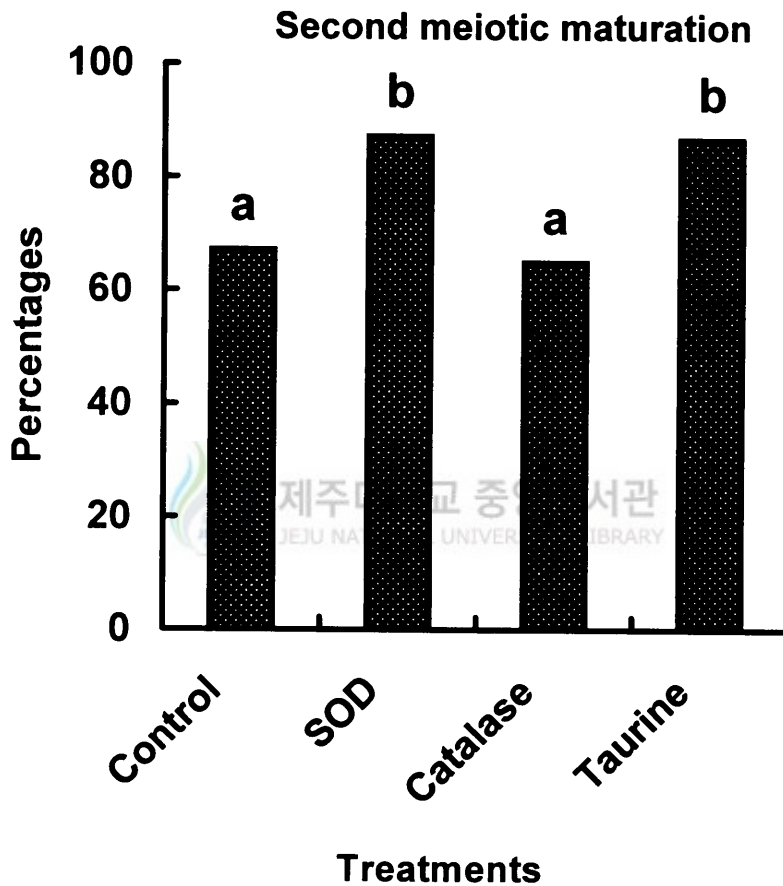
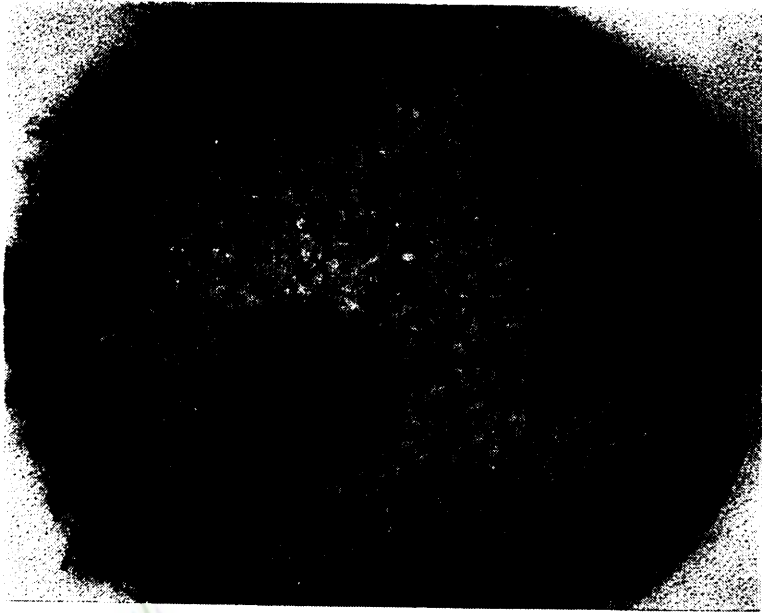


Figure 4. Effect of anti-oxidants on the second meiotic maturation of porcine oocytes. a, b Means with different letters are significantly different from each other($p < 0.05$).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



Figure 5. Processes of nuclear maturation of porcine oocytes.
A: Germinal vesicle (GV) before culture.
Arrow shows the intact nuclear membrane.
B: First metaphase stage 48h after culture.
Arrow shows the metaphase chromosome plate.

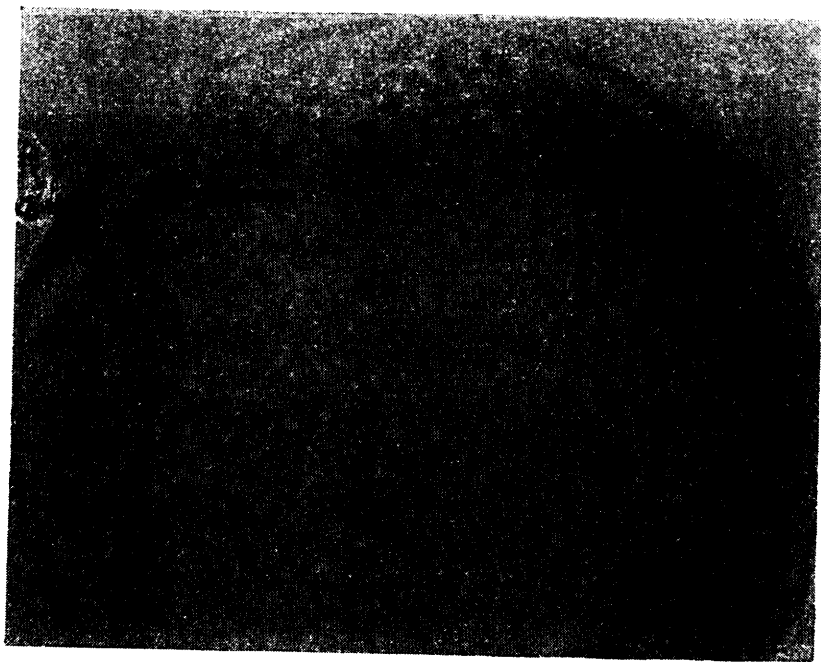
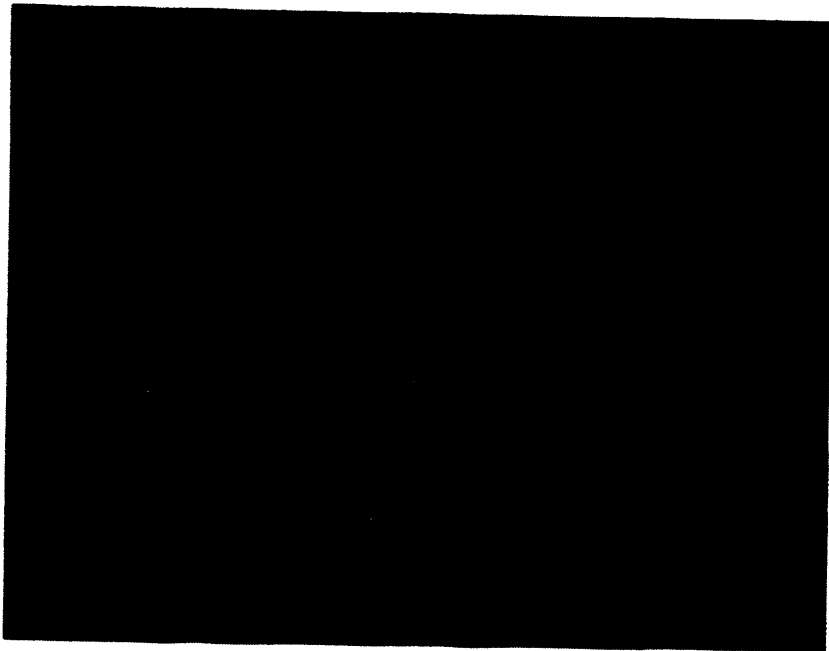


