

포유동물 초기배아와 수란관의 작용

김해권 · 윤용달* · 이영기**

서울여자대학교 자연과학대학 생물학과

The Early Mammalian Embryos and the Role of Oviduct

Kim, H. K., Y. D. Yoon* and Y. K. Lee**

Dept. of Biology, College of Natural Science, Seoul Woman's University

SUMMARY

The mammalian oviduct is a place where ontogeny of an animal begins. Nowadays, however, it is possible to manipulate a part of physiological events occurring in the oviduct so that fertilization of gametes and early embryonic development of zygotes could proceed outside oviductal environment. Rabbit zygotes readily develop to blastocysts in a conventional culture condition. Most of the mouse fertilized eggs do so when cultured under a specific environment, e. g., in a medium containing ethylenediamine tetraacetic acid. Similarly, a significant number of zygotes from rat, sheep, pig or cattle can develop to blastocysts if they are cultured in the presence of particular component which appear to be somewhat species-specific. Instead of changing the components of medium, somatic cells including oviductal epithelial cells, have widely been used to improve mammalian embryonic development *in vitro*. Many investigators have reported that mammalian zygotes, whether fertilized *in vivo* or *in vitro*, could develop to blastocysts when they were cultured on a monolayer of various kinds of somatic cells or even in a somatic cell-conditioned medium. While little is known about the nature of embryotrophic factor(s) produced *in vitro* by somatic cells, the existence of oviduct-specific protein(s) has consistently been demonstrated in many laboratories. Some of these proteins are reported to be associated with oviductal eggs. However, the physiological role of these proteins has still to be determined. Recently we observed that the perivitelline space of mouse oocytes was fluorescently stained with various fluorochrome-protein conjugates following ovulation into the oviducts or upon their exposure to oviductal extracts. Furthermore, it was also found that cattle or pig oviductal fluid gave similar results when examined using mouse ghost ZP. These observations lead to suggest that mammalian oviduct induces changes of biochemical properties of oocytes. Further studies are needed to clarify the nature of oviductal factor(s) and the physiological meaning of the reaction.

본 연구는 1994년도 교육부 기초과학 육성연구비(BSRI94-4437)로 이루어졌음.

* 한양대학교 자연과학대학 생물학과 (Dept. of Biology, College of Natural Science, Hanyang University)

** 강릉대학교 치과대학 해부학교실 (Dept. of Anatomy, College of Dentistry, Kangnung National University)

I. 서 론

포유동물의 개체발생은 자성생식기관인 수란관내에서 시작된다. 난소로부터 배란된 포유동물의 난자는 수란관내로 진입하며 이곳에서 정자와의 수정을 거쳐 대략 8세포기 혹은 상실배 등으로 발생한다. 이후 배아는 자궁내로 이동하여 배아를 둘러싸고 있는 투명대로부터 탈각(hatching)한 후 자궁내막조직에 착상하여 후기 배발생을 진행한다(Harper, 1994).

한편 생명과학기술의 급격한 발달은 수란관 및 자궁내에서 진행되는 수정 및 수정란의 초기 배발생을 체외에서도 부분적으로 가능하게 만들었고 그 결과 대부분의 포유동물의 체외수정은 축산, 의학분야 등에서 보편적인 기술이 되고 있다. 또한 수정된 난자의 체외에서의 착상전 포배로의 발생도 토끼(Kane, 1975)나 잠종생쥐(Whitten and Biggers, 1968) 등에서 성공적으로 이루어지고 있다. 그러나 이들 몇 경우를 제외한 대부분의 포유동물의 수정란은 체외배양시 착상전 포배로의 발생을 진행하지 못하고 중도에서 발생을 멈추는 체외발생중지현상을 나타낸다. 예를 들어 생쥐와 hamster의 수정란은 2세포기에서(Yanagimachi and Chang, 1964; Cross and Brinster, 1973; Whittingham and Bavister, 1974; Goddard and Pratt, 1983), 쥐나 돼지는 2~4세포기(Mayer and Fritz, 1974; Whittingham, 1975; Davis and Day, 1978), 그리고 소나 양은 8~16세포기(Wright and Bondioli, 1981) 등에서 발생을 중지한다. 이 같은 현상의 원인에 대해서는 거의 규명되지 않고 있는 반면 체외배양조건을 변화시킴으로써 체외발생률을 높이기 위한 시도들이 많이 진행되어 왔다. 그 결과 많은 경우에서 체외에서의 포배발생율이 현저히 증가하였지만 체내에서의 발생과 비교해 볼 때에 이들 결과는 여전히 미흡하며 앞으로 더욱 연구가 이루어져야 할 것이다. 여기에서는 전술한 내용과 관련한 근래의 여러 연구 결과들을 비교분석하고 덧붙여서 수란관의 기능과 관련한 본인등의 연구결과를 간략히 소개하고자 한다.

II. 생쥐 수정란의 체외발생

몇몇 잠종 생쥐를 제외한 대부분의 생쥐의 후기 2세

포기 배아는 체외배양시 대부분이 포배로 발생(Biggers, 1971)하지만 수정란을 배양하면 전술한 바와 같이 2세포기에서 발생을 중지한다. 이에 대한 원인은 밝혀지지 않고 있으나 근래에 와서 진핵세포 분열주기의 조절자로 알려진 maturation promoting factor (MPF)의 활성이 세포질내에 나타나지 않기 때문(Pratt and Muggleton-Harris, 1988)인 것으로 제안된 바 있다. 한편 ICR strain을 비롯한 다수의 Swiss albino 계열의 생쥐 수정란들은 배양액내에 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 존재하면 대부분이 포배로 발생하며(Abramczuk et al., 1977; Mehta and Kiessling, 1990), 이외에도 diethylenetriamine pentaacetic acid(DETAPAC), bovine apotransferrin(Nasr-Esfahani et al., 1990), superoxide dismutase(Noda et al., 1991), thioredoxin(Natsuyama et al., 1992) 혹은 putrescine(Sawicki et al., 1991) 등에 의해서도 포배로의 발생율을 상당히 증가시킬 수 있다(Table 1). 수란관내에 다량으로 존재하는 것으로 알려진 taurine(Miller and Schultz, 1987)도 잠종생쥐의 수정란의 체외발생율을 증가시킨다고(Dumoulin et al., 1992) 주장되고 있으나 그 효과는 미미하다.

