

## 소 난관상피세포배양액이 체외수정 유래 분할란의 발육에 미치는 영향

박종임·황우석·조충호·이병천

서울대학교 수의과대학

### 서 론

소 난포란의 체외배양이 1965년 Edwards<sup>1)</sup>에 의해 처음으로 보고된 이후 소 난포란의 체외성숙, 수정 및 체외배양에 관한 연구가 여러 학자에 의해 수행되어 왔다.<sup>2~5)</sup> 소 난포란의 체외수정의 성공<sup>2~6)</sup>에 이어 산자의 생산<sup>3, 7~9)</sup>이 보고되었다. 그러나 소 초기배의 체외배양시 8 또는 16세포기에서 후기배로의 발육이 잘 이루어지지 않는 현상 등<sup>10)</sup>으로 후기배로의 발육에 많은 어려움이 있어왔다. 이를 해결하기 위하여 소 초기배의 분할란을 다른 체조직과 co-culture 하는 방법<sup>11)</sup>, 토끼의 난관에서 체내배양하여 후기배로의 발육율을 높이는 방법 등<sup>12)</sup>이 연구되어 왔다.

근년에 난관상피세포<sup>10)</sup>, 영양막세포<sup>13)</sup>, 자궁내막세포<sup>14)</sup> 및 과립막세포 등<sup>15)</sup>을 소의 초기 분할란과 co-culture하여 체외에서 후기배로의 발육율을 높이기 위한 연구가 활발히 수행되고 있다.

이중에서 특히 소 초기배와 난관상피와의 co-culture가 후기배로 발육하는데 도움을 주며 높은 산자 생산율을 나타낸다고 보고되었으며<sup>10, 16~19)</sup>, 양에서도 난관상피와 초기배와의 co-culture가 체외에서 후기배로의 발육율을 증진시킨다고 하며<sup>20)</sup>, 다른 체조직과의 co-culture보다도 난관상피와의 co-culture가 후기배로 발육하는데 좋은 영향을 미친다고 하였다.<sup>21~23)</sup> 또한 소 초기배를 양<sup>21, 24)</sup>과 토끼<sup>8, 25, 26)</sup> 난관에서 체내배양하는 것이 후기배로의 높은 발육성적을 나타낸다고 하였으며 최근 소 난관상피세포배양액(conditioned medium)을 사용한 소 초기배의 체외배양도 난

관상피와의 co-culture와 마찬가지로 후기배로의 발육율을 증진시킨다는 보고도 있다.<sup>17, 27, 28)</sup>

이상에서 살펴본 바와 같이 소 초기배의 체외배양시 소 난관상피세포와의 co-culture, 난관상피세포배양액에서의 배양 그리고 토끼 난관에서의 체내배양의 유용성은 다수 보고되었으나 이의 정확한 기전이 현재까지도 밝혀지지 않은데 따른 co-culture 방법상의 차이와 난포의 취득에 수반되는 여러 요인들로 인해 초기배의 후기배로의 발육율에 난제가 남아 있는 것으로 생각된다.

이에 저자는 발정주기의 각 기별로 채취한 소 난관상피세포와의 co-culture 및 난관상피세포배양액의 첨가 그리고 토끼난관에서의 체내배양이 체외수정유래 소 초기배의 체외발육에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

난포란의 채취 : 도축된 홀스타인종과 한우 암소에서 양측의 난소를 채취하여 난소표면의 혈액과 여분의 결체조직을 제거한후 100IU/ml의 penicillin(이하 PC로 약함)과 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin(이하 SM으로 약함)이 첨가된 30~35 $^{\circ}$ C의 생리식염수가 든 보온병에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실에 도착한 후 38 $^{\circ}$ C의 생리식염수로 2~3회 세정한 후 멸균여과지로 혈액과 수분을 제거하고 18 gauge 침이 달린 10ml 주사기로 5% 소 태아혈정(Fetal Calf Serum, 이하 FCS로 약함)이 첨가된 38 $^{\circ}$ C의 Dubecc

\* 본 논문은 1990년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

o's phosphated buffered saline(Gibco, U.S.A., 이하 D-PBS로 약함)을 2~3ml 정도 흡인한 후 직경 2~5mm의 소난포로부터 난자를 흡인하였다. 이를 시계 접시 위에 올려 놓고 실체현미경(15~25×)하에서 검경하여 난구세포가 팽윤되지 않고 세포질이 균질한 정상난자를 선별하여 배양에 이용하였다(Fig. 1).