Figure 6. A: First anaphase stage indicating separated chromosome plate.

B: Second metaphase showing the expulsion of first polar body (Pb1) into perivitelline space. This oocyte was considered as complete maturation. Arrow shows the plate chromosome.

2. 항산화제 처리에 의한 난모세포 생존성 분석

1) 항산화제 처리에 의한 난모세포 생존성 분석(CellTiter AQ System): 항산화제를 처리한 난모세포를 성숙배양 48시간 후 CellTiter AQ System에서 측정했을 때 생존율은 대조구 0.453 Absorbance 450nm 에 비해 SOD 0.054, taurine 0.050으로 유의한 경향 이었으나, SOD 에 비해 catalase는 0.038로 유의하게 낮았다($p < 0.05$, Figure 7).

2) 항산화제 처리에 의한 난모세포 생존성 분석(CFDA) : 항산화제를 처리한 난모세포를 성숙배양 48시간 후 CFDA 에서 측정했을 때(Figure 10) 생존율은 대조구 mean score 2.3 에 비해 SOD 4.1, taurine 4.0으로 유의하게 높았으나 ($p < 0.025$) 대조구에 비해 catalase는 2.2로 유의차가 인정되지 않았다(Figure 8).

김 등(1997)은 소의 미성숙 난포란을 FDA 회석비율에 따라 제2감수분열중기를 기준으로 체외성숙을 판정한바 71.1%~92.5%의 성숙율을 나타낸 것과 비교해 볼 때 본 실험에서 나타난 SOD와 taurine 처리구에서는 각각 81.7%와 79.9%로 비슷한 성숙율을 나타냈으나 대조구와 catalase 처리구는 다소 낮은 경향을 보였다.

3) CellTiter AQ System 과 CFDA 에 의한 생존성비교 분석 : CFDA 와 CellTiter AQ System에서 측정 했을 때 대조구는 각각 2.3과 0.453에 비해 SOD는 4.1 과 0.054, taurine은 4.0 과 0.050 으로 높았으나 catalase는 2.2와 0.038로 낮았다(Figure 9). 따라서 SOD 및 taurine에서 생존율이 높았음이 시사되었다

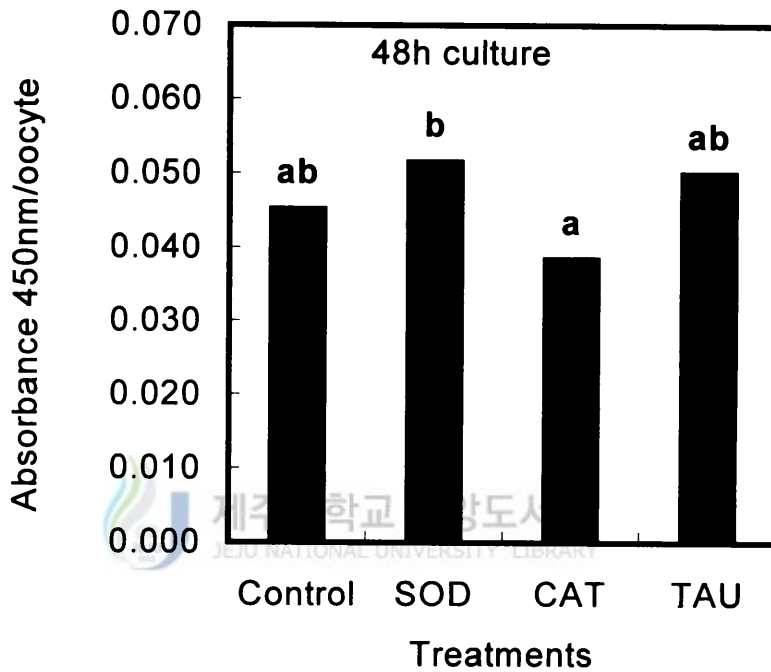


Figure 7. Effects of antioxidants on the viability of porcine oocytes. Oocytes cultured for 48h were reacted with MTS (PMS) and assayed using the CellTiter AQ System. a, b: Means with different letters are significantly different from each other ($p < 0.05$)

