

**β -Mercaptoethanol과 Cysteamine 첨가와
소 난관상피세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육과
세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향**

박동현 · 양부근 · 김준국 · 정희태 · 박춘근 · 김종복 · 김정익
강원대학교 축산대학

**Effect of β -Mercaptoethanol and Cysteamine with Bovine
Oviduct Epithelial Cells on Development and Intracellular
Glutathione Concentrations of Bovine IVM/IVF Embryos**

D. H. Park, B. K. Yang, J. K. Kim, H. T. Choung, C. K. Park, J. B. Kim and C. I. Kim
College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

The objective of this study was to investigate the effects of thiol compounds with bovine oviduct epithelial cells(BOEC) co-culture on development and intracellular glutathione(GSH) concentrations of bovine embryos derived from IVM /IVF oocytes.

In experiment 1 and 2, embryos developed to 2~8 cell stage after *in vitro* fertilization were co-cultured with BOEC in CR_{1aa} with or without β -mercaptoethanol(β -ME) and cysteamine. The percentage of embryos that developed to morulae and blastocysts in 0, 10, 25 and 50 μ M β -ME with BOEC was 48.1, 64.0, 72.9 and 75.9%, respectively. Twenty-five and 50 μ M β -ME groups were significantly higher than in 0 and 10 μ M β -ME groups($P < 0.05$). And the proportion of embryos that developed to morulae and blastocysts in 0, 25, 50 and 75 μ M cysteamine with BOEC was 50.0, 53.2, 72.0 and 66.7%, respectively. Fifty μ M cysteamine group was significantly higher than any other groups ($P < 0.05$).

In experiment 3 and 4, the intracellular GSH concentrations of blastocyst embryos in CR_{4aa} with 0 and 50 μ M β -ME or cysteamine were 68.5, 77.8, 78.7 and 80.0pM, respectively. Fifty μ M β -ME group was significantly higher than that of control($P < 0.05$), but cysteamine group was not.

Cell numbers of blastocysts were not difference in all experimental groups. These experiments indicate that β -ME and cysteamine with BOEC co-culture can affect the development and intracellular GSH concentrations of bovine embryos produced by IVM /IVF oocytes.

(Key word : β -Mercaptoethanol, Cysteamine, Glutathione, IVM /IVF embryos, BOEC)

서 론

체외수정란의 대량생산과 체외배양 기술에 대한 체계의 확립은 수정란 이식 기술의 실용화, 핵이식에 의한 복제개체의 생산 및 유전자이식 등의 기술을 향상시킬 수 있어 가축의 생산성을 증진시키고, 암가축의 잠재적 번식능력을 효율적으로 이용할 수 있지만, 아직까지는 체외에서 회수된 난포란을 체외수정 후 배반포까지 발육시키는 체외배양기술에 요구되는 여러가지 요인들이 명확하게 밝혀지지 않았으며, 체외수정란의 체외배양시 종 특이적인 발육억제현상이 일어나 체외수정란의 다수 확보가 어려운 실정이다.

이와같은 체외발육억제 현상을 극복하기 위하여, 최근에는 배양액에 성장인자의 첨가, 발정우 혈청 첨가, 항산화제 첨가배양과 소의 난관상피세포(Elington 등, 1990 ; Kim 등, 1990), 난구세포(Goto 등 1988), buffalo rat 간세포(Hernandez-Ledezma 등, 1993) 및 생쥐 배아섬유아세포(Takahashi 등, 1995)등과 같은 체세포와 공동배양하여 체외 발육율을 향상시키고 있다.

체세포와의 공동배양 효과는 세포를 자극하여 유사분열을 하도록 촉진하는 물질인 성장인자들과 거대분자와 같은 여러가지 유사분열 물질을 분비하여 체외수정란의 발육에 적합하지 않은 발육조건을 변형시키거나, 배양액에서 생성되는 유해물질을 제거하여 수정란의 활력을 증가시키는 것으로 보고되고 있지만, 기작은 명확하게 밝혀지지 않고 있다(Bavister 등, 1992 ; McCaffery 등, 1991).

