

한우 체외수정란의 체외배양, 동결보존 및 이식에 관한 연구

I. 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 공배양세포와 성장인자의 효과

김일화 · 손동수 · 이호준 · 최선호 · 양병철 · 이광원 · 김경남 · 장인호*
축산기술연구소

Studies on *In Vitro* Culture, Freezing and Transfer of Korean Native Cattle Embryos Fertilized *In Vitro* I. Effect of Co-culture Cells and Growth Factors on *In Vitro* Development of Korean Native Cattle Embryos Fertilized *In Vitro*

I. H. Kim, D. S. Son, H. J. Lee, S. H. Choi, B. C. Yang, K. W. Lee,
K. N. Kim and I. H. Chang*

National Livestock Research Institute

SUMMARY

The present study was carried out to investigate the effects of co-culture cells and growth factors on *in vitro* culture of Korean native cattle(KNC) embryos fertilized *in vitro*. Two-eight cell embryos were cultured *in vitro* using 4 types of co-culture cells and 3 growth factors singly or in combination. The results were as follows:

In the co-culture of 2~8 cell embryos with bovine oviductal epithelial cell(BOEC), granulosa cell(BGC), uterine epithelial cell(BUEC) and mouse embryonic fibroblast(MEF) monolayers, the developing rate to blastocysts was significantly($P < 0.05$) higher with BUEC(32.1%) than with MEF(15.3%), BGC(13.2%) and non co-culture control(11.6%). When the morula co-cultured with BOEC for 5 days following *in vitro* fertilization were co-cultured with BOEC continuously or with BUEC, respectively, the developing rate to blastocysts was higher with BUEC(73.9%) than with BOEC(56.0%).

To examine the effects of growth factors on *in vitro* development of 2~8 cell embryos, epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) and insulin-like growth factor-1(IGF-1) were added singly or in combination to TCM 199 maturation medium with respective concentration. In a addition of each 10, 30 and 50ng/ml EGF, the developing rate to blastocysts was the highest in 10ng/ml EGF(25.3%). In addition of each 1, 2 and 5ng/ml TGF- β 1, the developing rate to blastocysts was the highest in 1ng/ml TGF- β 1(28.8%). In addition of each 50, 100ng/ml IGF-1, the developing rate to blastocysts was higher in 100ng/ml IGF-1(16.5%) than in 50ng/ml IGF-1(12.9%). When

* 경북대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Kyungbuk National University)

10ng/ml EGF and 1ng/ml TGF- β 1 was added singly or in combination, the developing rate to blastocysts was similar in groups added singly or in combination with EGF and TGF- β 1 (23.1~24.6%), although higher than in control(16.7%). In the co-culture of 2~8 cell embryos with BOEC + each 10, 30 and 50ng/ml EGF, the developing rate to blastocysts was significantly($p < 0.05$) higher in BOEC + 10ng/ml EGF(32.3%) than in BOEC + 30ng/ml EGF(18.9%) and BOEC + 50ng/ml EGF(9.7%). In the co-culture of 2~8 cell embryos with BOEC + each 1, 2, 5ng/ml TGF- β 1, the developing rate to blastocysts was higher in BOEC + 5ng/ml TGF- β 1(28.2%) than in BOEC + 1ng/ml TGF- β 1(21.7%) and BOEC + 2ng/ml TGF- β 1(21.4%).

In summary, higher developing rate to blastocysts were obtained with co-culture of BUEC for co-culture system, with addition of 10ng/ml EGF or 1ng/ml TGF- β 1 for growth factor culture system, and with co-culture of BOEC + 10ng/ml EGF or BOEC + 5ng/ml TGF- β 1 for co-culture + growth factor culture system.

(Key words : *in vitro* culture, co-culture cells, growth factors)

서론

소 난자의 체외수정은 1970년대에 시작되었으며 (Brackett 등, 1978; Iritani와 Niwa, 1977; Edwards, 1973) 1981년 체외수정에 의해 처음 송아지가 생산된(Brackett 등, 1982) 이후 활발한 연구가 이루어져서 많은 연구자들이 송아지 생산에 성공하게 되었으나 이 시기에 생산된 모든 송아지들은 소, 토끼 또는 편양 등의 난관에서 초기단계 수정란을 발육시키는 생체내 배양기법을 이용하여 생산되었다 (Lu 등, 1987; Parrish 등, 1986; Sirard와 Lambert, 1986). 근래에는 난포란의 체외성숙 및 수정 후 난구세포 또는 난관상피세포와 공배양하는 체외 배양기법을 이용하여 송아지가 생산되었다(Goto 등, 1988; Lu 등, 1988).

초기 단계의 소 수정란은 배양조건이 부적절한 상태하에서 체외배양하면 생체내에서 수정란의 발육을 촉진시키기 위하여 분비되는 특이한 인자의 결핍으로 인하여 8~16세포기 또는 이전 단계에서 발육이 중단되는데(Bavister, 1988; Gandolfi와 Moor, 1987) 이러한 발육에 대한 저지현상은 소 과립막세포(Durnford 등, 1994), 난관상피세포(Xu 등, 1992), 자궁상피세포(Jiang 등, 1991), 영양막 세포(Heyman 등, 1987) 및 계태아세포(Goto 등, 1992)와 같은 여러 종류의 체세포와 공배양함으로

써 극복될 수 있었다. Rexroad(1989)는 공배양체계에 있어서 단층세포(單層細胞)의 역할은 명확치가 않으나 필요한 대사산물의 분비, 특이적 성장촉진 인자의 공급 그리고 배지 해독 등의 역할을 하는 것으로 추정된다고 하였다. Goto 등(1988)은 수정란 자체의 난구세포로써 체외성숙 및 수정된 난자를 공배양하여 이식 배반포 19개 중 5개가 임신되었다고 보고하였으며 Xu 등(1992)은 소 난관상피세포가 있는 Menezo's B2 배지에서 생산된 수정란은 세포수(상실배 45.4개, 배반포 101.5개), 발육속도(배양 8~9일에 탈출배반포), 탈출배반포 발달율(66%) 및 이식 후 수태율(63%)이 체내에서 생산된 수정란과 비슷하였다고 하여 수정란의 체외배양에 공배양세포가 유용하게 이용될 수 있다고 하였다.