이 같은 물질들이 어떻게 해서 생쥐 수정란의 체외배양시 포배로의 발생을 증가시킬 수 있는가에 대해서는 거의 규명이 되지 않고 있다. 전술한 EDTA는 ICR등의 생쥐 수정란의 발생에는 효과적이거나 같은 Swiss albino인 BALB/c strain 생쥐 수정란에 대해서는 거의 효과가 없으며 또한 EDTA와 유사하게 2가 이온의 chelating agent로 알려진 ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA)는 EDTA와 같은 효과를 전혀 갖지 못한다(Abramczuk et al., 1977). 이외에도 iron chelator 기능을 하는 bovine apotransferrin은 90%이상의 포배로의 발생효과를 나타내지만 human apotransferrin은 전혀 효과를 나타내지 못한다(Nasr-Esfahani et al., 1990). 또한 bovine apotransferrin이나 superoxide dismutase는 배아의 세포질내의 oxygen free radical의 증가를 억제함으로써 배발생을 도우는 것으로 제안되고 있으나 이들 단백질이 수정란이나 2세포기 배아의 세포막을 쉽게 통과하여 세포질 내로 들어갈 수 있는가는 불분명하다.

Table 1. Improved development of mouse zygotes *in vitro* by various materials

Chemicals	Examined period	% Development (Control)	Suggested function	References
EDTA	1CE - BL	70(30)	antioxidant	Abramczuk et al. (1977)
DETAPAC	1CE - BL	80	antioxidant	Nasr-Esfahani et al. (1990)
Bovine apotransferrin	1CE - BL	92(15)	antioxidant	Nasr-Esfahani et al. (1990)
Superoxide dismutase	1CE - BL	44.6(4.2)	antioxidant	Noda et al. (1991)
Thioredoxin	1CE - BL	70.2(3.8)	antioxidant	Natsuyama et al. (1992)
Putrescine	1CE - BL	35(3)	? antioxidant	Sawicki et al. (1992)
Taurine	1CE - BL	84(70)	lowering K ⁺ conc.	Dumoulin et al. (1992)

III. 기타 포유동물 수정란의 체외발생

생쥐 수정란의 체외에서의 포배발생율을 증가시키는 것으로 알려진 전술한 여러 물질들은 다른 포유동물의 수정란에 대해서는 대부분 유사한 효과를 나타내지 못하는 것으로 알려져 있다. 대신에 Table 2에서 보는 바와 같이 여타 포유동물의 체외배양은 생쥐와 다른 배양조건에서 많이 행해져 왔다.

Hamster의 2세포기 배아는 배양액의 크기를 기존의 40~100 μ 에서 0.7~0.8 μ 정도로 줄였을 때 약 26%가 발생중지 시기를 지나 4세포기 배아로 발달하며(Schini and Bavister, 1988) 또한 배양액에 약 1 mM농도의 hypotaurine이 첨가되면 수정란의 14%가 상실배 혹은 포배로 발생한다(Barnett and Bavister, 1992). Taurine 역시 토끼의 수정란(Li et al., 1993)이나 돼지의 경우(Reed et al., 1992)에 상당히 효과적으로 발생을 증가시킨다. 한편 배양기내에 산소의 농도를 5%로 낮춰서 공급하면 토끼의 수정란(Li and Foote, 1993)이나 양의 2세포기배아(Thompson et al., 1990)는 상당수가 포배로 발생하는 것을 볼 수 있다. 이외에 mercaptoethanol이나 cysteamine과 같은 thiol compound도 배양액에 첨가되면 포배로의 발생율을 현저히 증가시킨다(Takahashi et al., 1993).

한편 몇몇 동물들의 경우 기존의 배양액내의 phosphate 혹은 glucose등의 물질이 배발생중지현상의 원인이 된다는 주장도 있다. 쥐의 수정란(Miyoshi et al., 1994)이나 hamster의 4세포기 배아(Monis and

Bavister, 1990)는 배양액내의 phosphate에 의해 발생이 억제되며 소의 수정란(Pinyopummintr and Bavister, 1991)이나 돼지의 수정란 및 2세포기 배아(Petters et al., 1990)는 phosphate와 glucose에 의해 발생이 억제된다. 그러나 토끼의 수정란은 glucose의 존재에 상관없이 포배로 발생하며(Kane, 1987) 생쥐의 초기배아는 포배로 발생하기 위해서는 glucose의 존재가 필요하다(Brown and Whittingham, 1991).

결국 이러한 연구결과들로 미루어 볼 때 포유동물의 수정란 혹은 초기배아의 체외발생조건은 동물의 종에 따라 서로 다른 것으로 여겨지며 만일 이들 동물의 체외발생중지현상의 원인이 공통적인 것이라면 배양액내의 각종 화학물질들의 조성이 직접적인 원인이 되지는 않을 것으로 보인다.