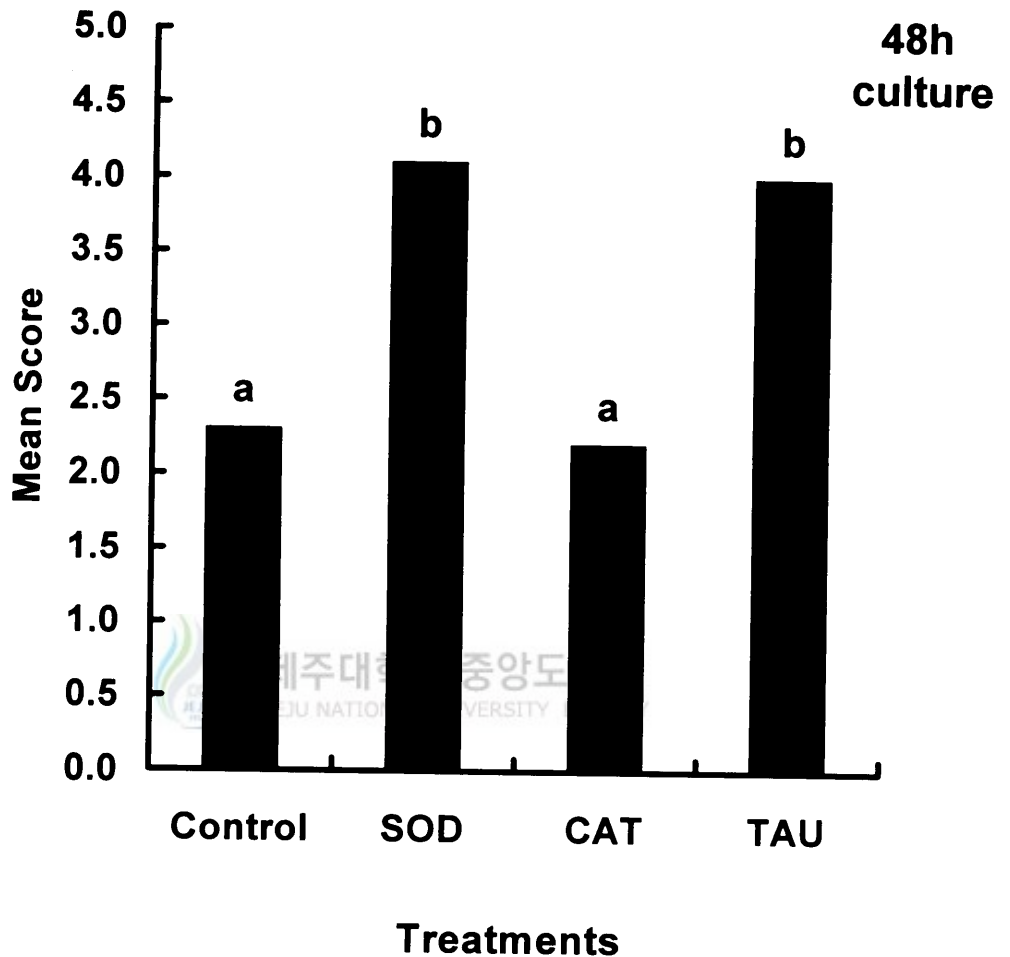


Figure 8. Effects of antioxidants on the viability of porcine oocytes. Oocytes cultured for 48h were treated with CFDA (carboxyfluorescein diacetate) for 10 min and observed on fluorescence microscopy at magnification of 40 and 200. a, b: Means with different letters are significantly different from each other($p < 0.025$).

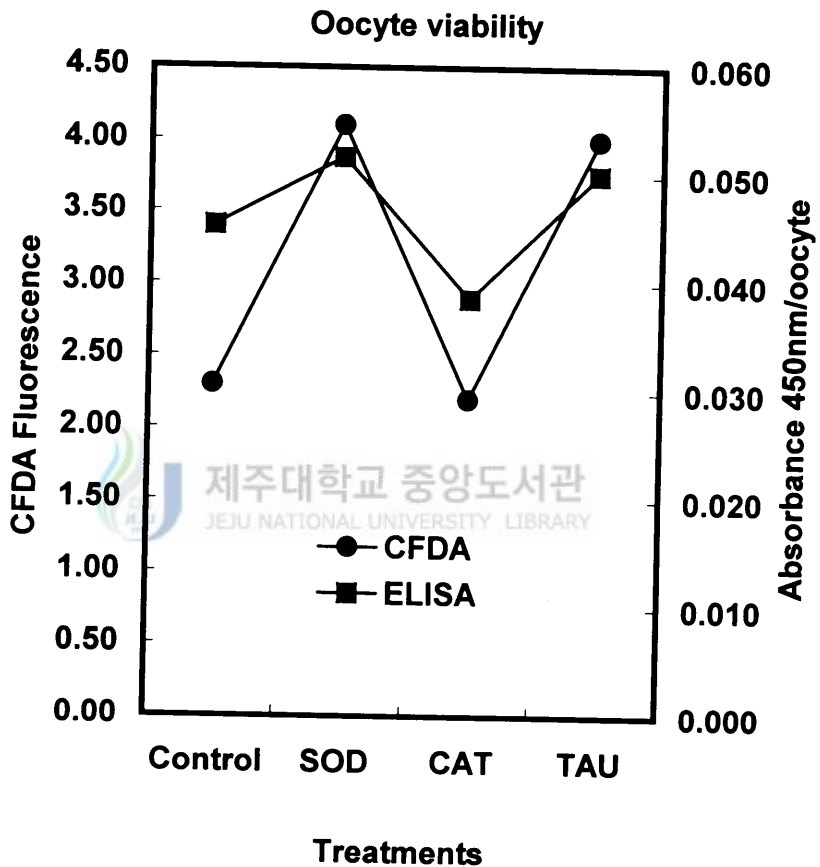


Figure 9. Comparison of viability of porcine oocytes measured using CellTiter AQ System and assayed with CFDA-test.