최근에는 공배양세포 대신에 수정란의 발육에 필요한 여러 종류의 성장인자를 배지에 첨가하여 발육지지를 극복시키고 있다. 여러 종류의 성장인자가 착상전 수정란과 생식기관에 의해 생산되는데 이러한 인자들은 수정란의 발육을 촉진시킬 수 있으며 epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), insulin-like growth factor-1(IGF-1), platelet-derived growth factor(PDGF) 등 여러 종류의 성장인자들이 수정란의 체외배양에 이용되고 있다(Flood 등, 1993; Park과 Lin, 1993; Thibodeaux 등, 1993). EGF는 자성 생식기관에 존재하며 그것의 표적 수용체가

수정란에 존재하는 성장인자로서 체외배양에서는 포배양액의 축적의 촉진, 수정란의 투명대 탈출율의 증가 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Kane 등, 1992; Schultz와 Dardik, 1991; Paria와 Dey, 1990). 인슐린은 초기단계 수정란의 배양시 발육을 촉진하며 내세포외의 세포수를 증가시키기 때문에 분화 및 유사분열 물질인 insulin-like growth factor-1(IGF-1)은 체외수정란의 생산에 이용되고 있다(Zhang과 Armstrong, 1991; Gordon과 Lu, 1990; Hill, 1989; Harvey와 Kaye, 1990). Paria와 Dey(1990)는 EGF, transforming growth factor 및 TGF- β 1은 수정란이 1개씩 배양될 때 2 세포기의 수정란이 배반포기로 발육되는 비율을 증가시킨다고 하였으며 Larson 등(1992)은 TGF- β 1과 basic fibroblast growth factor의 병용은 소 수정란에 있어서 발육지지를 극복하며 배반포 형성을 촉진시킨다고 하였다.

현재까지 많은 연구자들이 소의 미성숙 난포란을 이용하여 체외수정 후 실제적으로 활용이 가능한 상실배 또는 배반포 생산의 효율성을 높이기 위한 체외배양법의 개발을 위해 공배양체계 또는 성장인자를 이용해 왔으나 아직까지도 소 체외수정란의 체외배양체계가 확립되지 않은 상태이다. 따라서 본 연구는 한우 난포란을 체외성숙 및 수정 후 4종의 공배양세포와 3종의 성장인자를 이용하여 각각 단독으로 또는 병용처리하여 수정란을 체외배양하여 체외수정란의 이식 또는 동결에 이용될 배반포의 효율적인 생산체계를 구축하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

난포란의 회수를 위해서 천안시 인근의 도축장에서 도축직후 분리된 난소를 항생제(penicillin G 100 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml)가 첨가된 25 $^{\circ}$ C의 0.9% 생리식염수에 침적하여 4시간 이내에 실험실로 운반하였다. 항생제가 첨가된 생리식염수로 난소를 3~4회 세척하고 난소 표면의 습기를 제거한 후 난소의 표면을 면도칼로 얇게 세질(slicing)하여 TCM 199 기본배양액(TCM 199 + gentamicin 50 μ g/ml)으로 씻어내어 상층액을 제거한

후 100 \times 20mm 조직배양접시(Corning, U.S.A.)에 분주하였다. 40배의 실체현미경(Olympus, Japan) 하에서 난포란을 회수하였으며 회수된 난자를 TCM 199 기본배양액에서 3~4회 세척 후 TCM 199 성숙배양액으로 옮겼다. 난포란의 선발은 난포란의 세척시 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 4~5층의 난구세포층이 충실하면서 균일한 세포질을 가진 것을 A등급, 2~3층의 난구세포층을 가진 것을 B등급으로 구분하였으며 이러한 A등급과 B등급의 난자를 성숙배양에 공하였다.

2. 체외성숙 및 체외수정 배양액의 준비

난포란의 체외성숙 배양액은 25mM HEPES (Sigma)가 첨가된 TCM 199(Earle's Salts, Gibco, U.S.A.) 배양액에 5 μ g/ml FSH(Sigma), 10 μ g/ml hCG(Chorulon, Intervet, Holland), 1 μ g/ml estradiol-17 β (Sigma), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.) 및 50 μ g/ml gentamicin(동신제약, 한국)을 첨가한 후 0.2 μ m filter (MFS, Sierra, U.S.A.)로 여과하였으며 정자의 수정능 획득 및 체외수정을 위한 BO배양액은 기본 BO배양액(Brackett와 Oliphant, 1975)에 10mM caffeine(Sigma)을 첨가하여 정자 세척용 BO배양액을 제조하였고, 기본 BO배양액에 5mM caffeine, 10 μ g/ml heparin 및 0.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 첨가하여 정자의 수정능 획득 및 성숙난자의 체외수정용 BO배양액을 제조하였으며 0.2 μ m filter로 여과하여 사용전에 39 $^{\circ}$ C, 98~99% humidity, 95% air, 5% CO₂배양기에서 12시간 이상 평형을 하였다.

3. 난포란의 체외성숙

준비된 TCM 199 성숙배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하고 선별된 난자를 각각 10~15개씩 넣었으며 이때 직경 10~20mm의 대난포로부터 회수하여 원심, 세척한 과립막세포를 1 \times 10⁶ cells/ml의 농도로 첨가하여 39 $^{\circ}$ C, CO₂배양기에서 약 24시간 동안 공배양을 실시하여 체외성숙을 유도하였다.

4. 정자의 처리 및 체외수정

축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 한우 동결정액을 38℃의 온수에서 30초간 용해시킨 후 정자세척용 BO배양액과 혼합하여 회석한 다음 200×g으로 5분간 2회 원심세척하여 만든 정자 pellet을 수정능획득용 BO배양액으로 재부유하였다. 80×g으로 1분간 원심분리하여 죽은 정자와 이물질을 침전시킨 후 상층액만을 200×g으로 5분간 원심분리하여 세척한 후 최종적으로 정자농도가 1×10⁶ 정자/ml가 되게 조정하여 성숙난자의 체외수정에 사용하였으며 수정능획득 정자를 함유한 200μl의 소적을 60×15mm 조직배양접시(Nunc, Denmark)에 적하한 후 멸균 mineral oil(Sigma)로 피복하고 성숙된 난자를 체외수정용 BO배양액으로 3~4회 세척한 후 정자 소적당 10~15개씩 옮겨 10시간 동안 CO₂배양기에서 체외수정을 유도하였다.