IV. 체세포와의 공동배양에 의한 소 수정란의 체외발생

배양액의 조성을 변화시키는 방법과는 달리 근래에 와서는 체내와 유사한 체외배양환경을 만들어 줌으로써 포배로의 발생율을 높이는 연구가 많이 진행되고 있다. 즉 수란관 상피세포를 포함하여 여러가지 체세포와 공동배양함으로써 수정란의 체외발생율을 높이 고자 하는 것들이다. 이들중 소의 수정란을 대상으로 한 비교적 최근의 연구결과들을 보면(Table 3) granulosa cell과 공동배양할 경우 수정란의 25.7%가 포배로 발생하는데 이는 수정란 단독 배양시 11%의 포배발생율에 비해 2배이상으로 효과적이다(Goto et

Table 2. Improved *in vitro* development of mammalian early embryos by various culture conditions

Species	Culture condition	Examined period	% Development (Control)	Suggested function	References
Hamster	microdrop	2CE - 4CE	26.0(1.1)	low oxygen tension	Schini & Bavister(1988)
	hypotaurine	1CE - M /BL	14(0)	antioxidant	Barnett & Bavister(1992)
Rabbit	low oxygen	1CE - HB	72(29)	low oxygen tension	Li & Foote(1993)
Bovine	β -ME	6-8CE - BL	34(7)	antioxidant	Takahashi et al. (1993)
	cysteamine	6-8CE - BL	30(7)	antioxidant	Takahashi et al. (1993)
Ovine	low oxygen	2CE - M	58	low oxygen tension	Thompson et al. (1990)

Table 3. Effects of growth factors on mammalian preimplantation development

Species	Growth factors	Examined period	% Development (Control)	References
Mouse	EGF		85.7(49.2)	Paria & Dey(1990)
	TGF- α		89.2(49.2)	
	TGF- β 1	2CE - BL	88.9(49.2)	
	EGF + TGF- β 1		86.7(27.6)	
	IGF-1		52.6(49.2)	
Bovine	Insulin	ICM cell no.	23% increase	Shi et al. (1994)
	PDGF	8CE - M /BL	42.4(14.0)	Thibodeaux et al.(1993)
	Insulin	1CE - BL	37(0)	Seidel et al.(1991)
	TGF- β +bFGF	2CE - 16CE	48.5(0)	Larson et al.(1992)
Porcine	IGF-1	Egg \rightarrow 8CE	21.8(2.3)	Xia et al.(1994)

al., 1994). 또한 수란관의 상피세포와 공동배양할 경우 수정란 혹은 2세포기 배아는 배양액에 따라 10~40%에 이르는 높은 포배발생율을 나타내며(Ellington et al., 1990a;1990b), 이외에도 trophoblastic cell(Camous et al., 1984; Heyman et al., 1987), uterine cell(Voelkel et al., 1985), buffalo rat liver(BRL) cell(Rehman et al., 1994)등을 사용하여도 상당한 효과를 볼 수 있다. 그리고 이와 같은 공동배양에 의한 포배발생율의 증가현상은 체세포와 직접 공동배양시 뿐만 아니라 체세포를 먼저 배양한 후의 conditioned medium을 사용하여도 나타난다(Eyestone et al., 1991; Mermillod et al., 1993).

V. 체세포와의 공동배양에 의한 기타 포유동물 초기배아의 체외발생

소 이외의 여러 포유동물의 초기배아를 체외에서 체세포와 공동배양한 연구결과를 Table 4에 간단히 요

약하였다. 표에서 보는 것처럼 생쥐(Minami et al., 1992), 돼지(White et al., 1989), 양(Rexroad et al., 1993; Watson et al., 1994)의 수정란 혹은 2세포기 배아를 수란관 조직세포와 공동배양한 경우 대조군에 비해 포배로의 발생율이 매우 높은 것을 볼 수 있다. 또한 소의 경우와 마찬가지로 다른 체세포와의 공동배양도 상당한 효과를 나타낸다. 생쥐 수정란은 peritoneal macrophage와 공동배양하면 36.4%의 포배발생율을 보임으로써 단독배양시 0.76%에 비해 현저한 증가를 보이며(Honda et al., 1994), 돼지 2세포기 배아(White et al., 1989)나 양의 수정란(Rexroad et al., 1993)을 각각 fetal fibroblast나 형질전환된 mouse embryonic fibroblast line인 STO cell과 공동배양하여도 대조군에 비해 포배로의 발생율이 매우 높다. 이외에 생쥐의 수정란(Whittingham, 1968)이나 hamster의 2세포기 배아(Minami et al., 1988)를 생쥐 수란관에 넣어 체외에서 기관배양하더라도 다수의 배아가 발생증지현상을

Table 4. Improved development of bovine early embryos *in vitro* by co-culture with somatic cells

Somatic cell type	Examined period	% Development (Control)	References
Granulosa cells	1CE - BL	25.7(11.0)	Goto et al. (1994)
Cumulus + Granulosa cells	1CE - BL	31.2(3.1)	Broussard et al. (1994)
Oviductal epithelial cells	1,2CE - BL	14	Ellington et al. (1990a)
Oviductal epithelial cells	1,2CE - BL	39	Ellington et al. (1990b)
Oviductal epithelial cells	1CE - M+BL	65.9(21.6)	Xu et al. (1992)
BOEC conditioned medium	1CE - BL	27(8)*	Mermillod et al. (1993)
BRL cells	8CE - BL	61.4(31.8)	Rehman et al. (1994)

* Suggested that proteinaceous factors might be responsible for the improved embryonic development.

극복하여 포배로 발생한다.