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 40~44시간 후에 생산된 2~8세포기 수정란을 체외배양액인 CR_{1aa}와 BOEC 공동배양에 thiol 화합물인 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 일정량 첨가하여 초기배 수정란의 체외발육에 미치는 영향과 배반포 수정란의 세포내 glutathione농도에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙 배양

도살장에서 회수한 소의 난소는 2시간 이내에 멸균 생리식염수(25~28℃)에 침적하여 실험실로 운반한 후, 직경이 2~7mm의 난포로부터 18 gauge 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입채취하여 미성숙 난자를 채취하였다. 채취된 난포란은 실제현미경하에서 난자 주위의 난구세포가 균일하게 둘러싸여 있는 것만을 선별하여 난소운반액(PBS-PVA)과 난자 성숙용 배양액(TC-199)으로 각각 2회 세척후 성숙배양에 이용하였다. 난포란의 성숙배양을 위하여 TC-199배양액에 10% 자우혈청(fetal bovine serum)과 호르몬(FSH 0.5 μ g/ml, LH 5 μ g/ml 및 Estradiol 1 μ g/ml)이 함유된 성숙배양액을 만든 후, 100 μ l의 소적을 만들어 멸균된 mineral oil로 피복하여 배양 2~3시간 전에 5% CO₂와 고습도의 가스조건 및 39℃의 온도조건에서 평형시키고, 각 소적 배양액에 15개의 난포란을 넣어 20~22시간 배양하여 성숙된 난포란을 선별한 후 각 실험에 공용하였다.

2. 난포란의 체외수정

동결정액(0.5ml)을 37℃의 항온수조에서 30초~1분간 용해한 후 Brackett와 Oliphant배양액(BO 배양액, 1975)에 10mM caffeine이 함유된 배양액과 혼합, 원심분리(1,500 rpm, 10분)로 2회 세척후 정자의 농도가 2.5×10^6 정자/ml가 되도록 정자 부유액을 준비하였다.

체외수정액은 BO배양액에 20 μ g/ml heparin과 20mg/ml bovine serum albumin(BSA)을 첨가해 배양접시내에 50 μ l의 소적을 만든 후 mineral oil로 피복하여 난포란의 성숙배양과 동일한 방법으로 2~3시간 평형시켰다. 체외에서 성숙배양한 난포란을 선별하여 난포란의 성숙배양액과 체외수정 배양액으로 각각 1회 세척후, 10개씩의 난포란을 소적의 체외배양액에 옮긴 후 상기 방법으로 준비한 정액 50 μ l를 수정배양액내에 첨가해 체외수정을 실시하였다. 체외 수정 배양액내의 caffeine, heparin, BSA 및 정자의 최종농도는 5mM caffeine, 10 μ g/ml heparin, 10mg/ml BSA와 1.25×10^6 정자/ml였으며, 수정 후 6~8시간에 CR_{1aa}(Rosenkrans와 First, 1991) 배양액으로 2~3회 세척한 후 40~44시간동안 체외 배양을 실시하여 생산된 2~8

세포기 체외 수정란을 난구세포를 제거한 후 체외 발육 실험에 공용하였다.

3. 난관상피세포의 준비

난관상피세포의 monolayer 준비는 Yang 등(1993)의 방법을 수정 보완하여 실시하였다. 도살 직후 적출된 소의 난관을 4℃의 보온병에 넣어 실험실로 운반하여 난관 표면의 혈액과 결체조직을 제거한 후, PBS 용액으로 2~3회 세척후 난관을 Ham's F-10 배양액으로 관류하여 난관상피세포를 15ml 원심분리관에 회수하였다. PBS 용액과 Ham's F-10 용액으로 각각 1회씩 원심분리(1,000 rpm, 5분)하여 세척한 후, 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml 씩 분주하고 4~5일 동안 배양(37℃, 5% CO₂ in air)하여 난관상피세포 monolayer를 준비하여 체외 배양 실험에 사용하였다.

4. BOEC의 monolayer에 thiol compound의 첨가 배양

상기 방법으로 준비된 BOEC monolayer에 체외 배양액인 CR_{1aa}에 β -mercaptoethanol(β -ME) 0, 10, 25 및 50 μ M과 cysteamine 0, 25, 50 및 75 μ M을 첨가하여 39℃, 5% CO₂ 및 고습도의 조건에서 체외 수정란을 5~6일간 배양하여 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외 발육 성적을 조사하였고, 일부의 배반포기 수정란은 이중형광염색법에 의하여 세포수를 조사하고 나머지 수정란은 세포내 glutathione 농도를 조사하였다.

5. 체외수정란의 세포내 glutathione 농도의 조사

체외수정후 40~44시간에 얻은 2~8세포기 수정란을 각각 96시간과 120시간 배양하여 얻은 상실배기와 배반포기 수정란의 세포내의 총 glutathione (oxidized와 reduced form) 농도를 효소 측정 방법으로 측정하였다(Tietze, 1969).

