

항산화제 첨가가 한우 체외 수정란의 체외 배발달에 미치는 영향¹⁾

문승주⁺ · 김은국 · 김재홍 · 명규호 · 선상수
전남대학교 농과대학 동물자원학부

Effect of Antioxidants on *In Vitro* Development of Korean Native Cattle Embryos Derived from *In Vitro* Fertilization

S. J. Moon⁺, E. K. Kim, J. H. Kim, K. H. Myung and S. S. Sun

Department of Animal Science, College of Agriculture, Chonnam National University

SUMMARY

The effect of several potential antioxidants were examined as a means of increasing the *in vitro* development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized oocytes into morulae and blastocysts. Korean native cattle embryos developed after *in vitro* fertilization were cultured for 7 days at 38.5°C in CR₁aa containing varying concentration of the antioxidants in a gas phase consisting of 5 % CO₂, 95 % humidified air. The results obtained were summarized as follows :

The proportion of embryos developed to morulae and blastocysts in CR₁aa containing 2.5µM α-tocopherol(11.0% and 6.0%) was significantly higher than those of 0, 5.0, and 7.5µM α-tocopherol(P<0.05). Concentrations of 50µM L-ascorbic acid(7.5% blastocysts) did affect the proportion of embryos developing into blastocysts(P>0.05). Addition of 200µM cysteamine was significantly higher than those of 0, 100 and 300µM(P<0.05).

When the fertilized oocytes were cultured at 0, 200, 400 and 600µM of selenium for 168 hrs, the morulae rates were 12.2, 5.2, 16.0 and 16.1% respectively, and addition of 200µM selenium was significantly higher than those of 0, 400, 600µM(P<0.05).

These results suggested that the addition of α-tocopherol, L-ascorbic acid, cysteamine and selenium can enhanced development to the morulae and blastocysts of *in vitro* derived fertilized oocytes.

(Key words : antioxidants, oocytes, embryos, *in vitro* development, Korean Native Cattle)

서 론

체외수정란을 대량 생산하기 위하여 체외배양시 나타나는 8~16세포기 발육정지현상을 극복하기 위한 연구가 많이 시도되고 있으나 포유동물의 수정

란은 체내 난관에서 발생할 때와는 다르게 체외배양시 발생률의 저하를 가져온다(Wright와 Bondoli, 1981). 최근 수정란 발육억제 현상에 관한 연구에서 배양액내의 산소는 free oxygen radical의 형성으로 여러 형태의 세포들에 대해 독성이 있다는 보고가 있는데(Pabon 등, 1989), 이들 유리산소

¹⁾ 본 연구는 1995년 농림부 첨단기술과제 연구비에 의하여 연구되었음

⁺ 교신저자

기(free oxygen radical)들은 'oxidative stress'를 초래하여 미토콘드리아의 호흡작용 억제, 세포막의 유동성 감소, DNA의 손상 및 각종 효소의 불활성화를 초래하는 등 난포란의 체외발달시에 저해요인으로 작용한다(Corsby 등, 1988).

세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포의 독성물질로 작용하는데, α -tocopherol, ascorbic acid, catalase 등과 같은 항산화물질이 체내에 존재하여 이러한 과산화물질을 환원시키지만, 체외에서는 배양액내에 첨가되지 않아 세포의 성장을 억제한다(Murray 등, 1990).

이러한 free radical을 제거하고, 체외수정란의 체외발달율을 향상하기 위하여 최근에는 배양액내에 여러 가지 성장인자의 첨가, thiol 화합물의 첨가 및 항산화제의 첨가 배양이 폭 넓게 이용되어 좋은 체외발달 성적을 얻고 있다. Nasr-Esfahani 등(1992)은 수정란의 발달을 저해하는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 제거하기 위하여 항산화제(antioxidants)를 첨가배양하면 체외배양시 야기되는 부적절한 조건을 극복할 수 있다고 보고하였으나, 면양에서는 산소분압의 감소가 체외수정란의 발생에 있어서 효과를 나타내지 못한다는 보고도 있다(Betterbed 와 Wright, 1985).