5. 공배양 세포의 준비

1) 난관상피세포

도축장에서 채취한 소의 난관을 5℃로 유지하여 실험실로 옮겨 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방조직을 철저하게 제거하고 70% 알코올로 소독한 후 난관 전체를 가볍게 분지된 다음 난관 깔때기에서 난관-자궁연결부쪽으로 TCM 199 기본배양액 2ml를 관류시켜 난관상피세포를 회수한 후 200×g으로 5분간 2회 원심 분리하여 세척하고 TCM 199 성숙배양액으로 재부유하여 난관상피세포의 최종농도가 1×10⁶ cells/ml가 되도록 조정 한 후 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 CO₂배양기에서 72시간 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다(Fig. 1-A).

2) 과립막세포

직경 10~20mm의 대난포로부터 10ml 주사기를 이용하여 난포액과 함께 과립막세포를 흡입 채취하여 난관상피세포의 처리방법과 같은 방법으로 원심 분리하여 세척하고 최종농도가 1×10⁶ cells/ml이 되도록 세포수를 조정하여 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 CO₂배양기에서 48시간 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다(Fig. 1-B).

3) 자궁상피세포

자궁상피세포의 회수는 과배란처리된 한우 공란우의 수정란 회수시 수정란과 함께 채취되는 자궁상피세포를 분리하여 사용하였다(Goodeaux 등, 1989). 회수된 자궁상피세포는 난관상피세포의 처리방법과 같은 방법으로 원심분리하여 세척하고 최종농도가 1×10⁶ cells/ml가 되도록 세포수를 조정하여 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 CO₂배양기에서 72시간 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다(Fig. 1-C).

4) 생쥐 태아섬유모세포

한국과학기술연구원(KIST) 생명공학연구소에서 분양받은 동결 생쥐 태아섬유모세포를 37℃의 온수에서 1분간 용해한 후 5ml의 TCM 199 성숙배양액에 회석시켜 200×g으로 5분간 원심분리하여 세척한 후 TCM 199 성숙배양액으로 재부유하여 섬유모세포의 최종농도가 1×10⁶ cells/ml가 되도록 조정 한 다음 50ml 조직배양플라스크(Nunc, Denmark)에 넣어 CO₂배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후 조직배양플라스크에서 세포배양액을 제거하고 TCM 199 성숙배양액으로 3회 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA 용액(Sigma) 4ml를 가하고 피펫팅하여 섬유모세포를 회수하였으며, 5ml의 TCM 199 성숙배양액에 회석 후 200×g으로 5분간 원심분리하여 세척하고 TCM 199 성숙배양액으로 재부유하여 섬유모세포의 최종농도가 1×10⁶ cells/ml가 되도록 조정 한 다음 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 CO₂배양기에서 48시간 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다(Fig. 1-D).

6. 성장인자를 이용한 배양액의 준비

1) Epidermal growth factor(EGF)

EGF(Sigma)를 각각 10, 30, 50ng/ml씩 TCM 199 성숙배양액에 첨가하였다.

2) Transforming growth factor-β1(TGF-β1)

TGF-β1(Sigma)을 각각 1, 2, 5ng/ml씩 TCM 199 성숙배양액에 첨가하였다.

3) Insulin-like growth factor-1(IGF-1)

TCM 199 성숙배양액에 IGF-1(Sigma)을 각각 50, 100ng/ml 농도로 첨가하였다.

4) EGF + TGF- β 1

10ng/ml의 EGF와 1ng/ml의 TGF- β 1을 TCM 199 성숙배양액에 첨가하였다.

5) EGF + BOEC

난관상피세포의 단층세포가 형성된 4-well dish에서 성숙배양액을 제거하고 EGF가 각각 10, 30, 50ng/ml이 첨가된 성숙배양액을 첨가하였다.

6) TGF- β 1 + BOEC

난관상피세포의 단층세포가 형성된 4-well dish에서 성숙배양액을 제거하고 TGF- β 1이 각각 1, 2, 5 ng/ml 첨가된 TCM 199 성숙배양액을 첨가하였다.

7. 수정란의 체외배양

체외수정된 난자를 TCM 199 성숙배양액으로 3~4회 세척하여 난구세포와 정자를 제거하고 TCM 199 성숙배양액에서 44시간 배양하여 난구세포를 제거한 뒤 2~8세포기의 수정란을 난관상피세포, 과립막세포, 자궁상피세포 및 생쥐태아섬유모세포의 단층세포에 공배양시키거나 EGF, TGF- β 1

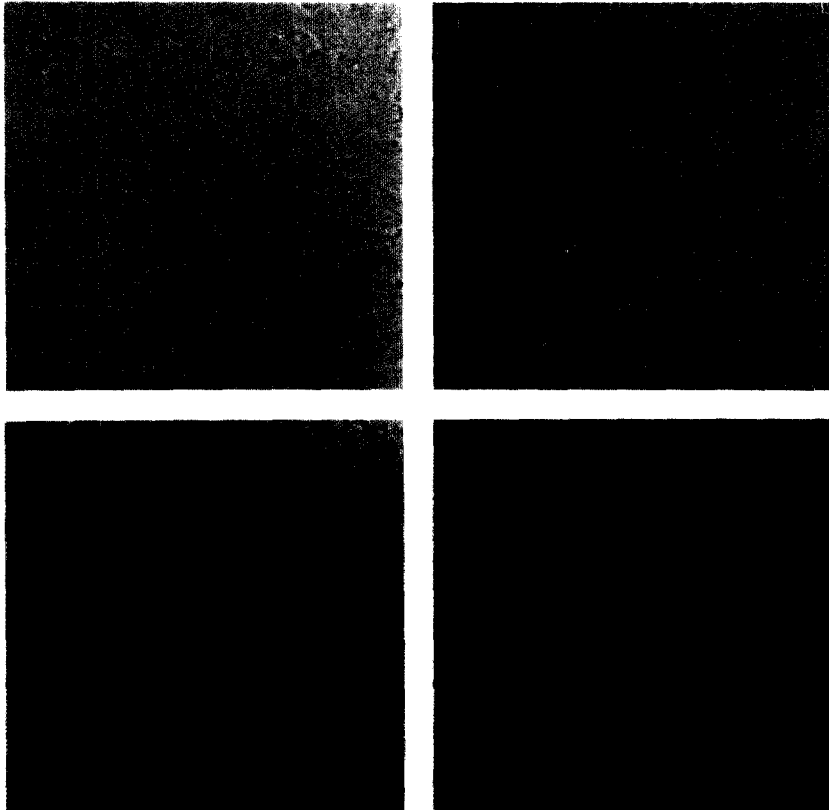


Fig. 1. A : Oviductal epithelial cells monolayer($\times 200$)
B : Granulosa cells monolayer($\times 200$)
C : Uterine epithelial cells monolayer($\times 200$)
D : Mouse embryonic fibroblast monolayer($\times 200$)

및 IGF-1이 단독으로 첨가된 배양액에, EGF와 TGF- β 1이 혼합 첨가된 배양액 그리고 난관상피세포에 EGF와 TGF- β 1을 각각 첨가한 배양액을 이용하여 7일간 CO₂배양기에서 배양하였다. 배양중에 48시간마다 배양액을 신선한 배양액으로 교환하였으며 24시간마다 수정란의 분할율, 상실배 및 배반포의 발달율을 조사하였다.

8. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 분석은 SAS 통계 package의 CATMOD procedure를 이용하여 χ^2 -test를 실시하여 처리군간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 공배양세포의 효과

1) 한우 체외수정란(2~8 세포기)의 체외배양에 대한 공배양세포의 효과

난포란을 체외수정시킨 뒤 54시간 후에 회수된 2~8세포기의 수정란을 미리 배양한 소의 난관상피세포, 과립막세포, 자궁상피세포 및 생쥐 태아섬유모세포의 단층세포에 7일간 공배양시켜 분할율 및 배발달율에 대한 효과를 비교한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 상실배 이상의 발달율은 과립막세포 54.4%, 자궁상피세포 52.4%, 난관상피세포 44.9%, 생쥐 태아섬유모세포 40.7% 순으로 낮아졌으나 공배양세포간에 유의성이 없었으며, 과립막세포와 자궁상피세포는 공배양하지 않은 대조군의 29.0%에 비해서는 유의성 있게 높았다($p < 0.05$). 또 배반포의 발달율은 자궁상피세포 32.1%, 난관상피세포 24.1%, 생쥐 태아섬유모세포 15.3%, 과립막세포 13.2% 및 대조군 11.6%로서 자궁상피세포가 생쥐 태아섬유모세포, 과립막세포 및 대조군에 비해서 유의성있게 높았다($p < 0.05$).

Goto 등(1992)은 4~8세포기의 체외수정란을 과립막세포, 난관상피세포, 자궁상피세포를 이용 공배양시 상실배이상 발달율이 각각 49.0, 45.2, 50.0%로 본 연구의 54.4, 44.9, 52.4%와 비슷하였으며 배반포 발달율은 각각 26.9, 37.5, 39.2%로서 본 연

구의 13.2, 24.1, 32.1%에 비해 높았으나 과립막세포, 난관상피세포, 자궁상피세포 순으로 높았던 점은 같았다. Jiang 등(1991)은 과립막세포, 난관상피세포, 자궁상피세포를 이용하여 2~8세포기의 소 체외수정란을 공배양한 결과 배반포 발달율이 각각 37.2, 31.7 및 26.1%로서 과립막세포와 난관상피세포는 본 시험의 결과보다 높았으나 자궁상피세포는 낮은 결과를 보였으며 또한 과립막세포+난관상피세포, 과립막세포+자궁상피세포, 난관상피세포+자궁상피세포 및 과립막세포+난관상피세포+자궁상피세포에서 수정란을 공배양시킨 결과 30.3~33.4%로 비슷한 배반포의 발달율을 보였다고 하였다.

아직까지 공배양체계의 작용기전은 충분히 알려지지 않은 상태이나 Kuzan과 Wright(1982)는 소의 섬유모세포가 상실배의 탈출배반포 발달율을 촉진시킨다는 결과를 보아 공배양효과는 세포와 수정란의 접촉에 의존하는 것으로 보인다고 하였으나 Heyman 등(1987)은 소 영양막세포를 이용한 공배양시 세포조절배지내로 소 영양막세포에서 분비되는 active biological compounds에 의해 8~16 cell block의 극복이 가능하였으므로 공배양세포와 수정란의 직접적인 접촉이 필수적인 것은 아니라고하여 다른 견해를 제시하였다.

Aoyagi 등(1990)은 난관상피세포, 난구세포, 영양막세포, 양막낭세포 및 토끼의 난관에서 8세포기의 수정란을 공배양한 결과 난관상피세포, 영양막세포, 양막낭세포에서는 배반포 발달율이 39.0~50.7%로 유의성이 없었으나 난구세포와 토끼의 난관에서 공배양한 경우에는 19.5, 29.3%로 유의성있게 낮았다고 보고하여 공배양세포의 종류가 배발달에 영향을 미친다고 하였는데, Goto 등(1992)의 난관상피세포에서 배발달 속도는 빨랐으나 여러 종류의 상피세포가 소 초기단계 수정란의 체외발육에 유의적인 차이를 나타내지 않았다는 보고와는 상이하였으나 자궁상피세포에서 다른 공배양세포에 비해 배반포 발달율이 유의성을 나타낸 본 연구와 비슷한 경향을 보였다. 본 연구의 결과, 2~8세포기의 소 체외수정란이 여러 종류의 단층세포에서 상실배 및 배반포까지 발육될 수 있음을 보여주었으나 배반포의 생산을 위해서는 자궁상피세포를 이용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

Table 1. Effect of co-culture cells on *in vitro* development of KNC embryos fertilized *in vitro*

Co-culture cells	No. of 2~8 cell embryos	No. of embryos developed to(%)	
		Morula + blastocysts	Blastocysts
Control	69	20(29.0) ^b	8(11.6) ^b
BOEC	158	71(44.9) ^{ab}	38(24.1) ^{ab}
BGC	68	37(54.4) ^a	9(13.2) ^b
BUEC	84	44(52.4) ^a	27(32.1) ^a
MEF	59	24(40.7) ^{ab}	9(15.3) ^b

Control : non-coculture

BOEC : bovine oviductal epithelial cell ; BGC : bovine granulosa cell

BUEC : bovine uterine epithelial cell ; MEF : mouse embryonic fibroblast

Values with different superscripts within the same column differ significantly

(^{a,b} : p<0.05).