VI. 수란관 특이단백질과 포유동물 난자와의 관계

앞에서 본 바와 같이 포유동물 수정란의 체외발생은 체외배양시 체세포 특히 수란관 상피세포와 공동배양될 경우, 다수가 체외발생중지 시기를 지나 포배로 발생한다. 체세포에 의한 이 같은 발생 증가효과는 크게

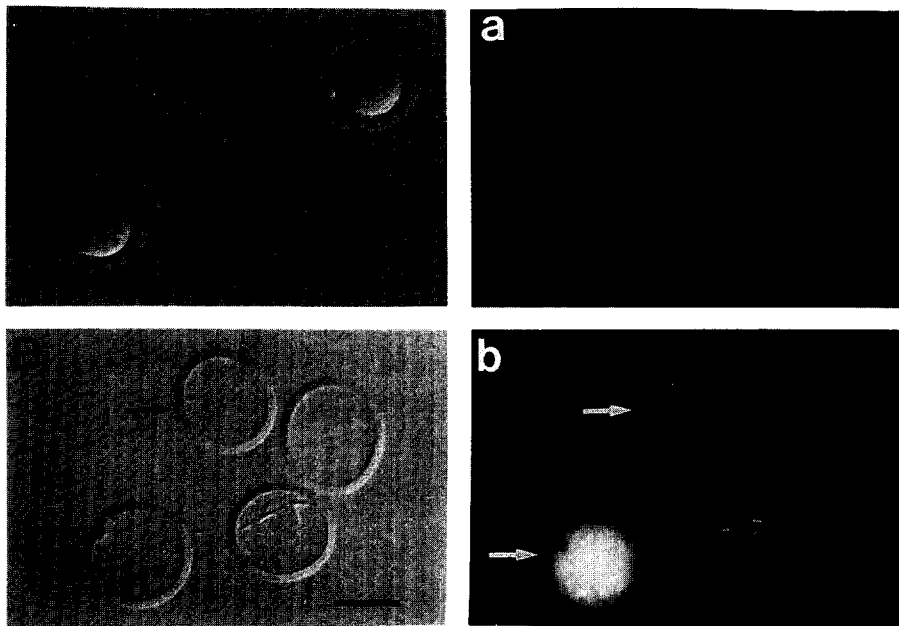


Fig. 1. Photomicrographs of mouse oocytes (A, a) and ghost ZP (B, b) as viewed under bright field (A, B) or epifluorescence (a, b) microscope. (A, a) An oocyte incubated within oviduct for 20 hr (right) exhibits distinct fluorescence within its PVS following staining with FITC-casein whereas the other oocyte incubated without oviduct (left) is not stained. (B, b) Arrows indicate ghost ZP which were incubated within oviducts for 20 hr followed by staining with FITC-casein. Note the uniformly distributed fluorescence within PVS of these ZP. Other ZP that were incubated without oviduct are not stained. Scale bar = 50 μ m.

두가지로 설명될 수 있다.

첫째, 체외배양시 나타나는 superoxide나 H_2O_2 와 같은 reactive oxygen(Pabon et al., 1989; Nasr-Esfahani and Johnson, 1991)을 포함한 여러 유독 물질들을 체세포가 제거해줌으로써 보다 나은 배양환경을 조성해 주는 것이다. Table 1 및 2에서 보는 바와 같이 여러가지 방법에 의한 배양액내의 reactive oxygen의 감소는 체외에서의 포배발생율의 증가를 가

적온다.

둘째, 체세포에 의해 배발생을 유도하는 물질들이 생성되어 포배로의 발생율이 높아지는 것이다. 포유동물의 수정란 혹은 초기배아는 체외에서 단독으로 배양될 때 각종 성장인자들에 의해 포배로의 발생이 상당히 향상되며(Paria and Dey, 1990; Seidel et al., 1991; Larson et al., 1992; Thibodeaux et al., 1993; Xia et al., 1994), 이 성장인자들중의 일부는