본 연구는 한우 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 체외배양액으로 많이 사용되는 CR₁aa medium에 α -tocopherol, ascorbic acid, Cysteamine 및 Selenium을 각 농도별로 첨가하여 한우 수정란의 배 발달에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취 및 성숙 배양

도살장에서 도살된 한우 암소의 난소를 채취하여 75 μ g/ml penicillin G와 50 μ g/ml streptomycin sulfate가 첨가된 30~36 $^{\circ}$ C 생리식염수에 담아 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 생리식염수로 난소표면을 2~3회 세척 후 직경이 3~6mm의 난포로부터 18 G 주사바늘이 부착된 주사기로 미성숙 난포란을 채취하고 실체현미경(Nikon, Japan)하에서 난구세포가 균일하게 부착되어 있는 것만을 선별하

여 성숙배양액으로 2~3회 세척한 후 성숙배양에 이용하였다. 미성숙 난포란의 체외성숙은 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco)가 함유된 성숙배양액 100 μ l 소적에 20~25개의 난포란을 옮겨 mineral oil(Sigma)로 피복하고 5% CO₂, 95% 습도, 39 $^{\circ}$ C 온도로 조절된 배양기에서 22~24시간 배양하였다.

2. 체외수정

37 $^{\circ}$ C 항온수조에 동결정액을 용해한 후 BO액(Brackett과 Oliphant, 1975)에 10mM caffeine이 함유된 배양액과 혼합하여 1,800 rpm에서 5분간 원심분리로 2회 세척 후 정자농도가 2×10^6 정자/ml가 되도록 준비하였다. 체외수정은 BO액에 20 μ g/ml의 heparin이 함유된 체외수정 배양액으로 2~3회 세척하여 20~25개 난자를 100 μ l 체외수정 배양액 내에 옮겨 수정하였다. 수정 후 6~8시간에 체외배발달 배양액으로 2~3회 세척 후 체외배양을 실시하였다.

3. 체외수정란의 항산화제 첨가배양

체외수정시킨 수정란을 반복 pipetting 하여 난구세포를 제거하고 CR₁aa 배양액에 각각 α -tocopherol 0, 2.5, 5.0, 7.5 μ M, L-ascorbic acid 0, 50, 62.5, 75 μ M, cysteamine 0, 100, 200, 300 μ M 및 selenium 0, 200, 400, 600 μ M을 첨가하여 5% CO₂, 95% 습도, 39 $^{\circ}$ C 온도 조건에서 7일간 배양하면서 체외배발달 성적을 조사하였다.

4. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과는 ANOVA(Analysis of Variance)검정에 의하여 통계처리를 실시하였다.

결과 및 고찰

체외수정 후 수정란을 0, 2.5, 5.0, 7.5 μ M α -tocopherol이 첨가된 CR₁aa 배양액에서 168시간까지 배양 결과는 Table 1과 같다. 체외수정 48시간째 난활율은 66.7, 64.3, 72.4%로 대조군 62.6%와 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 8세포기 발달율은

Table 1. Effect of α -tocopherol supplements in culture media on *in vitro* development of KNC* oocytes following insemination

Medium	Concentration of α -tocopherol (μ M)	No. of oocytes used	No. (%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 cell	4 cell	8 cell	Mor	Blast
CR _{1aa}	control	155	97(62.6) ^a	29(29.9) ^a	37(38.1) ^a	31(32.0) ^a	4(4.1) ^a	2(2.1) ^a
	2.5	150	100(66.7) ^a	18(18.0) ^b	37(37.0) ^a	45(45.0) ^b	11(11.0) ^b	6(6.0) ^b
	5.0	140	90(64.3) ^a	19(21.1) ^{ab}	36(40.0) ^a	35(38.9) ^{ab}	7(7.8) ^{ab}	2(2.2) ^a
	7.5	145	105(73.4) ^a	29(27.6) ^a	41(39.0) ^a	35(33.3) ^a	6(5.7) ^a	2(1.9) ^a

* KNC : Korean Native Cattle

^{a, b} : Different superscripts within column denote significant differences ($P < 0.05$).