2) 한우 체외수정 상실배의 체외배양에 대한 공배양세포의 효과

체외수정 후 난관상피세포에서 5일간 공배양시켜 발육된 상실배를 난관상피세포로 계속 공배양하거나 또는 자궁상피세포로 옮겨 공배양시킨 결과, 자궁상피세포로 옮겨 배양한 상실배 46개중 34개가 배반포로 발육되었으며(73.9%) 난관상피세포에서는 50개의 상실배중 28개가 배반포로 발육되어(56.0%) 자궁상피세포가 난관상피에 비해 높은 배반포의 발달율을 보였다(Table 2). 난관상피세포 또는 자궁상피세포가 각기 수정란의 발육에 특정한 촉진인자를 제공하거나 어떠한 경로로든 각 단계의 수정란의 발육에 적절한 환경을 조성할 것이라는 가정을 하면 체내에서의 세포의 작용을 감안할 때 배양한 난관상피세포는 초기 단계 수정란의 공배양에, 상실배 또는 배반포와 같은 후기 단계의 수정란은 자궁상피세포와 공배양하는 것이 적합할 것이라고 보고된 바 있는데(Rexroad, 1989) 본 연구에서도 한우 체외수정란이 상실배에서 배반포로 발육하는데 있어 자궁상피 단층세포에서 공배양한 경우가 난관상피세포에서 공배양한 경우보다 높은 배반포 발달율을 보여 이전의 보고와 일치하였다.

Goodeaux 등(1989)은 원숭이에 과배란처리 후 수정란과 자궁상피세포를 회수하고, 자궁상피세포를 배양하여 단층세포를 형성시켜 회수된 수정란을 배양한 결과 탈출배반포 발달율이 63%로 자궁상피세포로 공배양하지 않은 배지에서 배양한 경우의 25%에 비해 높은 탈출배반포 발달율을 보였다고

Table 2. Effect of co-culture cells on *in vitro* development of KNC morula produced *in vitro*

Co-culture cells	No. of morula	No. of embryos developed to blastocysts	Development rate(%)
BOEC	50	28	56.0
BUEC	46	34	73.9

BOEC : bovine oviductal epithelial cell

BUEC : bovine uterine epithelial cell

하여 자궁상피세포가 확장배반포 및 탈출배반포로 발육을 향상시킬 수 있다고 하였으며, Kajihara 등(1991)은 난구세포와 자궁상피세포를 이용하여 소 체외수정란을 공배양한 결과 난구세포로서 배양종료시까지 계속 공배양한 경우보다 난구세포로 1일간 공배양한 후 난구세포와 자궁상피세포가 혼합된 배양조건에서 배양종료시까지 배양하였을 때가 더 높은 배반포 발달율을 보여 자궁상피세포의 작용에 의하여 자궁내와 동일한 환경이 조성되어 8세포기 이상의 수정란 발육에 좋은 영향을 주었던 것으로 여겨진다고 하였다. 이상의 연구결과로 미루어보아 체외수정란을 난관상피에서 체외배양 후 상실배에 도달한 후에는 자궁상피세포로 옮겨 공배양하는 것이 배반포 발달율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

2. 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 성장인자의 효과

한우 체외수정란의 체외발육에 대한 성장인자의

Table 3. Effect of EGF concentration on *in vitro* development of KNC embryos fertilized *in vitro*

EGF concentration (ng/ml)	No. of 2~8 cell embryos	No. of embryos developed to (%)	
		Morula + blastocysts	Blastocysts
0	57	21(36.8)	9(15.8)
10	158	78(49.4)	40(25.3)
30	128	63(49.2)	27(21.1)
50	117	61(52.1)	23(19.7)

EGF : epidermal growth factor

효과를 비교하기 위하여 TCM 199 성숙배양액에 3종의 성장인자를 단독으로 첨가하거나 2종류의 성장인자를 혼합하여 첨가하였으며 또한 난관상피세포가 있는 TCM 199 성숙배양액에 2종의 성장인자를 각각 첨가하여 배양효과를 비교하였다.

1) 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 EGF 농도의 효과

EGF를 각각 10, 30, 50 ng/ml씩 TCM 199 성숙배양액에 첨가하여 한우 2~8세포기의 수정란을 배양한 결과, 상실배 이상 발달율은 10, 30, 50ng/ml에서 각각 49.4, 49.2, 52.1%로 비슷하였으나 EGF 무첨가 대조군의 36.8%보다는 높았다. 배반포의 발달율은 10, 30, 50ng/ml에서 각각 25.3, 21.1, 19.7%로 EGF의 농도가 높아질수록 낮아졌으나 유의성은 인정되지 않았고, 대조군의 15.8%에 비해서는 높은 발달율을 보였다(Table 3). EGF의 수정란 발육에 대한 자극효과는 후기 발육단계(8세포-배반포)의 배표면에 결합한다는 사실에 의해 밝혀졌으며(Hill, 1989), Flood 등(1993)은 EGF가 다른 성장인자에 비해 배반포까지의 발달율을 다소 증진시켰다고 하였는데 이것은 EGF가 영양막세포와 결합하여 포배강의 형성을 촉진시키기 때문일 것이라고 하였다.

본 연구의 결과는 Yang 등(1993)이 10%의 FBS가 첨가된 synthetic oviductal fluid 배양액에 EGF를 10, 100ng/ml씩 첨가하여 2~8세포기의 소체외수정란을 5~6일간 배양시킨 결과 배반포의 발달율이 EGF를 10ng/ml 첨가시에 10.1%로 100ng/ml 첨가시의 7.5%에 비해 높은 성적을 보였다는 보고와 비슷한 경향을 나타내었으나 전체적인 배발달율의 차이가 큰 것은 사용한 배지 및 첨가물

의 차이에 기인된 것으로 사료된다. 또한 Kato와 Siedel(1996)은 TCM 199 성숙배양액에 EGF를 각각 5, 50, 500ng/ml을 첨가하여 2~8세포기의 수정란을 배양한 바 분할율은 각각 60, 60, 52%로 대조군의 38%에 비해 향상되었으나 배반포의 발달율은 각 첨가군에서 3~4%로서 대조군과 비슷한 수준이었다고 하여 본 연구의 결과에 비해 현저히 낮은 배반포의 발달율을 보였다. 본 연구의 결과로 보아 EGF를 배양액에 첨가하여 체외수정란을 배양할 경우 10ng/ml의 첨가가 적합한 것으로 나타났다.