96시간과 120시간 배양후 얻은 수정란을 1mg/ml polyvinylpyrrolidone(PVP)이 첨가된 PBS (Ca과 Mg free)에서 각각 3번 씻어낸 후 microtube에 수정란을 보관하여 -20℃의 냉동고에서 동결, 용해 과정을 2~3회 반복한 후 미세 유리 pipet을 이용하여 완전히 깨뜨렸다. 그 다음 수정란이 들

어 있는 microtube에 10mM EDTA가 포함된 0.2M phosphate buffer 1.2ml와 증류수 1.2ml 혼합한 후 10mM DTNB(5,5'-dithiobis 2-mitrobenzoic acid) 100 μ l, glutathione reductase 50 μ l 및 4.3mM NADPH 50 μ l를 빠르게 혼합한 후, U.V. Spectrophotometer(Hitachi, Japan)를 이용하여 412nm에서 반응 30초부터 5분간 측정하여 세포내 glutathione 농도를 조사하였다.

6. 체외수정란의 세포수 조사

체외수정란의 세포수 검사는 Papaioannou와 Ebert(1988)의 이중형광염색방법을 수정 보완하여 조사하였다. 간단하게 요약하면, 체외수정란의 투명대를 0.5% pronase에 처리하여 용해시킨 후, TNBS acid-PBS(1:9)와 3mg/ml PVP액에 넣어 4℃에서 10분간 처리하며, Anti-DNP-BSA(1:10)액내에서 20분간 배양한 후, guinea pig complement-PBS(1:3)에서 30분간 처리한다. 위의 방법에 의해 면역 외과적인 처리가 끝난 수정란을 2.3% citrate용액과 ethanol을 3:1의 비율로 만든 용액으로 세척한 다음, 10 μ g/ml Hoechst 33342와 10 μ g/ml propidium iodide(1:1)에서 4~5분간 염색을 실시하였다. Mounting용액은 PBS와 glycerol을 1:1로 혼합하여 사용하였으며, slide glass위에 3 μ l mounting용액을 떨어뜨려 소적을 만들고 염색된 수정란을 혼합한 후 cover glass를 덮고 매니큐어로 봉입하여 형광현미경하(\times 200)에서 세포수를 조사하였다.

7. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 최소 유의차 검정(Least Significant Difference test; LSD test)을 실시하여 통계처리를 하였다.

결과 및 고찰

난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 40~44시간에 생산된 2~8세포기 체외수정란을 CR_{1aa} 배양액과 BOEC 공동배양에 각각 다른 농도의 β -mercaptoethanol(β -ME)을 첨가하여 5~6일간 체외배양한 후 얻은 체외발육성과 배반포기 수정란의

Table 1. Effect of β -mercaptoethanol on development of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with BOEC

β -ME (μ M)	No. of IVM/IVF embryos	No. of developed to;			Morulae plus blastocysts (%, M \pm S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	52	27	10	15	48.1 ^a \pm 4.1
10	50	18	12	20	64.0 ^{ab} \pm 10.4
25	48	13	23	12	72.9 ^b \pm 11.9
50	54	13	28	13	75.9 ^b \pm 8.2
Overall means					
CR _{1aa}	52	27	10	15	48.1 ^A \pm 4.1
β -ME	152	44	63	45	71.1 ^B \pm 3.5

a,b: A,B Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 2. Number of inner cell mass and trophectoderm cell of bovine embryos obtained from IVM/ IVF in CR_{1aa} with or without β -mercaptoethanol with BOEC

β -ME (μ M)	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M \pm S.E)	No. of TE cell (M \pm S.E)	Total cell no. of blastocysts (M \pm S.E)
0	5	17 \pm 0.8	55 \pm 3.2	72 \pm 2.5
10	5	22 \pm 2.3	59 \pm 2.7	81 \pm 4.5
25	5	23 \pm 1.5	49 \pm 3.7	72 \pm 3.1
50	5	22 \pm 1.3	54 \pm 3.9	76 \pm 3.4

세포수를 Table 1과 Table 2에 요약하였다.

CR_{1aa} 배양액과 BOEC와의 공동배양에 β -ME를 0, 10, 25 및 50 μ M을 첨가한 구에서 상실배이상 발육된 체외발육율은 각각 48.1, 64.0, 72.9 및 75.9%로서 β -ME 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났으며(P<0.05), 이와 같은 결과는 소 체외수정란의 체외배양에 있어 β -ME의 첨가는 체외발육억제현상을 극복하고 체외발육율을 향상시켰다고 보고한 Takahashi 등(1993)과 일치하는 경향을 보였다.