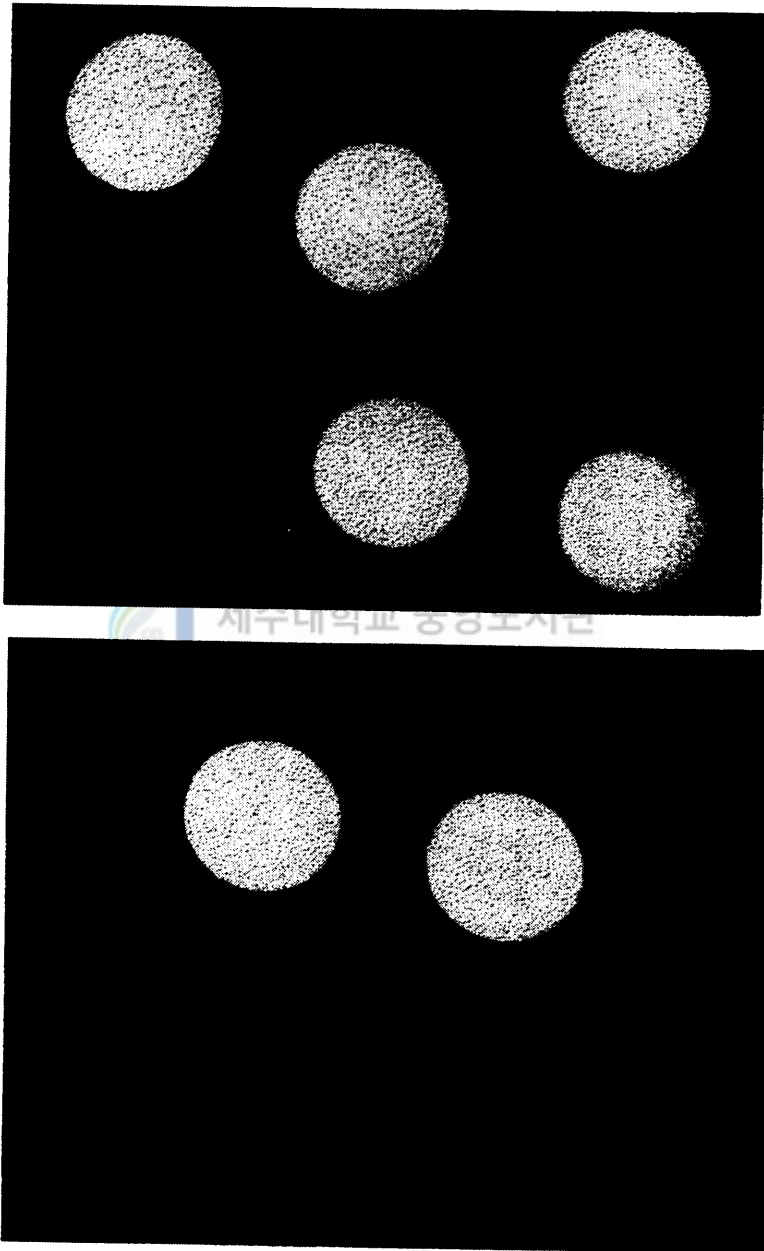


Figure 10. Fluorescing oocyte culture for 48h.
DO: dead oocyte.

3. mTALP-PVA 배양액을 이용한 체외수정율

수정 후 18시간에 수정란을 ethanol+acetic acid(3:1)로 2~3일간 고정 한 후, 1% orcein 염색액으로 염색하여 위상차현미경으로 관찰하였다. 성숙된 난모 세포중에서 정자두부 또는 응성전핵(미부일치)이 관찰된 경우, 정자침입란으로 하고, 난자내에 침입한 정자가 1개인 경우 단정자수정란으로 하였으며, 미부가 일치하는 전핵을 응성전핵 형성란으로 판정하였다(Fig. 11, 12, 13).

mTALP-PVA 배양액을 사용한 체외수정율을 기본배양액에서 성숙시킨 난모세포의 체외수정율을 조사한 결과(Table. 7)를 보면 자성전핵 형성을 71.2%, 다란핵 형성 6.3%, 정자침입 94.6%, 다정자침입 62.9%, 응성전핵형성 54.3%로 나타났으며, 정상수정율은 22.9%, 발생가능난은 11.4%였다. 이와 같은 결과는 Yoshida 등(1993)의 정자침입 78%와 정상수정율 43%에 비교해 볼 때 정자침입율은 94.6%로 높은 성적을 보였으나 정상수정율은 조금 떨어지는 결과를 보였다.

Table 7. Result of the in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro

Examination Item	Calculating Formula		%
No. of examined oocytes	52		
Matured Oocytes	37	52	71.2
Oocytes with Female Pronucleus	32	37	86.5
Oocytes with Polygeny	2	32	6.30
Penetrated Oocytes	35	37	94.6
Polyspermy	22	35	62.9
Oocytes with Male Pronucleus	19	35	54.3
No. of Fertilized Eggs	8/35 :	22.90%	
Eggs with Developmental Capability	4/35 :	11.40%	

oocytes were matured for 46h, inseminated with fresh boar semen for 6h, subsequently further cultured for 12h and finally fixed with acetic alcohol.