2) 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 TGF-β1 농도의 효과

TGF-β1을 1, 2, 5ng/ml씩 TCM 199 성숙배양액에 각각 첨가하여 한우 2~8세포기의 수정란을 배양한 바 상실배이상 발달율은 1, 2, 5ng/ml에서 각각 53.8, 45.6, 33.3%로 농도가 증가될수록 낮아졌으며, 1ng/ml 첨가시가 5ng/ml 첨가시에 비해 유의성있게 높았다(p<0.05). 배반포의 발달율은 1, 2, 5ng/ml에서 각각 28.8, 24.4, 24.0%로 나타나 1ng/ml 첨가시에 가장 높았다(Table 4). Yang 등(1993)은 0.3%의 BSA가 첨가된 CR1aa 배지에 TGF-β1을 각각 5, 10ng/ml씩 첨가하여 2~8세포기의 수정란을 배양시킨 결과 상실배이상 발달율은 5ng/ml 첨가시가 56%로 대조군의 40%보다 높았으나 10ng/ml 첨가시는 37%로 낮아졌으며, 배반포의 발달율도 5ng/ml에서 52.9%로 대조군의 37.1%보다 높았으나 10ng/ml 첨가시는 33.3%로 낮아져 TGF-β1의 첨가 농도의 증가에 따라 배발달율은 오히려 낮아져 본 연구와 농도의 차이는 있으나 비슷한 경향을 보였다. Larson 등(1992)은 TGF-β1 1ng/ml을 단독 첨가하여 2세포기의 수정란을 체외

Table 4. Effect of TGF- β 1 concentration on *in vitro* development of KNC embryos fertilized *in vitro*

TGF- β 1 concent- -ration(ng /ml)	No. of 2~8 cell embryos	No. of embryos developed to(%)	
		Morula + blastocysts	Blastocysts
0	80	31(38.5) ^{ab}	14(17.5)
1	80	43(53.8) ^a	23(28.8)
2	90	41(45.6) ^{ab}	22(24.4)
5	96	32(33.3) ^b	23(24.0)

TGF- β 1 : transforming growth factor- β 1

Values with different superscripts within the same column differ significantly (^{a,b} : p < 0.05).

Table 5. Effect of IGF-1 concentration on *in vitro* development of KNC embryos fertilized *in vitro*

IGF-1 concen- -ration(ng /ml)	No. of 2~8 cell embryos	No. of embryos developed to (%)	
		Morula + blastocysts	Blastocysts
0	85	35(41.2)	10(11.8)
50	85	34(40.0)	11(12.9)
100	91	41(45.1)	15(16.5)

IGF-1 : insulin-like growth factor-1

배양했을 때 배반포로 전혀 발육되지 않았으나 basic fibroblast growth factor 50pg/ml와 혼합배양했을 때는 배반포로의 발육이 30%까지 증가되었음을 보고하여 TGF- β 1는 bFGF 성장인자와 병용시에 효과가 상승된다고 하였다.

3) 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 IGF-1 농도의 효과

IGF-1을 TCM 199 성숙배양액에 50, 100ng/ml의 농도로 각각 첨가하여 2~8세포기의 한우 체외수정란을 배양한 결과, IGF-1을 100ng/ml 첨가하여 배양한 경우가 50ng/ml 농도로 첨가하여 배양한 경우에 비해 상실배이상 발달율(45.1% > 40.0%)과 배반포의 발달율(16.5% > 12.9%)이 모두 높게 나타났다(Table 5). 상실배이상 발달율 및 배반포 발달율이 100ng/ml 첨가시는 대조군에 비해 다소 높았으나 50ng/ml 첨가시에는 대조군과 비슷하여 IGF-1의 첨가가 수정란의 체외발육의 촉진에 크게 영향을 미치지 않는 듯하였다. Lee와 Fukui(1995)도 IGF-1 100ng/ml으로 2세포기의 소 수정란을 배양시켰을 때 체외발달율을 증진시키지 못하였다고 하여 본 연구의 결과와 유사하였다. 그러나

Zhang 등(1991)은 TCM 199 배양액에 insulin 1 μ g/ml을 첨가하여 배양시 TCM 199 배양액에 배양시보다 난구팽화 및 수정율에는 현저한 증가가 있었으나 배발달율은 차이가 없었다고 하였으며 Gandolfi 등(1996)은 TCM 199 배양액에 IGF-1 100ng/ml을 첨가하여 수정란을 배양시 IGF-1을 첨가하지 않은 TCM 199 배양액에 배양시보다 배반포의 발달율을 증가시키지 못했으나 50ng/ml EGF와 100ng/ml IGF-1가 혼합첨가된 TCM 199 배양액에 배양시에는 IGF-1 단독 첨가 또는 IGF-1 무첨가군에 비해 현저히 높았다고 하였다.

4) 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 EGF와 TGF- β 1 병용의 효과

두 종류의 성장인자를 혼합, 첨가하여 한우 체외수정란의 체외발육에 대한 상승효과를 비교하기 위하여 10ng/ml의 EGF와 1ng/ml의 TGF- β 1을 각각 단독으로 또는 혼합, 첨가한 후 2~8세포기의 한우 체외수정란을 배양한 결과 상실배이상 발달율은 TGF- β 1 1ng/ml 단독첨가시 53.1%, EGF 10ng/ml+TGF- β 1 1ng/ml 병용시 54.6%로 EGF 10ng/ml 단독첨가시의 45.9%와 성장인자 무첨가 내

조군의 41.0%보다 높았으나 두 종류의 성장인자의 상승효과는 통계학적으로 유의성이 없었으며, 배반포의 발달율은 EGF 10ng/ml 단독첨가시에 23.6%, TGF- β 1 1ng/ml 단독첨가시 24.6%, 그리고 EGF 10ng/ml + TGF- β 1 1ng/ml 병용시 23.1%로 대조군의 16.7%보다 높았으나 두 종류의 성장인자의 상승효과는 유의성이 없었다(Table 6).

Keefe 등(1994)은 EGF 10ng/ml과 TGF- β 1 2ng/ml을 병용하여 4~8세포기의 수정란을 배양시킨 결과 배반포 발달율이 33%로 EGF 10ng/ml을 단독 첨가한 경우와 동일한 수준이며, TGF- β 1 2ng/ml 단독첨가 경우의 47%보다 오히려 낮아 두 가지 성장인자의 병용에 있어 상승효과를 나타내지 않았다고 하여 본 연구와 같은 결과를 보였다. 그러나 Lee와 Fukui(1995)는 EGF 10ng/ml과 FGF 1ng/ml을 혼합 첨가하여 2세포기의 수정란을 배양시킨 결과 EGF 10ng/ml과 FGF 1ng/ml을 각각 단독으로 첨가하여 배양한 경우에 비해 배반포 발

달율이 현저히 증가되어 상승효과가 있었다고 보고하였다.