**난포란의 성숙배양:** 선별된 정상난자를 25mM의 HEPES와 5% FCS가 첨가된 Tissue Culture Medium 199(Gibco, U.S.A., 이하 TCM 199으로 약함)에서 3회 세정하였다. 성숙배지는 10% FCS와 100IU/ml PC, 100μg/ml SM이 첨가된 TCM 199을 사용하였으며 이를 0.22μm millipore filter(Costar, U.S.A.)로 여과한 후 4-Well dish(Nunc, Denmark)에 넣고 well 당 8~10개의 난자를 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 22~24시간동안 성숙배양하였다.

**정자의 처리:** 공시정액은 0.5ml straw당 5×10<sup>7</sup>개의 정자가 들어있는 한우의 동결정액을 사용하였다. 정액의 희석과 정자의 체외배양을 위한 기본배양액으로 Brackett & Orilphant medium(이하 BO로 약함)을 사용하였으며 첨체반응과 수정능 획득을 유도하기 위해서 10mM의 Caffein(Fulka Chemika, Switzerland)이 첨가된 BO-caffein액과 10mg/ml의 Bovine Serum Albumin(Sigma, U.S.A., 이하 BSA로 약함)이 첨가된 BO-BSA액을 0.22μm의 millipore로 여과하여 사용하였다.

동결정액을 38°C의 수조내에서 30초간 용해시킨 후 원심분리관(Costar, U.S.A.)에 넣어 5ml의 Bo-Caffein액을 가한후 700g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 과정을 3회 반복하여 동결보호제를 완전히 제거한 후 Bo-caffein액과 BO-BSA(20mM heparin 첨가)액을 동량첨가하여 최종농도가 5mM caffein, 10mg/ml BSA, 10mM heparin이 되도록 조정한 후 최종정자농도가 1×10<sup>7</sup>/ml가 되도록 재부유시켰다. 이 정자부유액으로 80~10μl의 미소적울 작성한 후 paraffin oil(Mineral oil, Sigma, U.S.A.)을 도포하여 체외수정에 제공하였다.

**체외수정:** 준비된 정자부유액에 각 미소적당 8~10개의 성숙난자를 첨가하여 20~22시간동안 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 배양하여 체외수정을 실시하였다(Fig. 2, 3).

**난관상피의 채취:** 도축장에서 난소표면의 난포와

황체의 소견을 관찰하여 난포기, 초기 황체기, 황체기로 분류된 난소에서 각각의 난관을 채취한 후 2~4°C로 냉장보관하여 2시간 이내에 실험실로 운반하였다.

여분의 결체직을 제거한 후 100IU/ml PC, 100μg/ml SM이 첨가된 멸균생리식염수로 수회 세정한 후 21 guage 침이 달린 10ml 주사기로 5% FCS가 첨가된 3~4ml의 TCM 199을 흡인하여 난관협부를 통하여 관류하였다. 난관관류액을 centrifuge tube에 넣어 700g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 반복후 10% FCS가 첨가된 TCM 199에 재부유하여 4-well dish에 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 co-culture에 제공하기 전 48시간동안 배양하였다.

**난관상피세포배양액(Conditioned Medium)의 제조:** 초기황체기의 난관을 채취하여 얻은 난관상피세포를 2~3일간 배양하여 세포부유액을 centrifuge tube에 넣어 700g에서 10분간 원심분리후 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액을 4-well dish에 넣은후 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에 정치하였다.

#### 소 초기배의 체외배양:

1) 난관상피와의 co-culture: 체외수정 실시 20~22시간 후 소 난포란을 꺼내어 5% FCS, 25mM의 HEPES가 첨가된 TCM 199액내에서 구경이 작은 피펫으로 조심스럽게 흡인배출함으로써 난구세포를 완전히 제거한 다음 상기의 배양중인 난관상피세포에 초기배(1~2 세포기)를 첨가하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 co-culture를 실시하였다. 3일마다 배지를 교체하며 6일간 배양후 실체현미경하에서 분할율과 발육율, 난의 정상성 여부 등을 조사하였다(Fig. 4~6, 8, 9).

2) 난관상피세포배양액(conditioned medium)에서의 배양: 전술한 난구세포가 제거된 초기배(1~2 세포기)를 난관상피세포배양액이 들어있는 4-well dish에 넣어 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 배양을 실시하였다. 3일마다 난관상피세포배양액으로 배지를 교체하며 6일간 배양후 실체현미경하에서 분할율과 발육율, 난의 정상성 여부 등을 조사하였다.