한편 2~8세포기의 체외수정란을 6일 동안 체외배양하여 얻은 배반포기 수정란의 세포수는 각각 72 \pm 2.5, 81 \pm 4.5, 72 \pm 3.1 및 76 \pm 3.4로서 10 μ M β -ME 첨가구가 다소 많은 세포수를 나타냈으나 처리간에 통계적 유의차는 인정되지 않았다(Table 2).

난관상피세포(BOEC)는 배양액내로 성장인자를 분비하여 정자의 운동성과 수정능획득에 중요한 역할을 수행하며(Xu 등, 1992), 수정란의 성장을 자

극하는 난관의 배태영양인자들인 화합물들을 분비하고 배양액내의 수정란 독소기질을 제거시켜 주어, 소, 양, 돼지 등을 포함한 몇몇 포유동물 수정란을 체외배양시 일어나는 발육억제현상을 극복시켜 수정란의 발육율을 향상시킨다고 보고되고 있다(Bavister 등, 1992; Ellington, 1990; Rexroad 등, 1988).

최근에는 소 난관상피에서 특별한 Protooncogenes을 활성화시키는 Platelet-derived growth factor(PDGF)가 분비된다는 것이 밝혀졌으며, 이와 같은 PDGF를 배양액에 첨가하면 수정란의 체외발육율을 향상시킨다고 보고되고 있다(Reed 등, 1996; Smith와 Hooper, 1987; Yang 등, 1993). 본 실험의 결과도, thiol 화합물의 단독 첨가구보다 BOEC와의 공동배양이 높은 체외발육율을 나타내 일치하는 결과를 얻었다.

체외배양액인 CR_{1aa}와 BOEC와의 공동배양에 각각 다른 농도의 cysteamine을 첨가하여 체외수정란을 5~6일간 체외배양 후 얻은 체외발육성적과

Table 3. Effect of cysteamine on development of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with BOEC

Cysteamine (μ M)	No. of IVM /IVF embryos	No. of developed to:			Morulae plus blastocysts (% , M \pm S.E)
		Premorulae	Morulae	Blastocysts	
0	58	29	14	15	50.0 ^a \pm 3.4
25	47	22	15	10	53.2 ^{ab} \pm 8.1
50	50	14	24	12	72.0 ^c \pm 4.9
75	45	15	22	8	66.7 ^b \pm 9.8
Overall means					
CR _{1aa}	58	29	14	15	50.0 ^A \pm 3.4
Cysteamine	142	51	61	30	64.1 ^B \pm 5.6

^{a,b,c}: A,B Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 4. Number of inner cell mass and trophectoderm cell of bovine embryos obtained from IVM/ IVF in CR_{1aa} with or without cysteamine with BOEC

Cysteamine (μ M)	No. of blastocysts	No. of ICM cell (M \pm S.E)	No. of TE cell (M \pm S.E)	Total cell no. of blastocysts (M \pm S.E)
0	5	17 \pm 0.6	57 \pm 3.0	74 \pm 3.0
25	5	21 \pm 1.3	56 \pm 3.1	77 \pm 2.5
50	5	19 \pm 0.6	56 \pm 2.8	75 \pm 2.5
75	5	21 \pm 0.9	54 \pm 2.5	75 \pm 2.0

Table 5. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with or without β -mercaptoethanol with BOEC

β -ME (μ M)	No. of replicates	No. of blastocysts	Intracellular glutathione con., pM (Mean \pm S.E)
0	3	31	68.5 ^a \pm 9.6
50	3	28	77.8 ^b \pm 6.5

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

배반포기 수정란의 세포수를 Table 3과 4에 요약하였다.

CR_{1aa} 배양액과 BOEC 공동배양에 cysteamine을 0, 25, 50, 75 μ M을 첨가한 구에서 상실배이상 발육된 체외발육율 중 가장 높은 체외발육성적은 50 μ M cysteamine(72.0%) 첨가구로서 여타구(0 μ M, 50.0% ; 25 μ M, 53.2% ; 75 μ M, 66.7%)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났으며 (P<0.05), cysteamine 첨가구(25, 50, 75 μ M)의 효과는 64.1%로서 무첨가구(50.0%)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다(P<0.05). 배반포기 수정란의 세포수는 각

각 74 \pm 3.0, 77 \pm 2.5, 75 \pm 2.5 및 75 \pm 2.0로서 처리구간에 차이는 인정되지 않았으며, β -ME 첨가구와 비슷한 경향을 나타냈다.