5) 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 EGF와 난관상피세포 병용의 효과

미리 배양한 난관상피 단층세포에 EGF가 각각 10, 30, 50ng/ml씩 첨가된 TCM 199 성숙배양액을 넣어 2~8세포기의 한우 체외수정란을 배양한 결과 상질배이상 발달율은 각각 38.7, 32.6, 24.2%로 EGF의 농도가 증가할수록 낮아졌으며, 배반포의 발달율은 EGF 10ng/ml + 난관상피세포에서 배양시 32.3%로, EGF 30ng/ml + 난관상피세포에서 18.9%, 또는 EGF 50ng/ml + 난관상피세포에서 배양시 9.7%에 비해 유의성 있게 높았으며($p < 0.05$), EGF를 첨가하지 않고 난관상피세포로 공배양한 대조군과는 유의성을 나타내지 않았다(Table 7).

Table 6. Effect of EGF and TGF- β 1 combination on *in vitro* development of KNC embryos fertilized *in vitro*

EGF concentration (ng/ml)	TGF- β 1 concentration (ng/ml)	No. of 2~8 cell embryos	No. of embryos developed to (%)	
			Morula+blastocysts	Blastocysts
0	0	78	32(41.0)	13(16.7)
10	0	157	72(45.9)	37(23.6)
0	1	130	69(53.1)	32(24.6)
10	1	130	71(54.6)	30(23.1)

EGF : epidermal growth factor

TGF- β 1 : transforming growth factor- β 1

Difference between groups are not significant.

Table 7. Effect of EGF and BOEC on *in vitro* development of KNC embryos fertilized *in vitro*

EGF concentration (ng/ml)	Co-culture cell	No. of 2-8 cell embryos	No. of embryos developed to (%)	
			Morula+blastocysts	Blastocysts
0	BOEC	94	38(40.4)	22(23.4) ^{ab}
10	BOEC	124	48(38.7)	40(32.3) ^a
30	BOEC	95	31(32.6)	18(18.9) ^{bc}
50	BOEC	62	15(24.2)	6(9.7) ^c

EGF : epidermal growth factor

BOEC : bovine oviductal epithelial cell

Values with different superscripts within the same column differ significantly

(^{a,b,c} : $p < 0.05$).

Table 8. Effect of TGF- β 1 and BOEC on *in vitro* development of KNC embryos fertilized *in vitro*

TGF- β 1 concentration (ng/ml)	Co-culture cell	No. of 2-8 cell embryos	No. of embryos developed to (%)	
			Morula+blastocysts	Blastocysts
0	BOEC	91	37(40.7)	20(22.0)
1	BOEC	92	35(38.0)	20(21.7)
2	BOEC	117	46(39.3)	25(21.4)
5	BOEC	103	47(45.6)	29(28.2)

TGF- β 1 : transforming growth factor- β 1

BOEC : bovine oviductal epithelial cell

6) 한우 체외수정란의 체외배양에 대한 TGF- β 1과 난관상피세포 병용의 효과

난관상피 단층세포에 TGF- β 1이 각각 1, 2, 5 ng/ml씩 첨가된 TCM 199 성숙배양액을 넣어 2~8세포기의 한우 체외수정란을 배양한 결과 상실배 이상 발달율과 배반포의 발달율이 TGF- β 1 5 ng/ml + 난관상피세포에서 각각 45.6, 28.2%로 나타나서 TGF- β 1 1ng/ml + 난관상피세포의 38.0, 21.7%, TGF- β 1 2ng/ml + 난관상피세포의 39.3, 21.4% 및 TGF- β 1을 첨가하지 않고 난관상피세포로 공배양한 대조군의 40.7, 22.0%에 비해 높게 나타났다(Table 8). 난관상피 단층세포에 EGF 또는 TGF- β 1를 첨가시 배반포 발달율에 있어서 EGF 10ng/ml + 난관상피세포에 배양시와 TGF- β 1 5ng/ml + 난관상피세포에 배양시는 성장인자를 첨가하지 않은 난관상피세포와 공배양한 대조군에 비해 높았으나 다른 농도의 성장인자를 난관상피세포에 첨가시에는 성장인자를 첨가하지 않은 난관상피세포에 공배양시킨 대조군에 비해 낮은 성적을 보였다. 또한 성장인자의 종류에 의한 배발달에 대한 경향의 차이가 있었는데, 상실배 이상 발달율 및 배반포 발달율에 있어서 EGF의 경우는 농도가 증가될수록 낮아졌으나 TGF- β 1에서는 농도가 증가될수록 높아져 서로 다른 경향을 보였는데 이것은 성장인자의 수정란에 대한 직접적인 영향인지 또는 난관상피세포를 통한 간접적인 영향인지 구분이 어려우나 EGF 및 TGF- β 1 단독 첨가시의 성적을 고려해 볼 때 난관상피세포를 통한 간접적인 영향인 것으로 사료된다. Im과 Park(1995)은 소 체외수정란을 과립막세포에 EGF 10, 30, 50ng/ml을 각각

첨가하여 배양시 배반포 발달율이 18~20%로 EGF를 첨가하지 않은 과립막세포와 공배양한 대조군 22%와 차이가 나타나지 않았다고 하였으며 수정란 발육에 대한 EGF의 효과는 과립막세포 또는 fetal calf serum의 존재에 의해 감소되었을 것이라고 하였다. Herrler 등(1992)은 IGF-1 50 ng/ml으로 난포란을 성숙시킨 후 체외수정, 배양시 배양액에 IGF-1 50ng/ml만 첨가하거나 또는 과립막세포에 IGF-1 50ng/ml을 첨가하여 배양시 상실배 이상 발달율이 각각 5, 31%로 과립막세포에 IGF-1 50 ng/ml을 첨가하여 배양한 것이 훨씬 높았으며 이러한 긍정적인 효과는 IGF-1에 의해 과립막세포 대사의 증가로 배지내 산소 분압을 저하시켜 수정란의 발육에 유리한 영향을 주었을 가능성이 있다고 하였다.