**토끼난관에서의 체내배양:** 건강한 성숙 암토끼(New Zealand White종, 2.5~3.0kg)에 이식 24~27시간 전 100IU의 hCG(대성미생물연구소, 한국)를 주사하

여 위임신을 유발하였다. Sodium Pentobarbital(Somnopenyl, Pitman-Moor, U.S.A)으로 마취후 개복하여 난관을 노출한 다음 자궁난관접합부에서 난소쪽으로 1cm 되는 부위를 결찰하였다. 1ml 주사기에 Tom-cat catheter(Monoject, U.S.A.)를 부착하여 15~20개의 체외수정유래초기배(1~2 cell)를 소량의 배지와 함께 흡인한후 한쪽의 난관에 난관체를 통하여 이식하였다.

6일후 토기를 살처분하여 난관을 절제한 후 결찰 부위의 봉합사를 조심스럽게 제거하고 5% FCS가 첨가된 3~4ml의 TCM 199으로 난관을 관류하여 소분할란을 회수한 다음 실험현미경하에서 회수된 난의 수, 분할율, 발육단계, 정상성여부 등을 검사하였다(Fig. 7).

발육단계의 판정: 체외배양 및 체내배양된 소 초기배의 발육단계의 판정은 Lindner and Wright의 기준<sup>30)</sup>에 준하여 1) 2~8 cell, 2) 9~16 cell, 3) morula blastocyst로 나누어 발육율을 조사하였다.

통계처리: 각 처치군에 있어서의 분할율과 후기배로의 발육율은 백분율로 나타내었으며 각 처치군간의 실험결과치의 차는  $\chi^2$ -test로 유의성을 검정하였다.

## 결 과

발정주기의 각 기별로 채취한 소 난관상피세포와 co-culture 및 난관상피세포배양액(conditioned medium)의 첨가 그리고 토기난관에서의 체내배양이 체외수정유래 소 초기배의 체외발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

발정주기의 각 기별로 채취한 소 난관상피세포와 co-culture 및 난관상피세포배양액의 첨가가 체외수정유래 소 초기배의 체외발육에 미치는 영향: 발정주기의 각 기별로 채취한 소 난관상피세포와의 co-culture 및 난관상피세포배양액의 첨가가 체외수정유래 소 초기배의 체외발육율에 미치는 영향을 알아본 결과 대조군에서는 44.2%, 초기황체기, 황체기, 난포기의 난관상피세포와의 co-culture군에서는 각각 70.8%, 70.6%, 67.2%였으며 난관상피배양액 첨가군에서는 56.7%로 난관상피세포와 난관상피세포배양액 첨가군이 대조군에 비해 유의성있게 높았다( $p < 0.05$ ). 그러나 발정주기에 따른 난관상피세포 co-culture군들간의 분할율에 대한 유의차는 인정되지 않았다. 소 초기배의 후기배로의 발육율은 대조군이 5.2%, 초기황체기, 황체기, 난포기의 난관상

Table 1. Development of *in vitro* Fertilized bovine Embryos in Co-culture with Oviductal Epithelium from Different Estrus Cycles or in Conditioned Medium

Treatment*	No. of embryos	No. of embryos	No. of embryos developed <i>in vitro</i>		
	examined	cleaved (%)	2~8 cell	9~16 cell	Mo <sup>1</sup> +Bl <sup>2</sup>
Control	305	134/305(44.2) <sup>a</sup>	105(78.1)	23(16.7)	7(5.2) <sup>c</sup>
Co-culture with					
ELS	226	160/226(70.8) <sup>b</sup>	55(34.4)	53(33.1)	52(32.5) <sup>de</sup>
LTS	102	72/102(70.6) <sup>b</sup>	42(58.3)	19(26.4)	11(15.3) <sup>df</sup>
FLS	128	86/128(67.2) <sup>b</sup>	51(59.3)	21(24.4)	14(16.3) <sup>df</sup>
Conditioned medium	231	131/231(56.7) <sup>b</sup>	67(51.1)	45(34.4)	19(14.5) <sup>df</sup>

1: Morula, 2: Blastocyst

\* Control: TCM199+100% FCS, ELS: Early luteal stage, LTS: Luteal stage FLS: Follicular stage

a, b, c, d, e, f: Different superscripts in the same columns denote significant differences( $p < 0.05$ ).