체외수정란의 배양액내에 존재하는 cystine은 세포내에서 cysteine으로 환원되어 GSH로 전환되는 과정을 거치게 되는데, thiol 화합물인 β -ME와 cysteamine은 cystine을 GSH의 전구물질인 cysteine으로 전환시켜 주어 세포내 GSH의 농도를 증가시키므로서 free radical로부터 체외수정란을 보호하는 항산화제작용을 수행하는 것으로 알려져 있으며 (Ishii 등, 1981 ; Sagara 등, 1993), 본 실험

Table 6. Intracellular glutathione levels of bovine IVM/ IVF embryos in CR_{1aa} with or without cysteamine with BOEC

Cysteamine (μ M)	No. of replicates	No. of blastocysts	Intracellular glutathione con., pM (Mean \pm S.E)
0	3	27	78.7 \pm 1.3
50	3	32	80.0 \pm 4.2

에서도 thiol 화합물의 처리구가 무처리구보다 높은 체외발육율을 얻어 일치하는 경향을 보였다. 한편, Zhang 등(1991)은 serum이 첨가되지 않은 배양액에서 성숙시킨 포유동물의 난포란에 있어 thiol 화합물의 첨가는 zona hardening을 막아주며, 수정율을 향상시킨다고 보고했다.

2~8세포기 체외수정란을 CR_{1aa} 배양액과 BOEC공동배양에 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 첨가한 구에서 5~6일 동안 체외배양하여 생산된 배반포 수정란의 세포내 glutathione농도를 Table 5와 6에 요약하였다.

CR_{1aa} 배양액과 BOEC 공동배양에 0, 50 μ M β -ME를 첨가한 구에서 5일 동안 배양하여 얻은 배반포 수정란의 glutathione농도는 50 μ M β -ME 첨가구가 77.8 pM로써 무첨가구(68.5 pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$). 이상의 결과는 소 체외수정란의 체외배양에 있어 β -ME의 첨가는 수정란의 체외발육율을 향상시키며, 세포내 GSH 농도를 증가시킨다고 보고한 Takahashi 등(1993)과 Lim 등(1996)과 일치하는 결과를 얻었으나, 생쥐 수정란의 체외배양시 1mM GSH를 첨가했을 때 체외발육율은 향상시키지만, 세포내 GSH 농도는 대조구와 차이가 없었다고 보고한 Gardiner와 Reed(1994)와는 상반된 결과를 보였다. 한편, CR_{1aa} 배양액과 BOEC공동배양에 cysteamine을 0, 50 μ M을 첨가한 구에서 5일 동안 배양한 후 얻은 배반포 수정란의 glutathione 농도는 각각 78.7 pM과 80.0 pM로서 통계적 유의차는 인정되지 않았다($P > 0.05$).

포유동물의 세포에서 아미노산 유도체인 glutathione(GSH)의 농도는 0.5~10mM로서 매우 폭넓은 범위를 가지고 있으며, 아미노산의 수송, free radical과 reactive oxygen compounds에 대한 세포의 보호작용 등 많은 생물학적인 기작에 있어 중

요한 역할을 수행한다(Lafleur 등, 1994 ; Meister와 Anderson, 1983). 또한, 체외에서 성숙된 난포란에서 GSH의 축적은 체외수정시 난포란을 보호하며, mouse, hamster, 돼지 난포란에서는 응성 전핵을 형성시키고, 수정란의 체외발육율을 향상시킨다(Arechiga 등, 1995 ; Crupen 등, 1995 ; Mitsutoshi 등, 1993). 본 실험의 결과도 무처리구보다 thiol 화합물 첨가구의 세포내 GSH 농도가 높았으며 체외발육 성적에 있어서도 높은 체외발육율을 나타내 이들의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

이상의 결과는 소 체외수정란의 체외배양시 일어나는 8~16세포기 발육억제현상은 BOEC와의 공동배양으로 극복할 수 있으며, thiol 화합물인 β -ME와 cysteamine의 첨가는 세포내 GSH의 합성을 증가시키므로써 체외발육율을 향상시키는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 소 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8세포기 수정란을 CR_{1aa} 배양액과 BOEC 공동배양에 thiol 화합물인 β -mercaptoethanol과 cysteamine을 첨가하여 체외수정란의 체외발육율에 미치는 영향과 배반포기 수정란의 세포내 glutathione 농도 변화에 미치는 영향을 검토하였다.