45.0, 38.9, 33.3%로 대조구 32.0% 보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다 ($P < 0.05$). 상실배기 발달율에서도 5.7~11.0%를 보여 대조구 4.1%와 유의적인 차이를 보였고 ($P < 0.05$), 배반포배 발달율도 1.9~6.0%를 보여 대조구 2.1%보다 유의적으로 높았다.

Table 2는 배양액 내에 L-ascorbic acid를 각각 0, 50, 62.5, 75 μ M 첨가 배양 결과인데, 체외수정 48시간째 난할율은 60.0~67.0%를 보임으로서 항산화제 첨가구와 대조구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 4세포기 난할율을 보면 항산화제 첨가구는 46.7~53.7%로 대조구 43.1%보다 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 상실배 발달율에 있어서는 첨가구가 약간 높은 발달율을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 배반포배 발달율은 50 μ M 첨가구에서 7.5%를 보임으로서 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$).

Cysteamine을 0, 100, 200, 300 μ M씩 첨가하여

수정란을 배양한 결과는 Table 3과 같다. α -tocopherol, L-ascorbic acid 첨가실험과 마찬가지로 난할율은 유의차가 없었으나, 4세포기 발달율은 50.0~61.8%로 대조구 50.0%보다 높은 발달율을 보였고, 상실배와 배반포배 발달율에서도 대조구보다 높은 발달율을 보였다 ($P < 0.05$).

CR_{1aa} 배양액에 selenium을 각각 0, 200, 400, 600 μ M 첨가하여 수정란을 배양한 결과는 Table 4와 같다. Selenium 역시 난할율에서는 유의차가 발견되지 않았으나 4세포기, 8세포기에서는 첨가구가 대조구보다 유의적으로 높았고, 배반포배 발달율에 있어서도 200 μ M 첨가구에서 9.4%로 가장 좋은 발달율을 보였다 ($P < 0.05$).

배양액내 항산화제 첨가는 난포란이 체외에서 성숙되는 동안 세포질의 산화에 의한 손상을 보호하고 (Gruppen 등, 1995) Murray 등(1990)은 세포의 체외배양시 세포내의 과산화물은 세포의 독성물질로 작용하는데, 이러한 과산화물을 환원시키기 위

Table 2. Effect of L-ascorbic acid supplements in culture media on *in vitro* development of KNC* oocytes following insemination

Medium	Concentration of L-ascorbic acid (μ M)	No. of oocytes used	No. (%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 cell	4 cell	8 cell	Mor	Blast
CR _{1aa}	control	100	72(72.0) ^a	30(41.7) ^a	31(43.1) ^a	11(15.3) ^a	6(8.3) ^a	2(2.8) ^{ab}
	50	100	67(67.0) ^a	21(31.3) ^{ab}	36(53.7) ^b	10(14.9) ^a	5(7.5) ^a	5(7.5) ^b
	62.5	100	60(60.0) ^a	12(20.0) ^b	28(46.7) ^a	20(33.3) ^b	6(10.0) ^a	2(3.3) ^{ab}
	75	100	60(60.0) ^a	13(21.7) ^b	31(51.7) ^b	16(26.7) ^b	6(10.0) ^a	0(0.0) ^a

* KNC : Korean Native Cattle

^{a, b} : Different superscripts within column denote significant differences ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of cysteamine supplements in culture media on *in vitro* development of KNC* oocytes following insemination

Medium	Concentration of cysteamine (μ M)	No. of oocytes used	No. (%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 cell	4 cell	8 cell	Mor	Blast
CR _{1aa}	control	105	66(62.9) ^a	26(39.4) ^a	33(50.0) ^a	7(10.6) ^a	4(6.1) ^a	2(3.0) ^a
	100	100	62(62.0) ^a	21(33.9) ^a	37(59.7) ^{bc}	4(6.5) ^a	7(11.3) ^b	2(3.2) ^a
	200	100	55(55.07) ^a	21(38.2) ^a	34(61.8) ^c	0(0.0) ^b	8(14.5) ^b	0(0.0) ^b
	300	110	66(60.0) ^a	29(43.9) ^a	3(50.0) ^a	4(6.1) ^a	2(3.0) ^a	2(3.0) ^a

* KNC : Korean Native Cattle

^{a,b} : Different superscripts within column denote significant differences ($P < 0.05$).