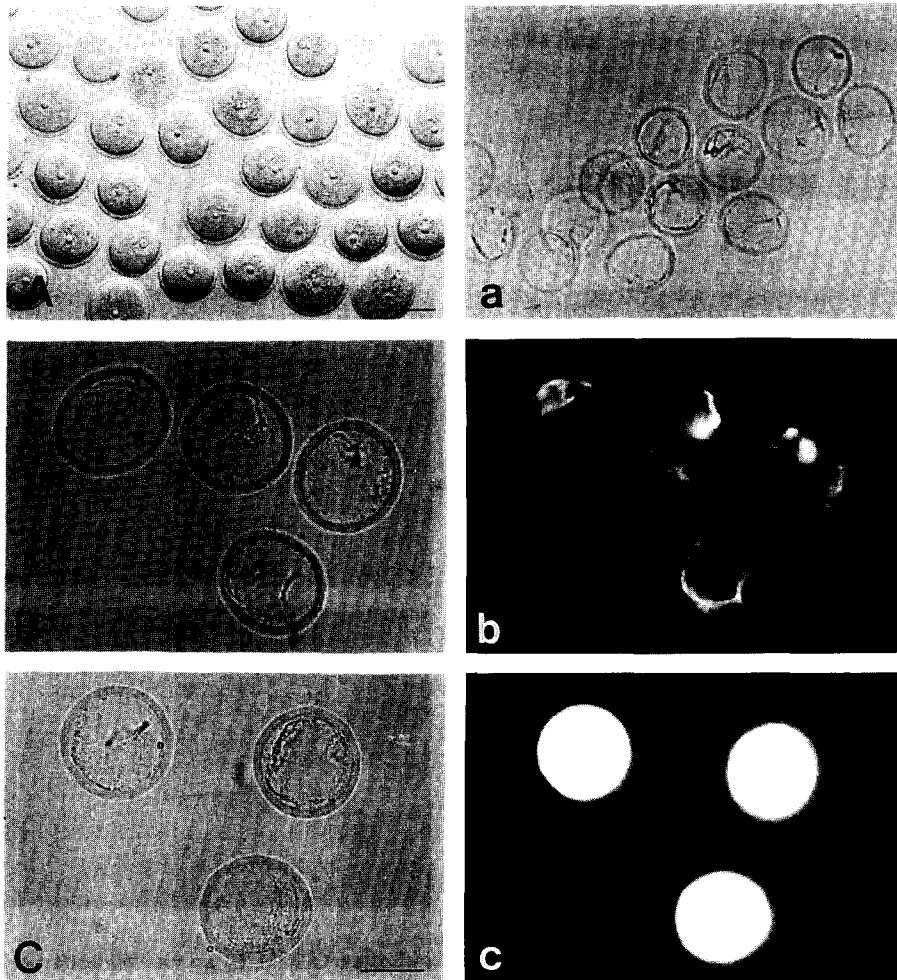


Fig. 2. Photomicrographs of mouse oocytes and ghost ZP as viewed with brightfield (A, a, B, C) or epifluorescence (b, c) microscope. A ; GV oocytes. a : ghost ZP obtained from A. B, b ; ghost ZP before treatment with bovine oviductal fluid. C, c : ghost ZP after treatment with bovine oviductal fluid. Scale bar = 50 μ m.

수란관내에 존재하는 것으로 알려져 있다(Wiseman et al., 1992; Kennedy et al., 1994). 또한 일부 성장 인자들은 초기배아의 할구에 있는 수용체와 결합하는 것이 확인되었다(Paria et al., 1992; Dardik et al., 1992; Watson et al., 1992).

이외에 체세포 특히 수란관상피세포에 의한 포배발생 증가현상에는 조직세포에서 분비되는 저분자량물질 혹은 단백질 성분의 물질이 관여하는 것으로 여겨지나(Minami et al., 1992; Mermillod et al., 1993), 그 본질에 대해서는 거의 규명되지 않고 있다.

Ⅶ. 수란관단백질에 의한 생쥐난자 위난강의 형광염색 특성변화

포유동물의 수란관조직은 수란관특이 단백질을 포함하여 많은 종류의 단백질을 합성 및 분비하는데 이들 중 일부는 난자나 배아의 투명대, 위난강 혹은 할구에 결합한다(Kapur and Johnson, 1986; Léveillé et al., 1987; Kan et al., 1989; Boice et al., 1990; Gandolfi et al., 1991; Wegner and Killian, 1991). 그러나 배발생과 관련된 이들 단백질의 역할에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

최근 들어 본인 등(Kim and Schuetz, 1993)은 난소로부터 배란된 난자가 수란관이란 환경에 노출되면 fluorescein isothiocyanate로 표지된 casein(FITC-casein)이나 bovine serum albumin(FITC-BSA) 등의 여러 형광물질에 의해 난자의 위난강이 염

색되는 것을 관찰한 바 있다(Fig. 1A and a). 생쥐 수란관에 의한 이러한 효과는 난소내 미성숙난자로부터 세포질이 제거된 속이 빈 투명대(ghost ZP)를 얻어 이를 재료로 하였을 때도 관찰되는 것으로 보아(Fig. 1B and b) 난자의 세포질과는 상관없이 전적으로 수란관에 의한 작용으로 여겨진다. 또한 생쥐뿐만 아니라 소나 돼지의 수란관 추출액을 처리하여도 같은 현상이 나타나는데(Fig. 2) 이때 수란관 내액을 trypsin 혹은 가열처리하면 활성이 사라지는 것이 관찰된다(Table 5). 또한 속이 빈 투명대를 소의 수란관내액으로 처리한 후 전기영동 분석을 한 결과 각각 32KD 및 25KD의 분자량을 갖는 두 개의 단백질이 속이 빈 투명대에 결합하는 것이 발견되었다(Fig. 3). 이와 같은 실험결과로 미루어 포유동물의 수란관은 난자 위난강의 생화학적 특성 변화를 일으키게 하는 특별한 활성을 지니며 이는 단백질 성분에 의한 것으로 판단된다. 그러나 이 같은 현상이 소나 돼지 등 다른 포유동물의 수란관내 난자에서도 나타나는지 또한 생쥐 난자에 영향을 주는 소의 수란관 요인이 위의 두 단백질이 주요 인자인지는 분명하지 않다. 수란관에 의한 난자위난강의 형광염색 특성의 생물학적 의미를 규명하기 위해서는 앞으로 더욱 연구가 진행되어야 할 것이다.

Ⅷ. 결 론

포유동물 초기배아의 체외배양시 포배로의 발생을 늘이려는 시도는 방법에 따라 크게 두 가지로 나누

Table 5. Effect of trypsin or heat treated bovine oviductal fluid on the fluorescence staining of intrazonal space of mouse ghost ZP with FITC-casein

Treatment	No. of ghost ZP examined	Negative	Positive	% of positive staining
Control	31	0	31	100 ^a
Trypsin	36	29	7	19 ± 2.15 ^a
Control	29	1	28	82.25 ± 5.4 ^a
Heat	30	30	0	0 ^a

^a The data are expressed as the percentage of mean ± SD from 4 independent experiments. A group of ghost ZP was incubated in medium containing 50% bovine oviductal fluid(Control), and another group was incubated in medium containing of 50% bovine oviductal fluid that was pre-treated with 0.001% trypsin(Trypsin) or heated at 60°C for 10min(Heat). All incubations were done at 37°C for 3 hrs.