1. CR_{1aa} 배양액과 소 난관상피세포(BOEC)와의 공동배양에 0, 10, 25 및 50 μ M의 β -mercaptoethanol(β -ME)을 첨가하여 체외발육율을 조사한 결과, 상실배 이상 발육된 체외발육율은 각각 48.1, 64.0, 72.9 및 75.9%로서 β -ME 첨가구가 무첨가구보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($P < 0.05$).
2. CR_{1aa} 배양액과 소 난관상피세포(BOEC)와의 공동배양에 0, 25, 50 및 75 μ M의 cysteamine

을 첨가한 체외발육율중 가장 높은 체외발육 성적은 50 μ M cysteamine(72.0%) 첨가구로써 여타구(0, 50.0%; 25 μ M, 53.2%; 75 μ M, 66.7%)보다 높은 성적을 얻었다($P>0.05$).

3. BOEC와 공동배양액에 β -ME를 0, 50 μ M을 첨가한 구에서 체외수정란을 5~6일 동안 배양한 후 얻은 배반포 수정란의 세포내 glutathione 농도는 50 μ M β -ME 첨가구가 77.8pM로서 무첨가구(68.5pM)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났으나($P<0.05$), cyteamine을 0, 50 μ M을 첨가한 구에서 5~6일 동안 배양한 후 얻은 배반포 수정란의 세포내 glutathione 농도는 각각 78.7pM과 80.0pM로서 통계적 유의차는 없었다($P>0.05$).
4. 모든 처리구에서 배반포까지 발육된 체외수정란의 세포수는 처리구간에 커다란 차이가 없었다.

참고문헌

- Arechiga CF, Ealy AD and Hansen PJ. 1995. Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol. Reprod.*, 52:1296-1301.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146.
- Crupen CG, Nagashima H and Nottle MB. 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 52:1296-1301.
- Ellington JE, Edward W, Farrell BP, Simkin ME and Foote RH. 1990. Bovine 1-2-cell embryos development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture system. *Biol. Reprod.*, 43:97-104.
- Gardiner CS and Reed DJ. 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.*, 51:1307-1314.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanish Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 83:753-758.
- Hernandez-Ledezma JJ, Villanueva C, Sikes JD and Roberts RM. 1993. Effect of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with ether bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation / *in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology*, 39:1267-1277.
- Ishii T, Bannai S and Sugita Y. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by β -mercaptoethanol *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 256:12387-12392.
- Kim CI, Ellington JE and Foote RH. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33:433-440.
- Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ and Retel J. 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Rad. Res.*, 21:9-17.
- Lim JM, Liou SS and Hansel W. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, 46:429-439.
- Mccaffery G, Mcevoy TG, Diskin MG, Gwazdauskas FC, Kane MT and Sreenan JM. 1991. Successful co-culture of 1-4 cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.*, 91:119-124.
- Meister A and Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760.

- Mitsutoshi Y. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. Mol. Reprod. Develop. 35:76-81.
- Papaioannou DE and Ebert KM. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophoctoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. Development, 102:793-803.
- Reed WA, Suh TK, Bunch TD and White KL. 1996. Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver cells, BRL-cellconditioned medium. Theriogenology, 45:439-449.
- Rexroad CE and Powell AM. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. J. Anim. Sci., 66:947-953.
- Sagara J, Miura K and Bannai S. 1993. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. J. Neurochem., 61:1667-1671.
- Smith AG and Hooper ML. 1987. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Devel. Biol., 121:1-9.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N and Okano A. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione concent of bovine embryos. Biol. Reprod., 49:228-232.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N and Okano A. 1995. Effect of co-culture cells on the uptake of cystine into bovine embryos. Theriogenology, 43(abstr.) : 332.
- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ and King WA. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fert., 94:33-43.
- Yang BK, Park CK, Kim JB, Cheong HT and Kim CI. 1993. Development of bovine IV-M /IVF embryos cultured in TCM-199 and synthetic oviduct fluid medium with, without co-culture system. Korean. J. Animal Reprod. 17(3):243-248.
- Zhang X, Rutledge J and Armstrong DT. 1991. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. Mol. Develop., 28:292-296.

(접수일자 : 1997. 10. 27 / 채택일자 : 1997. 12. 5)