하여 체내에는 α -tocopherol, ascorbic acid, superoxide dismutase, catalase 등과 같은 항산화물질 (antioxidants)이 존재하나, 체외에서는 이와 같은 항산화물질이 배양액내에 첨가되지 않아 세포의 성장을 억제하는 경우가 있다고 하였는데 본 실험의 결과에서도 대조구에 비해 항산화제 첨가구에서 높은 초기배 및 후기배 발달율을 얻을 수 있었다.

이러한 결과는 배양액내 항산화물질을 첨가시 cell block 현상을 제거하여 배발달율을 향상시킨다 (Matsuuyama 와 Fukuo, 1994)는 보고와, 축종은 다르지만 이 등(1999)이 돼지 난포란을 Whitten's 배양액에 L-ascorbic acid와 selenium을 각각의 농도별로 첨가하여 체외 배발달율을 조사했을 때 48시간째 난할율과 120시간 후 상실배 발달율에 있어 대조구보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다는 결과 ($P < 0.05$)와 유사하였다. 또 양 등(1997)이 CR_{1aa}에 소 체외수정란을 체외배양시 50 및 75 μ M cysteamine을 첨가한 처리구가 대조구에 비하여 유

의적으로 높은 상실배 및 배반포배 발달을 보였다는 결과나 이 등(1999)이 돼지의 체외수정란 배양시 α -tocopherol과 cysteamine의 첨가가 무첨가구에 비해 상실배와 배반포배까지 도달율이 높다는 결과와 일치하는 경향을 보였다. 또 Parbon 등(1989)이 free oxygen radical이 수정란 발육억제 현상의 한 원인이라고 제시하였고, 체외배양액 내에서 생성되는 free radical을 제거하기 위한 수단으로 Li(1993 a)이 항산화제를 첨가함으로써 발육억제 현상을 극복할 수 있었다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 Walker 등(1992)이 발표한 양의 체외수정란과 Liu 등(1995)이 발표한 소의 체외수정란 발육에는 비효과적이었다는 결과와는 차이를 보였다.

체외배양액내 항산화제 첨가는 세포의 성장을 촉진시키고 배양액내 존재하는 glutathione(GSH) 합성기질로 작용하여 세포내 GSH 농도를 증진시켜 free radical로부터 수정란을 보호하며(Tesuro

Table 4. Effect of selenium supplements in culture media on *in vitro* development of KNC* oocytes following insemination

Medium	Concentration of selenium (μ M)	No. of oocytes used	No. (%) of embryos cleaved	No. of embryos developed to				
				48 h			168 h	
				2 cell	4 cell	8 cell	Mor	Blast
CR _{1aa}	control	130	90(69.2) ^a	23(25.6) ^a	38(42.2) ^b	29(32.2) ^a	11(12.2) ^a	3(3.3) ^a
	200	140	96(68.6) ^a	27(28.1) ^a	44(45.8) ^b	25(26.0) ^a	5(5.2) ^b	9(9.4) ^b
	400	135	94(69.6) ^a	25(26.6) ^a	29(30.9) ^a	40(42.6) ^b	15(16.0) ^a	5(5.3) ^{ab}
	600	135	93(68.9) ^a	28(30.1) ^a	37(39.8) ^{ab}	28(30.1) ^a	15(16.1) ^a	5(5.4) ^{ab}

*KNC : Korean Native Cattle

^{a,b} : Different superscripts within column denote significant differences ($P < 0.05$).

등, 1981 ; Li 등 1993), 수정란의 생존율과 발달을 저해하는 heat shock로부터 수정란을 보호한다 (Ealy 등, 1992 ; Arechiga 등, 1995). 따라서 체외 성숙 배양액 내에 항산화제를 첨가함으로써 수정란의 체외배양 시 많이 생성되는 free radical로부터 세포기능의 손상을 방지할 수 있으며(Bize 등, 1991 ; Miyazaki 등, 1991), 이는 수정란의 특정 배발달 단계에서 체외 발생능 정지(*in vitro* cell block)현상을 극복할 수 있으리라 사료된다.