Table 2. *In vivo* Development in the Rabbit Oviduct of Bovine Embryos Fertilized *in vitro*

No. of embryos transferred	No. of embryos recovered (%)		No. of embryos developed (%)		
	total	cleaved	2-8 cell	16-32 cell	Mo*+BL**
241	165(68.2)	86(52.1)	36(41.9)	27(31.4)	23(26.7)

\*: Morula

\*\* : Blastocyst

피세포와의 co-culture군에서는 각각 32.5%, 15.3%, 16.3%였으며 난관상피세포배양액 첨가군에서는 14.5%로 난관상피세포와 난관상피세포배양액 첨가군이 대조군에 비해 유의성있게 높았다( $p < 0.05$ ). 또한 발정주기의 각 기별로 채취한 난관상피세포와의 co-culture시 후기배로의 발육율은 초기황체기의 난관상피세포와의 co-culture가 황체기, 난포기의 난관상피세포와의 co-culture보다 유의성 있게 높았다( $p < 0.05$ , Table 1).

토끼난관에서의 체내배양이 체외수정유래 소 초기배의 분할율과 발육율에 미치는 영향: 체외수정유래 소 초기배를 토끼난관에서 체내배양하였을 때의 난획수율은 이식된 251개의 난중 165개가 회수되어 68.2%였으며 회수란중 분할란은 86개로서 52.1%의 분할율을 나타내었다. 또한 분할란 가운데 후기배로의 발육율은 26.7%였다(Table 2).

## 고 찰

발정주기의 각 기별로 채취한 난관상피세포와의 co-culture 및 난관상피배양액의 첨가가 소 초기배의 분할율에 미치는 영향을 알아본 결과 난관상피세포(67.2~70.8%)와 난관상피세포배양액첨가군(56.7%)이 대조군(44.2%)보다 유의성있게 높았는 바( $p < 0.05$ ) 이와같은 결과는 난관상피세포와의 co-culture를 실시한 군과 실시하지 않은 군에서 각각 75%와 53%의 분할율을 보인 Kim et al<sup>30)</sup>의 보고와 난관상피세포와의 co-culture군에서 71.1%의 분할율을 나타낸 Fukui<sup>15)</sup>, 74%의 분할율을 나타낸 Eyestone과 First<sup>17)</sup>의 성적과 유사하였으나 난관상피배양액의 첨가시 77%의 분할율을 보인 Eyestone과 First<sup>31)</sup>보다는 낮은 성적을 나타내었다. 그러나 발정주기에 따른 난관상피세포 co-culture군들간의 소 초기배의 분할율에 대한 유의차는 인정되지 않았으며 소에서 발정주기에 따른 난관상피세포와의 co-culture시 초기배의 분할율을 비교한 다른 보문은 얻을 수 없어 본 실험의 성적과 직접 비교할 수 없었다.

또한 소 초기배의 후기배로의 발육율은 난관상피세포(15.3~32.5%)와 난관상피세포배양액첨가군(14.5%)이 대조군(5.2%)에 비해 유의성있게 높았다( $p < 0.05$ ). 이 결과는 대조군에서 7%, 난관상피세포와의 co-culture군에서 35%, 난관상피배양액에서 23%의 발육율을 보고한 Eyestone과 First<sup>17)</sup>의 성적과 유사한

경향이었으나 그 절대성적은 낮은 수준이었으며 난관상피세포첨가군과 대조군에서 각각 38%와 1.5%<sup>30)</sup>, 난관상피배양액첨가군에서 34%<sup>31)</sup>의 발육율을 보고한 성적들보다 낮았다. 그러나 대조군에서 1.6%, 난관상피세포와의 co-culture군에서 12.3%의 발육율을 보고한 Fukui와 Ono<sup>32)</sup>의 성적보다는 높았다. 소 초기배의 발정주기에 따른 난관상피세포와의 co-culture시 후기배로의 발육율을 비교한 보문 역시 접할수 없어서 타 연구자의 성적과 직접비교는 어려웠으나 초기황체기의 난관상피세포와의 co-culture가 황체기, 난포기의 난관상피세포와의 co-culture보다 유의성있게 높았다( $p < 0.05$ ). 이는 양에서 초기황체기와 황체기의 난관상피세포와의 co-culture시의 후기배로의 발육율이 각각 37.5%, 42.1%로서 유의성이 없었다는 Rexroad와 Powell<sup>22)</sup>의 결과와는 상이한 것이었다. 한편 Eyestone et al<sup>31)</sup>은 소에서 난포기와 황체기의 난관상피세포배양액의 첨가시 체외수정유래 소 초기배의 후기배로의 발육율은 각각 33%, 27%로 발정주기에 따른 유의성이 없다고 보고하여 본 실험에 비해 상반된 결과를 나타내었다.