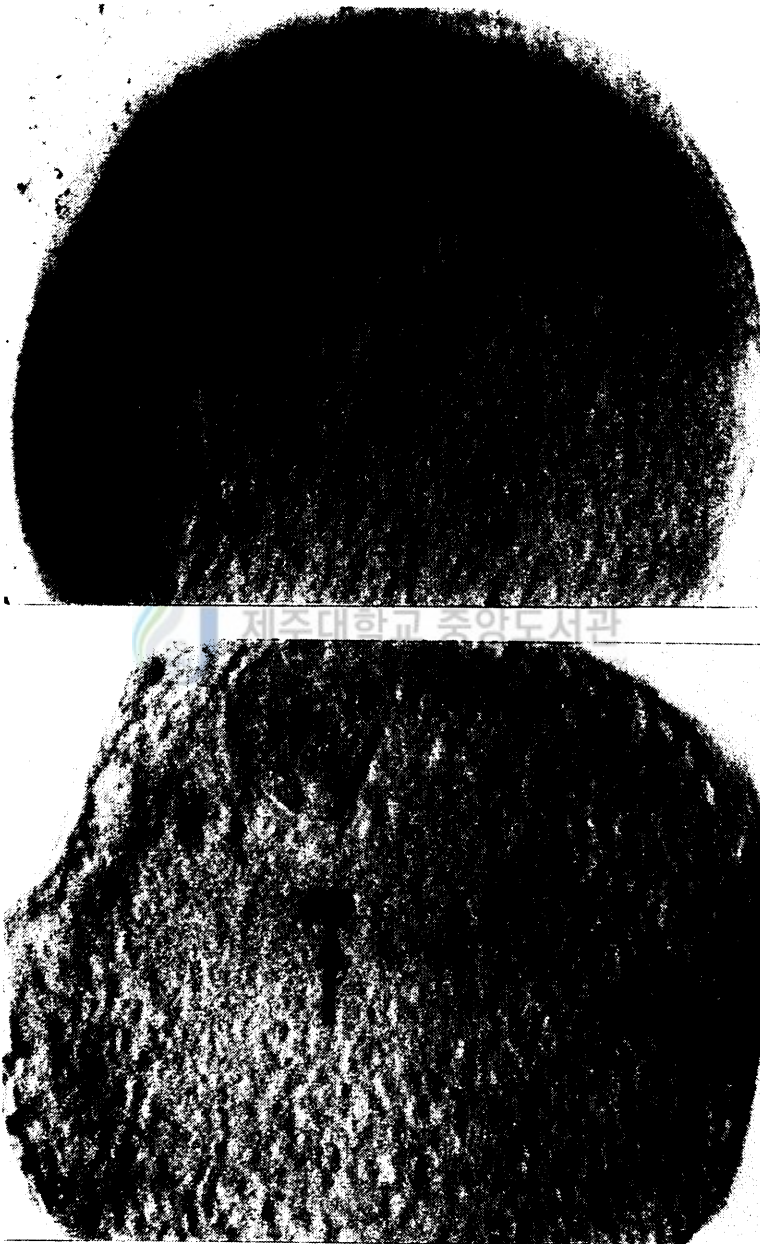


Figure 11. oocyte 18h after insemination.

A: Intact sperm head, B: Decondensing sperm head.

Arrow shows the sperm head, FP: Female pronuclei.

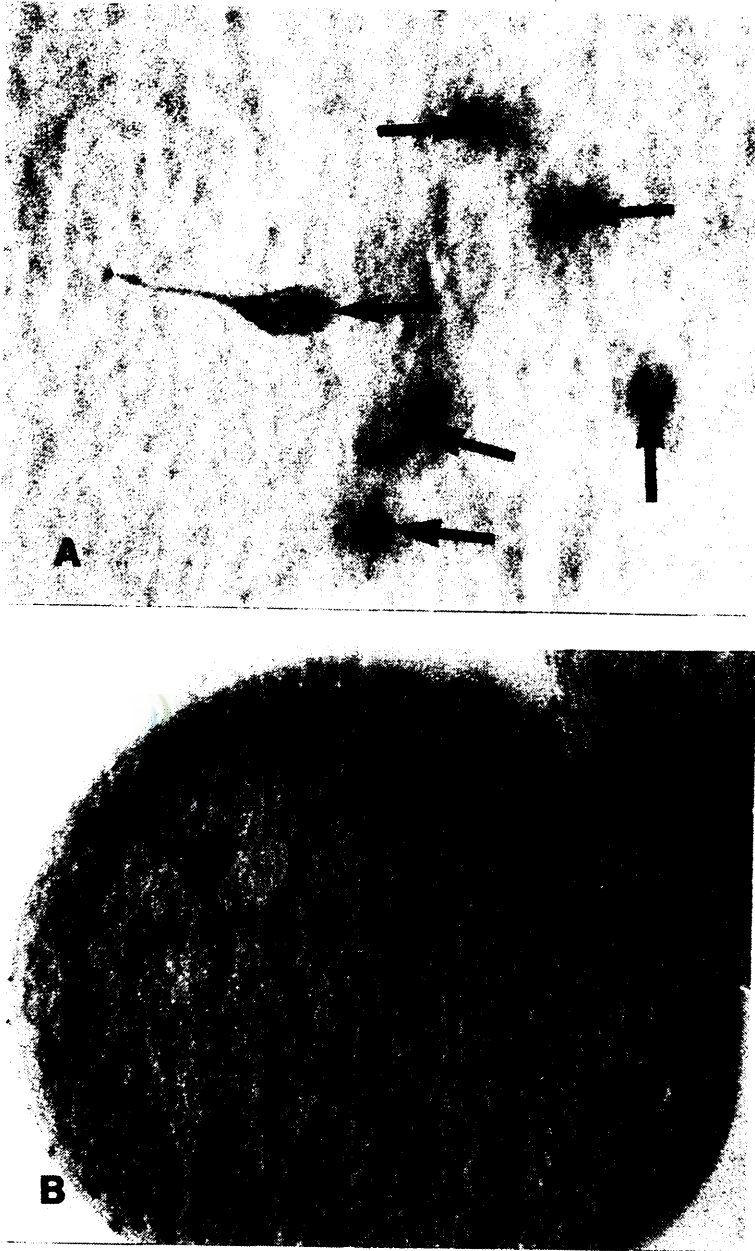


Figure 12. oocyte 18h after insemination.

A: Decondensing sperm head.

B: Female and male pronucleus, showing the normal fertilization.

Arrow: sperm head, FP: Female pronuclei.

Pb1: first polar body . Pb2: second polar body.