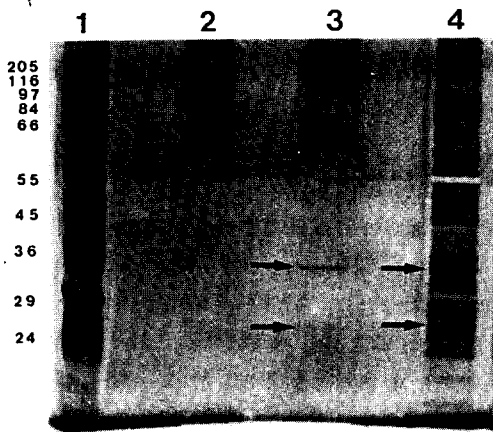


Fig. 3. Silver-stained nondenaturing SDS-PAGE of mouse ghost ZP incubated with bovine oviductal fluid (lane 3, 200 ghost ZP) or without (lane 2, 200 ghost ZP). Lane 1 ; molecular weight standards(Sigma, wide range). Lane 4 ; bovine oviductal fluid (1 μ g). Arrows indicate 32 kd and 24 kd bovine oviductal protein bands which associate with mouse ghost ZP.

어 볼 수 있다. 하나는 기존의 배양액내에 각종 물질을 첨가하거나 제거함으로써 배양액의 조성을 변화시키는 것이고 다른 하나는 체세포 특이 수란관 상피세포 등과 공동배양함으로써 체내와 유사한 환경을 조성해 주는 것이다. 전자의 경우 생쥐, 쥐 등 몇몇 실험동물에 대해서는 매우 효과적이거나 소, 양, 돼지 등 거대 가축의 체외배양에는 그다지 높은 효과를 나타내지 않는다. 반면 후자의 경우 전자와 비교해 볼 때 대부분은 포유동물에서 상당히 효과적인 결과를 보여주지만 이 또한 체내에서의 발생과 비교해 보면 여전히 미흡하다. 이에 대한 원인 중의 하나는 체외배양되는 체세포가 체내에서와 같은 역할을 하지 못하기 때문이며 궁극적으로는 밝혀져 있지 않기 때문이다. 근래에 와서 생식수관 상피세포의 배양시 기존의 monolayer와는 다른 3차원적인 방법(Joshi, 1991 ; Bentin-Ley et al., 1994) 즉 체내와 비교적 유사한 환경을 만들려는 노력들이 시도되고 있다. 수정란의 체외배양시 이 새로운 방법이 어떤 방법이 어떤 결과를 미칠지 그 결과가 주목된다.

IX. 적 요

포유동물의 개체발생은 생체내 수란관에서 이루어진다. 그러나 현대 과학기술의 급격한 발달은 생체 내에서의 생명현상을 체외에서도 가능하게 하였다. 그 결과 일부 포유동물의 수정란은 체외에서도 착상 전 발생단계인 포배로의 발생이 성공적으로 이루어지고 있다. 토끼의 수정란은 체외에서 배양하면 대부분이 포배로 발생하며, 생쥐의 수정란은 EDTA 혹은 여러 가지 화학물질이 배양액에 존재하면 대부분 포배로 발생한다. 또한 소, 돼지, 양 등의 수정란도 종에 따라 배양액의 조성을 각각 달리함으로써 일부가 포배로 발생하는 것을 볼 수 있다. 이외에도 배양액에 각종 성장인자들을 첨가함으로써 수정란의 체외발생율을 상당히 높일 수 있다. 한편 이와는 달리 수란관을 이용한 기관 배양법 혹은 수란관을 비롯한 여러 조직으로부터 얻은 체세포와의 공동배양방법도 널리 사용되어 오고 있다. 특히 근래에 와서 수정란을 여러가지 체세포와 공동배양하거나 혹은 체세포를 배양한 배양액 내에 넣어 체외배양하면 포배로의 발생율이 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 포유동물 수정란의 체외 발생을 가능하게 하는 여러 조직세포, 그중에서도 특히 수란관 조직세포의 작용에 많은 관심이 집중되고 있다. 최근의 연구결과들을 보면, 수란관 내로 배란된 난자들은 몇몇 수란관 특이 단백질과 결합하는 것이 알려져 있으며 배발생과 관련한 이들 당단백질의 작용에 관한 연구가 상당히 진행되고 있다. 본인 등도 수란관이란 환경이 배란전 생쥐난자의 형광염색특성 변화를 유도하는 것을 관찰한 바 있으며 이러한 작용은 생쥐뿐만 아니라 소의 수란관 내액에 의해서도 일어나는 것을 조사한 바 있다. 이 같은 변화가 갖는 생리학적인 의미를 포함하여 초기 배발생을 가능하게 하는 수란관의 작용기작은 앞으로의 연구를 통해서 규명되어야 할 것이다.