소 초기배를 토끼난관에 이식하여 체내배양한 실험에서 회수율(68.2%)은 Sirard et al<sup>8)</sup>이 보고한 60%, Ellington et al<sup>33)</sup>의 65%, Utsumi et al<sup>34)</sup>의 62%와는 비슷한 수준이었으나 Kuwayama et al<sup>26)</sup>의 49.3%보다 높은 성적이었다. 그러나 소 초기배의 분할율(52.1%)은 Sirard et al<sup>8,35)</sup>이 보고한 67.0%, 62.0%보다는 낮은 수준이었다. 소 초기배의 후기배로의 발육율(26.7%)은 Sirard et al<sup>35)</sup>의 29.5%와는 비슷한 수준이었으나 Kuwayama et al<sup>26)</sup>의 49.3%, Sirard et al<sup>8)</sup>의 41.0%보다 낮은 성적이었다. 그러나 Utsumi et al<sup>34)</sup>이 3~4세포기와 6~8세포기의 소 초기배를 토끼난관에 이식하여 얻은 각각 5%, 18%의 발육율과 Fukui와 Ono<sup>32)</sup>의 22%의 발육율보다 높은 수준이었다.

이와같은 결과를 종합해보면 소 난관상피세포와의 co-culture 및 난관상피세포배양액의 첨가가 소 초기배의 분할율과 발육율의 증진에 영향을 미쳐 후기배로의 발달을 촉진하는 것으로 나타났다. 이에 대해 난관상피세포가 체외에서 소 초기배의 발육을 향상시키는 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 소 초기배의 발육을 돕는 인자의 제공 또는 발육을 저해하는 인자를 제거하는 기능이 있는 것이 아닌가 여겨진다. 17, 19, 36) 한편 본 실험에서는 난관상피세포와의 co-cu-

## 결론

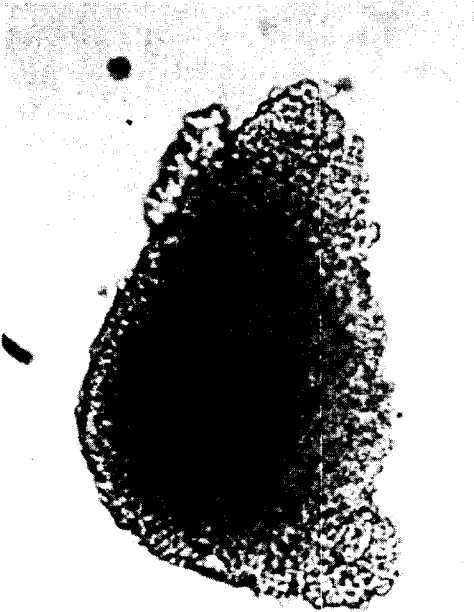
ulture가 난관상피세포배양액의 첨가에 비해 분할율과 후기배로의 발육율에 있어서 약간 우수한 것으로 나타났다는데 이와같은 결과는 난관상피세포 및 다른 체세포배양액의 첨가가 초기배의 발육에 미치는 영향이 적다는 Allen과 Wright<sup>37)</sup>(돼지), Rexroad Powell<sup>21~23)</sup>(양) 그리고 Ellington et al<sup>19,33)</sup>(소)의 성적과 유사하였다. 이에 대해서는 초기배의 발육에 있어 난관상배양액에서의 단독배양시에는 난관상피세포와 초기배가 직접 접촉하는 것 보다도 embryotrophic factor의 전달과 대사물질의 교환과 같은 기능이 뒤떨어진다는 보고도 있다.<sup>19,23,33)</sup> 그러나 난관상피세포배양액에서 77~84%의 분할율과 22~37%의 후기배로의 발육율을 보고한 Eystone et al<sup>17,28,31)</sup>의 성적과 embryo와 난관상피의 직접적인 접촉이 후기배로의 발육을 증진에 반드시 필요한 것은 아니라고 보고한 McCaffrey et al<sup>38)</sup>의 보고로 미루어 볼 때 난관상피세포배양액의 첨가가 소 초기배의 발육에 미치는 제반 영향에 관한 다방면의 심도 깊은 연구가 계속 추진되어야 한다고 사료된다. 또한 초기배를 토끼난관에 이식하여 체내배양한 결과를 보면 분할율과 후기배로의 발육율이 향상된 것으로 나타나 소 초기배의 후기배로의 발육을 증진에 토끼의 난관의 이용가능성을 제시하였다고 생각된다. 그러나 토끼난관의 이식시기와 이식가능한 소 초기배의 발육단계 등 이에 대한 폭 넓은 연구가 앞으로도 계속 수행되어야 한다고 생각된다.