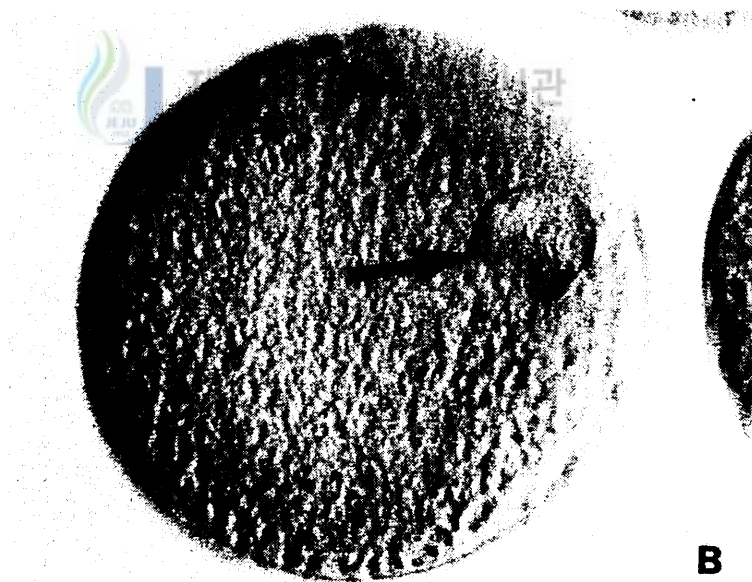
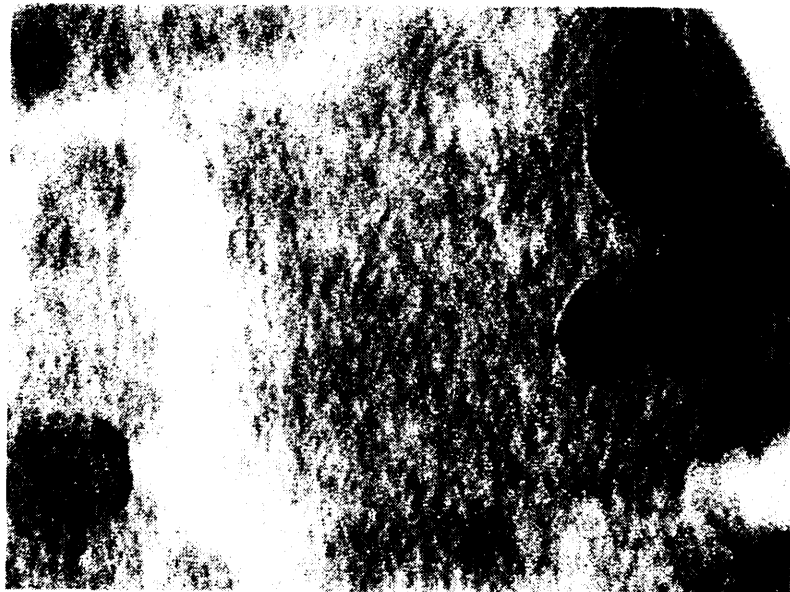


Figure 13. oocyte 18h after insemination.

A: oocyte showing the polygeny.

B: fertilized egg showing the fusion of Female and male pronucleus.

FP: Female pronuclei, Arrow: fused pronucleus.

V. 摘 要

본 연구는 정상적인 수정란을 대량생산 할 목적으로 mTLP-PVA 배양액에 항산화제 SOD, catalase, taurine을 첨가하여 배양하였을 때 난모세포의 체외성숙율, CellTite AQ System 과 CFDA에 의한 생존율 및 mTALP-PVA 배양액에 대한 체외수정율을 조사 하였다.

1. 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1)형성에 미치는 SOD의 영향 : 미성숙 난자인 GV 비율은 0~8.7% 범위였으며, SOD 농도별로 보면 대조구 2.7%에 비해 400U일 때 0%로 가장 낮고, 500U일 때 8.7%로 가장 높았다. 한편, 감수분열을 재개한 난자, 즉 MI~MII 비율은 91.3~100% 범위였으며, SOD 농도별로 보면 대조구 97.3%에 비해 500U 일때 91.3%로 가장 낮고, 400U일 때 100%로 가장 높았다. 이상의 결과로부터, 감수분열 재개는 SOD 400U를 사용 하였을 때가 가장 유효한 것으로 조사되었다.

극체를 방출하여 완전히 성숙을 완료한 난자, 즉 MII 비율은 64.3~87.2% 범위였으며, SOD 농도별로 보면 대조구 67.1%에 비해 100U와 300U일 때 64.3%로 가장 낮고, 200U일 때 87.2%로 대조구에 비해 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 이상의 결과로부터, 돼지 난모세포의 성숙은 SOD 200U를 첨가하였을 때 가장 효과적이었다.

2. 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1)형성에 미치는 catalase의 영향 : 미성숙난자인 GV 비율은 2.7~23.7% 범위였으며, catalase 첨가 농도별로 보면 대조구 2.7%에 비해 150U일 때 11.4%로 가장 낮고, 250U일 때 23.7%로 가장 높았다. 감수분열을 재개한 난자인 MI~MII 비율은 76.3~97.3%였으며, catalase 농도별로 보면 대조구 97.3%에 비해 250U일 때 76.3%로 가장 낮았다. 이상의 결과로부터, catalase를 첨가하였을 때는 오히려 감수분열을 재개한 난모세포는 대조구에 비해 전체첨가구에서 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$).

성숙난자인 MII 비율은 41~67.1%로 대조구와 유사한 경향이였으며, catalase 농도별로 보면 대조구 67.1%에 비해 200U일 때 41%로 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$). 이상의 결과로부터 성숙율이 저하되는 경향이 시사되어 catalase는 돼지 난모세포의 성숙에 negative 작용을 하는 것으로 시사되었다.

3. 난모세포의 감수분열 재개(GVBD) 및 극체(PB1)형성에 미치는 taurine의 영향 : 미성숙난자인 GV 비율은 2.4~6.5%였는데, taurine 농도별로 보면

대조구 2.7%에 비해 1.0mM일 때 2.4%로 가장 낮고, 7.0mM일 때 6.5%로 가장 높았다. 감수분열 재개한 M I ~ M II 비율은 93.5~97.6%였는데, taurine 농도별로 보면 대조구 97.3%에 비해 7.0mM일 때 93.5%로 가장 낮고, 1.0mM일 때 97.6%로 가장 높았다. 본 결과에서 taurine을 첨가하였을 때 대부분의 난모세포에서 감수분열이 재개되었다.

성숙난자인 M II 비율은 61.9~86.8였는데, taurine 농도별로 보면 대조구 67.1%에 비해 1.0mM일 때 61.9%로 가장 낮고, 2.5mM일 때 대조구에 비해 86.8%로 유의하게 높았다($p < 0.05$).

4. 항산화제가 제2감수분열 중기에 미치는 영향 : 돼지 난모세포의 제 2감수분열 중기에 미치는 영향은 대조구 67.1%에 비해 SOD 87.2% 및 taurine 86%로 유의하게 난모세포의 핵성숙을 높게 촉진시켰으며($p < 0.05$) catalase는 60%로 대조구와 유사한 경향을 보였다.