적 요

본 실험은 체외수정란 배양시 널리 이용되는 CR₁aa 배양액에 항산화물질인 α -tocopherol, L-ascorbic acid, cysteamine 및 selenium을 첨가하여 체외수정시킨 한우 수정란의 체외발달을 조사하였다.

CR₁aa 배양액에 α -tocopherol 0, 2.5, 5.0, 7.5 μ M을 각각 첨가하여 조사한 체외배발달율을 보면 48시간 쯤 난분할율에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 2.5 μ M 첨가구가 상실배(11.0%) 및 배반포배(6.0%) 발달율에 있어서 무첨가구(4.1%, 2.1%)보다 유의적으로 높은 발달율을 보였다 ($P < 0.05$). L-ascorbic acid를 0, 50, 62.5, 75 μ M 첨가하여 배양시 상실배 발달율에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 배반포배 발달율에 있어서는 50 μ M 첨가구에서 7.5%로 가장 높았고($P < 0.05$), cysteamine은 200 μ M 첨가구에서 상실배 발달율이 14.5%를 보임으로써 가장 좋은 발달율을 보였으나, 배반포배 발달율에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 배양액내 selenium 200 μ M 첨가시 9.4%의 배반포 도달율을 보여 대조구 3.3% 보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

따라서 한우 체외수정란 생산시 체외배발달 배양액에 항산화물질인 α -tocopherol, L-ascorbic acid, cysteamine 및 selenium을 적정량 첨가하여 배양시 높은 체외 배발달율을 얻을 수 있으리라 사료된다.

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.

Betterbed B and Wright Jr RW. 1985. Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. *Theriogenology.* 23:547-553.

Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D and Sharpec C. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 44:398-403.

Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12:260-274.

Corsby IM, Gandolfi F. et al. 1998. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 82:769-775.

Ealy AD, Drost M, Barros CM and Hansen PJ. 1992. Thermoprotection of preimplantation bovine embryos from heat shock by glutathione and taurine. *Cell. Bio. Inter. Repro. s.* 16(2) :125-131.

Li J and Foote RH and Simkin M. 1993a. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 49:33-37.

Liu Z, Foote Rh and Yang X. 1995. Development of bovine embryos in co-cultuer with KSOM and taurine, superoxide dismutase or insulin. *Theriogenology.* 44:741-750.

Matsuyama K and Fukui Y. 19994. Effect of oxygen concentration and free radical scavengers on the *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Devel.* 40:73-79.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW. 1990. Lipid peroxidation is a source of free radicals *in vivo*. *Harper's Biochem(eds.)*. pp. 142-143.

Nasr-Esfahani MH, Winston NJ and Johnson

- MH. 1992. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. J. Reprod. Fert. 96:219-231.
- Pabon WE, Findley WE and Gibbons WE. 1989. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil. Steril. 51:896-900.
- Tesuro I, Bannai S and Sugita Y. 1981. Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by mercaptoethanol *in vitro*. J. Biol. Chemistry 256(23) :12387-12392.
- Walker SK, Heard TM and Seamark RF. 1992. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: success and perspectives. Theriogenology. 37:111-126.
- Wright RW, Jr and Bondioli KB. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci. 53:702-728.
- 양부근, 황환섭, 박동현, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1996. 항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 20(2):163-170.
- 이경호, 문승주, 김재홍. 1999. α -tocopherol 과 Cysteamine 첨가가 돼지 미성숙 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 배발달에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 14(1):9-15.
- 이경호, 문승주. 1999. L-ascorbic Acid 와 Selenium 이 돼지 난포란의 체외성숙, 체외수정 및 체외배발달에 미치는 영향. 한국 가축번식학회지 23(3) :263-270.

(접수일:1999. 2. 23 / 채택일:1999년 4. 4)