소 초기배의 체외배양시 발정주기의 각 기별로 채취한 난관상피세포와의 co-culture 및 난관상피세포배양액의 첨가와 토끼난관에서의 체내배양이 분할율과 발육율에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같았다.

소 초기배의 체외배양시 발정주기의 각 기별로 채취한 난관상피세포 그리고 난관상피세포배양액의 첨가시 분할율은 대조군에서는 44.2% 초기황체기, 황체기, 난포기의 난관상피세포 co-culture군에서는 각각 70.8%, 70.6%, 67.2%였으며 난관상피세포배양액 첨가군에서는 56.7%였다. 분할율은 난관상피세포와 난관상피세포배양액 첨가군이 대조군보다 유의성있게 높았으나( $p < 0.05$ ), 발정주기의 각 기별로 채취한 난관상피세포 co-culture군들간의 소 초기배의 분할율에 대한 유의차는 인정되지 않았다. 소 초기배의 후기배로의 발육율은 대조군이 5.2%, 초기황체기, 황체기, 난포기의 난관상피세포 co-culture군에서는 각각 32.5%, 15.3%, 16.3%였으며 난관상피세포배양액 첨가군에서는 14.5%였다. 소 초기배의 후기배로의 발육율은 난관상피세포와 난관상피세포배양액 첨가군이 대조군에 비해 유의성있게 높았다( $p < 0.05$ ). 난관상피세포와의 co-culture시 후기배로의 발육율은 초기황체기의 소 초기배의 발정주기의 각 기별로 채취한 난관상피세포가 황체기, 난포기의 난관상피세포와의 co-culture보다 유의성있게 높았다( $p < 0.05$ ).

## Legends for figures

- Fig. 1. Bovine oocyte immediately after the collection from ovarian follicle.  $\times 250$ .
- Fig. 2. Bovine oocyte with 2 polar bodies (arrow) immediately after the *in vitro* fertilization.  $\times 400$ .
- Fig. 3. Sperm cell (arrow) in perivitelline space of bovine oocyte following *in vitro* fertilization.  $\times 400$ .
- Fig. 4. A 2-cell stage bovine embryo fertilized *in vitro*.  $\times 250$ .
- Fig. 5. A 4-cell stage bovine embryo fertilized *in vitro*.  $\times 400$ .
- Fig. 6. A 8-cell stage bovine embryo fertilized *in vitro*.  $\times 400$ .
- Fig. 7. A morula stage bovine embryo developed in rabbit oviduct showing typical mucin layer (arrow).  $\times 250$ .
- Fig. 8. A blastocyst stage bovine embryo co-cultured with oviduct epithelium.  $\times 100$ .
- Fig. 9. A blastocyst stage bovine embryo co-cultured with oviduct epithelium.  $\times 400$ .



1



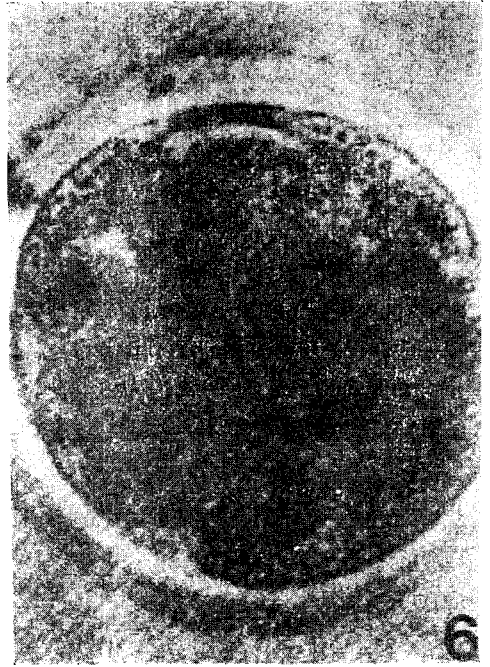
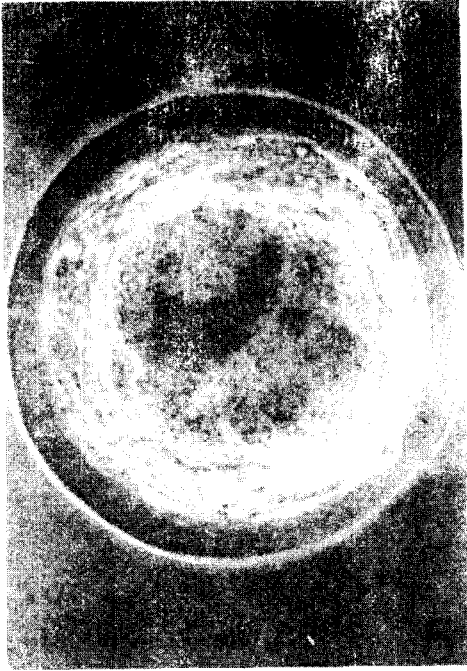
2