5. 항산화제 처리에 의한 난모세포 생존성 분석(CellTiter AQ System) : 항산화제를 처리한 난모세포를 CellTiter AQ System에서 측정했을 때 생존율은 대조구 0.453 Absorbance 450nm에 비해 SOD 0.054와 taurine은 0.050으로 유의한 경향이었으나($p < 0.05$), SOD에 비해 catalase는 0.038로 유의하게 낮았다.

6. 항산화제 처리에 의한 난모세포 생존성 분석(CFDA) : 항산화제를 처리한 난모세포를 CFDA에서 측정했을 때 생존율은 대조구 mean score 2.3에 비해 SOD는 4.1과 taurine은 4.0으로 유의하게 높았으나($p < 0.025$), 대조구에 비해 catalase는 2.2로 유의차가 인정되지 않았다.

7. CellTiter AQ System 과 CFDA 에 의한 생존성비교 분석 : CFDA 와 CellTiter AQ System에서 측정 했을 때 대조구는 각각 2.3과 0.453에 비해 SOD 는 4.1과 0.054, taurine은 4.0과 0.050으로 높았으나 catalase는 2.2와, 0.038 로 낮았다. 따라서 SOD 및 taurine에서 생존율 향상이 시사되었다.

8. mTALP-PVA 배양액을 사용한 체외수정율 : 자성전핵 형성을 71.2%, 다란핵 형성 6.3%, 정자침입 94.6%, 다정자침입 62.9%, 융성전핵 형성 54.3%로 나타났으며, 이에 비해 정상수정율은 22.9%, 발생가능난은 11.4%였다.

參 考 文 獻

1. Aevi, H. 1974. Catalase. In "Methods of enzymic analysis" Hans. Ulrich. Bergmeyer(eds). pp. 73.
2. Austin, C. R., Braden. A. W. H. 1956. Early reactions of the rodent eggs to spermatozoon penetration. J. Exp. Biol. 33 : 358 ~ 365.
3. Barros. C., Yanagimachi, R. 1972. Polyspermy preventing mechanisms in the golden hamster egg. J. Exp. Zool. 180 : 251 ~ 266.
4. Berg. U. and G. Brem. 1990. Development rates of in vitro produced IVM-IVF bovine oocytes in different cell co-culture systems. Theriogenology, 33 : 195 Abstr.
5. Calvin, H. I., Grosshans, K., Blake, E. J. 1986. Estimation and manipulation of glutathion levels in prepuberal mouse ovaries and ova : relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. Gamete. Res. 14 : 265~275.
6. Cheng, W. T. K. 1985. In vitro fertilization of farm animal oocytes. Ph. D. Thesis. Cambridge, Council for National Academic Awards. London.
7. Cherr, G. N., Drobnis, E. Z., Katz, D. F. 1988. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster eggs. J. Exp. Zool. 246 : 81~93.
8. Corsby, I. M. and F. Gandolfi. 1988. Contral of protein synthesis during cleavage of sheep embroyos. J. Reprod. Fert. 82 : 769~775.
9. Cran, D. G., Moor, R. M., Hay, M. F. 1980. Fine structure of

- the sheep oocyte during antral follicle development. *J. Reprod. Fertil.* 59 : 125~132.
10. Cran, D. G., Cheng, W. T. K. 1985. Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. *Gamete. Res.* 11 : 311~319.
 11. Cran, D. G. and Cheng, W. T. K. 1986. The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Gamete Res.* 13, 241-251
 12. Cran, D. G. 1989. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 38 : 49~62.
 13. Cran, D. G., Esper, C. R. 1990. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 42 : 177~188.
 14. Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalberg, J., Rangarajan, S. 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev. Biol.* 130 : 184~197.
 15. Ducibella, T., Kurasawa, S., Rangarajan, S., Kopf, G. S. and Schultz, R. M. 1990. Precocious loss of cortical granules during mouse oocytes meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev. Biol.* 137, 46~55.
 16. Dumoulin, J. C. M., J. L. H. Evers., M. Bras., M. H. E. C. Pieters and J. P. M. Geraedts. 1992. Positive effect of taurine on preimplantation mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 94:373~380.
 17. Edward, R. G. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow,



- pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. London., 203 : 349~351.
18. Eng, L. A., E. T. Konegay, J. Huntington and T. Wellman. 1986. Effects incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 76 : 657~662.
 19. Foote, W. D., Thibault, C. 1969. Recherches experimentales sur la maturation in vitro des oocytes de truie et de veau. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 9 : 329~349.
 20. Fridovich, I. 1983. Superoxide dismutase : An endogenous toxicant. *Annu. Rev. Toxicol.* 23 : 239~257.
 21. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured fertilized and cultured with cumulus cell in vitro on to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42 : 114~119.
 22. Fulka, J. J. R. 1983. Nuclear maturation in pig and rabbit oocytes after interspecific fusion. *Exp. Cell. Res.* 146 :
 23. Fulka, J. J. R., Flechon, J. E., Motlik, J., Fulka, J. 1988. Dose autocatalytic amplification of maturation-promoting factor (MPF) exist in mammalian oocytes? *Gamete. Res.* 21 : 185~192.
 24. Gaull, G.E. 1989. Taurine in pediatric nutrition : Review and update. *Pediatrics.* 83 : 433~442.
 25. Goto, Y., . Kajihara, Y., S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83 : 753~

758.

26. Goto, Y., Y. Noda., K Narimoto., Y. Umaoka and T. Mori. 1992. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radical Biol. & Med.* 13 : 47~53.
27. Guraya, S. S. 1983. Recent progress in the stucture, origin, composition, and function of cortical granules in animal egg. *Int. Rev. Cytol.* 75 : 257~360.
28. Hashimoto, N., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 126 : 242~252.
29. Hunter, R. H. F. and C. Polge. 1966. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotropin. *J. Reprod. Fert.*, 12 : 525~531.
30. Hunter, R. H. F. 1967. The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 13 : 133~147.
31. Hunter, R. H. F., Cook, B., Baker, T. C. 1976. Dissociation of respose to injected gonadotropin between the grafian follicle and oocyte in pigs. *Nature (Lond)*. 260 : 156~158.
32. Hunter, R. H. F. 1990. Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 40(Suppl.) : 211~226.
33. Joenje, H. 1989. Genetic toxicology of oxygen. *Mut. Res.* 1219 : 193~208.
34. Bize, I., G. Santander, P. Cabello, D. Driscoll and C. Sharpec. 1991. Hydrogen peroxide is nivolved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol. Reprod.* 44 : 398~403.