X. 인용문헌

1. Abramczuk, J., D. Solter, and H. Koprowski. 1977. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos

- in chemically defined medium. *Dev. Biol.*, 61:378-383.
2. Barnett, D. K., and B. D. Bavister. 1992. Hypotaurine requirement for *in vitro* development of golden hamster one-cell embryos into morulae and blastocysts, and production of term offspring from *in vitro*-fertilized ova. *Biol. Reprod.*, 47:297-304.
 3. Bentin-Ley, U., B. Pedersen, S. Lindenberg, J. F. Larsen, L. Hamberger, and T. Horn. 1994. Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. *J. Reprod. Fert.*, 101:327-332.
 4. Biggers, J. D. 1971. New observations on the nutrition of the mammalian oocyte and the preimplantation embryo. In "The Biology of the Blastocyst" (R. J. Blandau, ed.), pp. 319-327.
 5. Boice, M. L., T. J. McCarthy, P. A. Mavrogianis, A. T. Fazleabas, and H. G. Verhage. 1990. Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio anubis*). *Biol. Reprod.*, 43:340-346.
 6. Broussard, J. R., S. G. Prough, J. K. Thibodeaux, J. Blackwell, M. W. Myers, R. A. Godke, J. D. Roussel. 1994. Frozen-thawed cumulus-granulosa cells support bovine embryo development during coculture. *Fertil. Steril.*, 62(1):176-179.
 7. Brown, J. J. D., and D. G. Whittingham. 1991. The role of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F₁ hybrid mice *in vitro*. *Development*, 112:99-105.
 8. Camous, S., Y. Heyman, W. Méziou, and Y. Ménézo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:479-485.
 9. Cross, P. C., and R. L. Brinster. 1973. The sensitivity of one-cell mouse embryos to pyruvate and lactate. *Exp. Cell Res.*, 77:57-62.
 10. Dardik, A., R. M. Smith, and R. M. Schultz. 1992. Colocalization of transforming growth factor- α and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of EFGR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.*, 154:396-409.
 11. Davis, D. L., and B. N. Day. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 46:1043-1053.
 12. 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 development of mouse embryos *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 94:373-380.
 13. Ellington, J. E., E. W. Carney, P. B. Farrell, M. E. Simkin, and R. H. Foote. 1990. Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, 43:97-104.
 14. Ellington, J. E., P. B. Farrell, M. E. Simkin, R. H. Foote, E. E. Goldman, and A. B. McGrath. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 89:293-299.
 15. Eyestone, W. H., J. M. Jones, and N. L. First. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, 92:59-64.
 16. Gandolfi, F., S. Modena, T. A. L. Brevini, C. Galli, R. M. Moor, and A. Lauria. 1991.

- Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur. J. Basic. Appl. Histochem.*, 35:383-392.
17. Goddard, M. J., and H. P. M. Pratt. 1983. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the '2-cell block'. *J. Emb. Exp. Mor.*, 73:111-133.
 18. Goto, K., N. Iwai, K. Ide, Y. Takuma and Y. Nakanishi. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro*: comparison of cell-free culture with co-culture. *J. Reprod. Fert.*, 100:239-243.
 19. Harper, M. J. K. 1994. Gamete and zygote transport. In: *The physiology of reproduction*, ed. E. Knobil & J. D. Neill, vol. 1, pp. 123-187. New York: Raven Press.
 20. Heyman, Y., Y. Ménézo, P. Chesné, S. Camous, and V. Garnier. 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improvement using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:59-68.
 21. Honda, R., K. Matsuura, Y. Fukumatsu, T. Kawano, and H. Okamura. 1994. *In-vitro* enhancement of mouse embryonic development by co-culture with peritoneal macrophages. *Hum. Reprod.*, 9(4):692-696.
 22. Joshi, M. S. 1991. Growth and differentiation of the cultured secretory cells of the cow oviduct on reconstituted basement membrane. *J. Exp. Zool.*, 260:229-238.
 23. Kan, F. W. K., S. St-Jacques, and G. Bleau. 1989. Immunocytochemical evidence for the transfer of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biol. Reprod.*, 40:585-598.
 24. Kan, M. T. 1975. Bicarbonate requirements of one-cell rabbit ova to blastocysts. *Biol. Reprod.*, 12:552-555.
 25. Kane, M. T. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 37:775-778.
 26. Kapur, R. P., and L. V. Johnson. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.*, 238:249-260.
 27. Kennedy, T. G., K. D. Brown, and T. J. Vaughan. 1994. Expression of the genes for the epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine oviduct and endometrium. *Biol. Reprod.*, 50:751-756.
 28. Kim, H., and A. W. Schuetz. 1993. Structural and functional differentiation of mouse oocytes visualized with FITC-protein conjugates. *Zygote*, 1:297-307.
 29. Larson, R. C., G. G. Ignatz, and W. B. Currie. 1992. Transforming growth factor and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:432-435.
 30. Li, J., and R. H. Foote. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. *J. Reprod. Fert.*, 98:163-167.
 31. Li, J., R. H. Foote, and M. Simkin. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 48:33-37.
 32. Léveillé, M. C., K. D. Roberts, S. Chevalier, A. Chapdelaine and G. Bleau. 1987. Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.*, 36:227-238.
 33. Mayer, J. F., and H. I. Fritz. 1974. The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. *J. Reprod. Fert.*, 39:1-9.
 34. McKiernan, S. H., and B. B. Barvister. 1990. Environmental variable influencing *in*