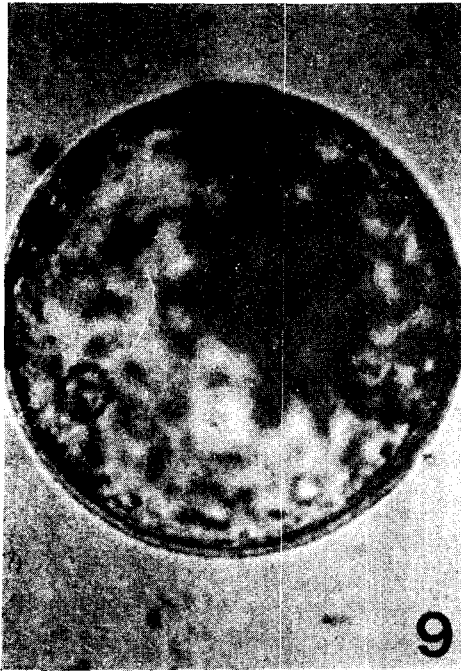


3



4





소 초기배를 토끼난관에서 체내배양하였을때의 난회수율은 이식된 251개의 난중 165개가 회수되어 68.2%였으며 회수란중 분할란은 86개로서 52.1%의 분할율을 나타내었다. 또한 분할란 가운데 후기배로의 발육율은 26.7%였다.

이상의 결과로 보아 소 초기배의 체외배양시 난관상피세포와의 co-culture 및 난관상피세포배양액의 첨가 그리고 토끼난관에서의 체내배양이 분할율과 후기배로의 발육율에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며 특히 초기황체기의 난관상피세포의 co-culture에 의해 소 초기배의 체외에서의 분할율과 발육율이 더욱 향상된 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Edwards, R. G. : Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, (1965) 208 : 349~351.
- Iritani, A. and Niwa, K. : Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.* (1977) 50 : 119~121.
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F. and Dressel, M. A. : Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, (1982) 27 : 147~158.
- Bondioli, K. R., Wright, R. W., Jr. : *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, (1983) 57 : 1001~1005.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leidfride-Rutledge, M. L., Criser, E. S., Eyestone, W. H. and First, N. L. : Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, (1986) 25 : 591~600.
- Fukui, Y., Fukushima, M. and Ono, H. : Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, (1983) 226 : 137~142.
- Brackett, B. G., Keefer, C. L., Troop, C. G., Donawick, W. J. and Bennet, K. A. : Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, (1984) 21 : 224.
- Sirard, M. A., Lambert, R. D., Menard, D. P. and Bedoya, M. : Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J. Reprod. Fert.* (1985) 75 : 551~556.
- Hanada, A., Shioya, Y. and Suzuki, T. : Birth of calves from nonsurgical transfer of blastocyst originated from *in vitro* fertilized oocytes matured *in vitro* (abstract). 78th Annu Meet Jpn. Soc. Zotech Sci., (1986) 1 : 18.
- Eyestone, W. H., Vignieri, J. and First, N. L. : Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, (1989) 27 : 228.
- Rexroad, C. E. : Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, (1989) 31 : 105~114.
- Boland, M. P. : Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, (1984) 21 : 126~137.
- Camous, S., Heymen, Y., Méziou, W. and Ménézo, Y. : Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, (1984) 72 : 479~485.
- Voelkel, S. A., Amborski, G. F., Hill, K. G., et al. : Use of a uterine-cell monolayer culture system for micro-manipulated bovine embryos. *Theriogenology* (1985) 24 : 271~281.
- Fukui, Y. and Ono, H. : Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, (1989) 86 : 501~506.
- Bavister, B. D. : Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, (1988) 29 : 143~154.
- Eyestone, W. H. and First, N. L. : Co-culture of early



- cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, (1989) 85 : 715~720.
18. Fukui, Y. : Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-culture with bovine oviduct epithelial cells. *J. Anim. Sci.*, (1989) 67 : 1318~1323.
  19. Ellington, J. E., Farrell, P. B., Simkin, M. E., Foote, R. H., Goldman, E. E. and McGrath, A. B. : Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2-cell to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells, *J. Reprod. Fert.*, (1990) 89 : 293~299.
  20. Gandolfi, F. and Moor, R. M. : Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, (1987) 81 : 23~28.
  21. Rexroad, C. E., Jr. and Powell, A. M. : Co-culture of sheep ova and cells from sheep oviduct. *Theriogenology*, (1986) 25 : 187.
  22. Rexroad, C. E., Jr. and Powell, A. M. : Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *J. Anim. Sci.*, (1988) 66 : 947~953.
  23. Rexroad, C. E., Jr. and Powell, A. M. : Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, (1988) 29 : 387~397.
  24. Lu, H. H., Gordon, I., Gallagher, M. and McGovern, H. : Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, (1987) 121 : 259~260.
  25. Lawson, R. A. S., Rowson, L. E. A. and Adams, C. E. : The development of cow egg in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J. Reprod. Fert.*, (1972) 28 : 313~315.
  26. Kuwayama, M., Shioya, Y., Iwasaki, S., Okuyama, Y., Fukushima, M. and Hanada, A. : Effects of culture medium and time of transfer to the rabbit oviduct on the development capability of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, (1989) 35 : 1~6.
  27. Eyestone, W. H., and First, N. L. : Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. In : Brief Communications : 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 1988 ; 471~473.
  28. Eyestone, W. H., Jones, J. M. and First, N. L. : Some factors affecting the efficiency of oviduct tissue-conditioning medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, (1991) 92 : 59~64.
  29. Lindner, G. M. and Wright, R. W., Jr. : Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, (1983) 20 : 407~416.
  30. Kim, C. I., Ellington, J. E. and Foote, R. H. : Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, (1990) 33 : 433~440.
  31. Eyestone, W. H., Jones, J. M. and First, N. L. : The use of oviduct-conditioned medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology*, (1990) 33 : 226.
  32. Fukui, Y. and Ono, H. : *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.*, (1988) 122 : 282.
  33. Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P. B., Simkin, M. E. and Foote, R. H. : Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, (1990) 43 : 97~104.
  34. Utsumi, K., Kato, H. and Iritani, A. : Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, (1991) 35 : 695~703.
  35. Sirard, M. A. and Lambert, R. D. : Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.* (1986) 119 : 167~169.
  36. Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Moor, R. M. : Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fert.* (1989) 38 : 107~115.
  37. Allen, R. L., Wright, R. W. Jr. : *In vitro* development of porcine embryos in coculture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. *J. Anim. Sci.* (1984) 59 : 1657~1661.
  38. McCaffrey, C., Mcvov, T.G., Diskin, M.G., et al. : Successful co-culture of 1-4-cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.* (1991) 91 : 119~124.

# Effects of the Culture Media of Bovine Oviductal Epithelium on Development of the Early Bovine Embryos Derived from *in vitro* Fertilization

Jong-Im Park, D.V.M., M.S., Woo-Suk Hwang, D.V.M., Ph.D., Choong-HO Jo, D.V.M., Ph.D., Byeong-Chun Lee, D.V.M., M.S.

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

## Abstract

The present study was carried out to examine the effect of oviduct epithelium and its conditioned medium on the development of early bovine embryos *in vitro*. Oocytes obtained from ovarian follicles of slaughtered cows were cultured in TCM199 with 10% fetal calf serum for 22-24hrs and then fertilized *in vitro* using frozen-thawed semen treated with BO-caffein, BO-BSA(20mM heparin added). Oviduct epithelium was collected in each stage of the estrus cycle and conditioned medium was the medium in which oviduct epithelium in early luteal stage was cultured. *In vitro* fertilized bovine embryos of 1~2 cell were co-cultured with oviduct epithelium from different estrus cycles, cultured in conditioned medium, and cultured in rabbit oviduct. The cleavage rates of *in vitro* fertilized early bovine embryos co-cultured with oviduct epithelial cell from early luteal, luteal and follicular phase of estrus cycle(67.2~70.8%) and cultured in conditioned medium(56.7%) were significantly( $p < 0.05$ ) higher than that of the control(44.2%). The rate of development to morula or blastocyst stage in oviduct epithelial cell co-culture(15.3~32.5%) from three phase of estrus cycles and conditioned medium(14.5%) were significantly( $p < 0.05$ ) higher than that of the control(5.2%). The oviduct epithelial cell from early luteal phase gave a significantly( $p < 0.05$ ) higher rate of development to morula or blastocyst stage than both luteal and follicular phase. The results of *in vivo* culture in rabbit oviduct of early bovine embryos were 52.1% for the cleavage rate and 26.7% for the rate of development to morula or blastocyst stage.