35. Kishimoto, 1989. 分裂期における細胞周期の調節機構: 蛋白, 核酸, 酵素. 34 : 1599~159.
36. Kruip, T. A., Cran, D. G., Van Beneden, T. H., Dieleman., S. J. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete. Res.* 8 : 29~47.
37. Legge, M. and M. H. Sellens. 1991. free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.* 6 : 867~871.
38. Li, J. R. H. Foote and M. Simkin. 1993a. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 49 : 33~37.
39. Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *Vet. Rec.*, 122 : 539~540.
40. Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeati, G. and Serene, E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31, 1201~1207.
41. Mattioli, M., Bacci, M. L., Galeati, G. and Seren, E. 1991. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 36, 95~105.
42. Maturo, J. and E. C. Kulakowski. 1988. Taurine binding to the purified insulin receptor. *Biochem. Pharmacol.* 37 : 3755~3760.
43. McGaughey, R. W. and Polge, C. 1971. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured in vitro. *J. Exp. Zool.* 176, 383~396.

44. McGaughev, R. W. 1978. In vitro oocyte maturation. In Daniel, JCJR(ed). "Methods in mammalian reproduction." New York : Academic. Press. pp. 1~19.
45. Meinecke, B., Meinecke-Tillmann, S. 1979. Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured in vitro. *Theriogenology*. 11 : 351~365.
46. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 711~760.
47. Miyazaki, T. S., K. Dharmarajan, S. J. Atlas, G. B. Bulkley and E. E. Wallach. 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.
48. Motlik, J. and Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25, 87~96.
49. Motlik, J., Crozet, N. and Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72 : 323~328.
50. Nagai, T., Niwa, K. and Iritani, A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 70, 271~275.
51. Nagai, T., Takahashj, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S., Hanada, A. 1988. In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 84 : 585~591.
52. Nagai, T., Takahashj, T., Shioya, Y. and Dguri, N. 1990.

Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology* 34, 195~204.

53. Okada, A., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. 1986. Development of a cortical granule-free area of cortex and the perivitelline space in the hamster oocyte during maturation and following ovulation. *J. Submicrosc. Cytol.* 18 : 233~247.
54. Perreault, S. D., Barbee, R. R., Siott, V. L. 1988b. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 125 : 181~186.
55. Perreault, S. D., 1990. Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. In Bavister, B. D., Cummi "Fertilization in mammals." Massachusetts : Serono Symposia, USA. pp. 285~296.
56. Pincus, G. and Enzmann, E. V. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. 1. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* 62, 665~675.
57. Sato, E., Iritani, A. and Nishikawa, Y. 1978. Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Zotech. Sci.* 49 : 400~405.
58. Tateno, H., Mikamo, K. 1987. A chromosomal method to distinguish between X-and Y-bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova. *J. Reprod. Fertil.* 81 : 119~125.
59. Thompson, J. G. E., A. C. Simpson., P. A. Pugh., P. E. Donnelly. and H. R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 89 : 573~ 578.



60. Umoako, Y., Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mor. Reprod. Dev.* 31 : 28~33.
61. Waymouth, C. 1959. Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929(strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB 752/1). *J. Nat. Canar. Inst.* 22 : 1003~1017.
62. Yoshida, M., Bamba, K. and Kojima, Y. 1989. Effects of gonadotropins and estradiol-17B on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35, 86~91.
63. Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Kawagishi, H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 88, 1~8.
64. Yoshida, M., Ishigaki, K. and Pursel, V. G. 1992. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 68~71.
65. Yoshida, M., Y. Mizoguchi, K. Ishizaki, T. Kojima and T. Nagai. 1993. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 39 : 1303~1311.
66. Zamboni, L., Thompson, R. S. 1972. Fine morphology of human oocyte maturation In vitro. *Biol. Reprod.* 7 : 425~457.
67. 강승률. 1996. 돼지 난모세포의 체외성숙에 대한 연구. 일본 信州大 박사학위 논문
68. 김영훈, 김중계. 1996. 돼지 미성숙난포란의 유리화동결 용해후 FDA 처리가 체외수정과 배발육에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*. 11(3):233-240.

69. 김중계, 양병철, 강민수, 고경래, 고혁진, 장덕지. 1995. 소. 돼지 미성숙 난포란의유리 화동결 융해후 FDA처리가 체외수정과 배 발육에 미치는 영향. 한국수정란 이식 학회지. 10(3):183-191.
70. 김중계, 박세필. 1997. FDA를 이용한 소 난포란의판정. 한국가축번식학회지. 21(3):211-217.
71. 채범석 . 1995. 생화학. 서울외국서적.



感謝의 글

본 論文이 결실을 맺을 수 있도록 격려와 정성으로 지도하여 주신 康珉秀 教授님께 感謝드리며 바쁘신 중에도 審査를 맡아 지도를 베풀어 주신 金重桂 教授님, 梁榮勳 教授님께 眞心으로 감사드립니다.

그리고 늘 깊은 관심을 가지고 격려와 조언을 해주신 李賢鍾 教授님, 康太淑 教授님, 金圭鎔 教授님, 金文哲 教授님께도 심심한 감사를 드립니다.

본 논문의 실험수행과 자료정리에 많은 도움을 준 제주농업시험장 康承律 박사님, 제주대학교 姜奉均 박사님께 감사드리며, 실험수행에 많은 도움을 준 김현호, 박지훈의 실험실 후배와 농과대학 선생님들께 고마움을 전합니다.

그리고 불편하신 몸에도 불구하고 보살펴 주시는 어머니, 외할머니, 형님과 형수님, 조카 대훈이. 늘 불평없이 함께 해준 사랑하는 아내와 아들 대현이와 보람을 함께 나누고자 합니다.



1998년 12월