- in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 43:404-413.
35. Mehta, T. S., and A. A. Kiessling. 1990. Development potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. Biol. Reprod., 43:600-606.
 36. Mermillod, P., A. Vansteenbrugge, C. Wils, J-L. Mourmeaux, A. Massip. and F. Dessy. 1993. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. Biol. Reprod., 49:582-587.
 37. Miller, J. G. O. and G. A. Schultz. 1987. Amino acid content of preimplantation embryos and fluid of the reproductive tract. Biol. Reprod., 36:125-129.
 38. Minami, N., B. D. Bavister, and A. Iritani. 1988. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system. Gamete Res., 19:235-240.
 39. Minami, N., K. Utsumi, and A. Iritani. 1992. Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 96:735-745.
 40. Miyoshi, K., H. Funahashi, K. Okuda, and K. Niwa. 1994. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. J. Reprod. Fert., 100:21-26.
 41. Monis, H. M., and B. D. Bavister. 1990. Analysis of the inhibitory effect of inorganic phosphate on development of 4-cell hamster embryos *in vitro*. J. Exp. Zool., 256:75-83.
 42. Nasr-Esfahani, M., M. H. Johnson and R. J. Aitken. 1990. The effect of iron and iron chelators on the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos *in vitro*. Hum. Reprod., 5:997-1003.
 43. Nasr-Esfahani, M. H., and M. H. Johnson. 1991. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. Development, 113:551-561.
 44. Nasr-Esfahani, M. H., N. J. Winston, and M. H. Johnson. 1992. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on the development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. J. Reprod. Fert., 96:219-231.
 45. Natsuyama, S., Y. Noda, K. Narimoto, Y. Umaoka and T. Mori. 1992. Release of two-cell block by reduction of protein disulfide with thioredoxin from *Escherichia coli* in mice. J. Reprod. Fert., 95:649-656.
 46. Noda, Y., H. Matsumoto, Y. Umaoka, K. Tatsumi, J. Kishi, and T. Mori. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. Mol. Reprod. Dev., 28:356-360.
 47. Pabon, J. E., W. E. Findly, and M. D. Gibbons. 1989. The toxic effects of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil. Steril., 51:896-900.
 48. Paria, B. C., K. L. Jones, K. C. Flanders, and S. K. Dey. 1992. Localization and binding of transforming growth factor- β isoforms in mouse preimplantation embryos and in delayed and activated blastocysts. Dev. Biol., 151:91-104.
 49. Paria, B. C., and S. K. Dey. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro* : Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4756-4760.
 50. Petters, R. M., B. H. Johnson, M. L. Reed,

- and A. E. Archibong. 1990. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo *in vitro*. J. Reprod. Fert., 89:269-275.
51. Pinyopummintr, T., and B. D. Bavister. 1991. *In vitro*-matured /*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae /blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. Biol. Reprod., 45:736-742.
 52. Pratt, H. P. M., and A. L. Muggleton-Harris. 1988. Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in the cultured 2-cell mouse embryo. Development, 104: 115-120.
 53. Reed, M. L., M. J. Illera, and R. M. Petters. 1992. *In vitro* culture of pig embryos. Theriogenology, 37:95-109.
 54. Rehman, N., A. R. Collins, T. K. Suh, and R. W. Wright, JR. 1994. Development of IVM-IVF produced 8-cell bovine embryos in simple, serum-free media after conditioning or co-culture with buffalo rat liver cells. Mol. Reprod. Dev., 38:251-255.
 55. Rexroad, C. E. Jr., and A. M. Powell. 1993. Development of ovine embryos co-cultured on oviductal cells, embryonic fibroblasts, or STO cell monolayers. Biol. Reprod., 49: 789-793.
 56. Rieger, D., N. M. Loskutoff, and K. J. Betteridge. 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. J. Fert. Reprod., 95:585-595.
 57. Sawicki, J. A., A. Impellizeri, and T. G. O'Brien. 1991. Effects of exogenous putrescine on murine preimplantation development *in vitro*. Dev. Biol., 148:620-624.
 58. Schini, S. A., and B. D. Bavister. 1988. Development of golden hamster embryos through the two-cell block in chemically defined medium. J. Exp. Zool., 245:111-115.
 59. Seidel, G. E. Jr., T. Glass, and S. E. Olson. 1991. Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. Biol. Reprod., 44(Suppl. 1): 155(abstract).
 60. Takahashi, M., T. Nagai, S. Hamano, M. Kuwayama, N. Okamura, and A. Okano. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol. Reprod., 49:228-232.
 61. Thibodeaux, J. K., R. P. Del Vecchio, and W. Hansel. 1993. Role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. J. Reprod. Fert., 98:61-66.
 62. 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. Fert., 89:573-578.
 63. Voelkel, S. A., G. F. Amborski, K. G. Hill, and R. A. Godke. 1985. Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. Theriogenology, 24:271-281.
 64. Watson, A. J., A. Hogan, A. Hahnel, K. E. Wiemer, and G. A. Schultz. 1992. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. Mol. Reprod. Dev., 31:87-95.
 65. Watson, A. J., P. H. Watson, D. Warnes, S. K. Walker, D. T. Armstrong, and R. F. Seamark. 1994. Preimplantation development of *in vitro*-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. Biol. Reprod., 50:715-724.
 66. Wegner, C. C., and G. J. Killian. 1991. In

- vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:77-84.
67. White, K. L., K. Hehnke, L. F. Rickords, L. L. Southern, D. L. Thompson, Jr., and T. C. Wood. 1989. Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. Reprod.*, 41:425-430.
 68. Whitten, W. K., and J. D. Biggers. 1968. Complete development *in vitro* of the pre-implantation stage of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 17:399-401.
 69. Whittingham, D. G. 1968. Development of zygotes in cultured mouse oviducts. I. The effect of varying oviductal conditions. *J. Exp. Zool.*, 169:391-397.
 70. Whittingham, D. G. 1975. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, 43:575-578.
 71. Whittingham, D. G., and B. D. Bavister. 1974. Development of hamster eggs fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fert.*, 38:489-492.
 72. Wiseman, D. L., D. M. Henricks, D. M. Eberhardt, and W. C. Bridges. 1992. Identification and content of insulin-like growth factors in porcine oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, 47:126-132.
 73. Wright, R. W., Jr., and K. R. Bondioli. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sci.*, 53:702-729.
 74. Xia, P., F. R. Tekpetey, and D. T. Armstrong. 1994. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:373-379.
 75. Xu, K. P., B. R. Yadav, R. W. Rorie, L. Plante, K. J. Betteridge and W. A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 94:33-43.
 76. Yanagimachi, R., and D. T. Chang. 1990. *In vitro* fertilization of golden hamster ova. *J. Exp. Zool.*, 156:361-378.