적 요

체외에서 성숙, 수정된 한우 수정란을 이식 또는 동결보존에 적합한 배반포기까지의 효율적인 배양 체계를 구축하고자 한우 수정란을 4종의 공배양세포와 3종의 성장인자를 각각 단독으로 이용하거나 또는 병용처리하여 수정란을 체외배양한 바 결과는 다음과 같다.

2~8세포기의 한우 체외수정란을 소의 난관상피세포, 과립막세포, 자궁상피세포 및 생쥐태아섬유모세포의 단층세포로 공배양시 배반포의 발달율은 자궁상피세포(32.1%)가 생쥐태아섬유모세포(15.3%), 과립막세포(13.2%) 및 공배양하지 않은 대조군(11.6%)에 비해 유의성있게 높았다($p < 0.05$). 한우 체외수정란을 상실배까지 난관상피세포에서 체

참고문헌

외배양한 후 난관상피세포에서 계속 공배양하거나 또는 자궁상피세포로 옮겨서 공배양시 배반포의 발달율은 자궁상피세포에서 공배양시(73.9%)가 난관상피세포에서 공배양시(56.0%)에 비해 높았다.

2~8세포기의 한우 체외수정란을 TCM 199 성숙배양액에 epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), insulin-like growth factor-1(IGF-1) 성장인자의 단독첨가, EGF + TGF- β 1 혼합첨가 또는 배양된 난관상피단층세포에 EGF, TGF- β 1을 각각 첨가하여 체외배양한 결과 EGF 10, 30, 50ng/ml을 단독첨가 배양시 배반포의 발달율은 EGF 10ng/ml 첨가시(25.3%)가 가장 높았다. TGF- β 1 1, 2, 5ng/ml의 단독첨가 배양시 배반포의 발달율은 1ng/ml 첨가시(28.8%)에 가장 높았다. IGF-1을 50, 100ng/ml 단독첨가 배양시 배반포의 발달율은 각각 12.9, 16.5%로 100ng/ml 첨가시가 50ng/ml 첨가시에 비해 약간 높았다. EGF 10ng/ml과 TGF- β 1 1ng/ml을 단독 또는 혼합첨가하여 배양시 배반포의 발달율은 EGF와 TGF- β 1을 각각 단독첨가하거나 또는 혼합첨가시 비슷하였고(23.1~24.6%) 성장인자 무첨가 대조군(16.7%)에 비해서는 높았으나 두 종류의 혼합사용에 의한 상승효과를 나타내지는 않았다. 난관상피세포가 있는 TCM 199 성숙배양액에 EGF 10, 30, 50ng/ml를 각각 첨가 배양시 배반포 발달율은 EGF 10ng/ml 첨가시(32.3%)가 30ng/ml(18.9%) 또는 50ng/ml 첨가시(9.7%)에 비해 유의성있게 높았다($p < 0.05$). 난관상피세포가 있는 TCM 199 성숙배양액에 TGF- β 1 1, 2, 5ng/ml를 각각 첨가 배양시 배반포의 발달율은 5ng/ml 첨가시(28.2%)가 1ng/ml(21.7%) 및 2ng/ml 첨가시(21.4%)에 비해 높았다.

이상의 결과로 보아 한우 체외수정란의 배반포 발달율은 공배양체계를 이용시 자궁상피세포에서 가장 높았으며, 성장인자 첨가배양에 있어서는 EGF는 10ng/ml 그리고 TGF- β 1은 1ng/ml 첨가시가 높았으며, 그리고 성장인자 + 난관상피세포 병용시에는 EGF 10ng/ml + 난관상피세포 또는 TGF- β 1 5ng/ml + 난관상피세포 배양에서 높았다.

- Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M and Ono H. 1990. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34:749-759.
- Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 29:143-154.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.
- Brackett BG, Oh YK, Evans JF and Donawick WJ. 1978. *In vitro* fertilization of cow ova. *Theriogenology*, 9:89.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
- Durnford R, Stubbings RB and Ainsworth L. 1994. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:261-272.
- Edwards RG. 1973. Physiological aspects of human ovulation, fertilization and cleavage. *J. Reprod. Fert. suppl.*, 18:87-101.
- Flood MR, Gage TL and Bunch TD. 1993. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology*, 39:823-833.
- Gandolfi F and Moor RM. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 81:23-28.
- Gandolfi F, Pocar P, Luciano AM and Rieger D. 1996. Effects of EGF and IGF-1 during

- in-vitro* maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism. *Theriogenology*, 45:277.
- Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA, Menezes Y and Graves KH. 1989. The effect of rhesus uterine epithelial cell monolayers on *in vitro* growth of rhesus embryos. *Theriogenology*, 31:197.
- Gordon I and Lu KH. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33:77-87.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi 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. Fert.*, 83:753-758.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanishi Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
- Harvey MB and Kaye PL. 1990. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts *in vitro*. *Development*, 110:963-967.
- Herrler A, Lucas-Hahn A and Niemann H. 1992. Effects of insulin-like growth factor-1 on *in-vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 37:1213-1224.
- Heyman Y, Menezes Y, Chesne P, Camous S and Garnier V. 1987. *in vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:59-68.
- Hill DJ. 1989. Growth factors and their cellular actions. *J. Reprod. Fert.*, 85:723-734.
- Im KS and Park KW. 1995. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 44:209-216.
- Iritani A and Niwa K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 50:119-121.
- Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1991. Roles of different cell monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 35:216.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y and Goto K. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus/uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 37:177-184.
- Kane MT, Carney EW and Ellington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 38:297-313.
- Kato H and Siedel GE. 1996. Effects of EGF in bovine oocytes maturation medium on maturation, *in vitro* fertilization and embryonic development. *Theriogenology*, 45:276.
- Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM and Golueke P. 1994. *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*, 41:1323-1331.
- Kuzan FB and Wright RW. 1982. Observations on the development of bovine morulae on various cellular and noncellular substrata. *J. Anim. Sci.*, 54:811-816.
- Larson RC, Ignatz GG and Currie WB. 1992. Transforming growth factor β and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.*, 33:432-435.
- Lee ES and Fukui Y. 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos

- matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 44:71-83.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in-vitro*. *Vet. Rec.*, 121:259-260.
- Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M and McGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.*, 122:539-540.
- Paria BC and Dey SK. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4756-4760.
- Park YS and Lin YC. 1993. Effect of epidermal growth factor(EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocytes maturation and early embryonic development. *Theriogenology*, 39:475-484.
- Parrish JJ, Parrish JL, Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Rexroad CE. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31:105-114.
- Schultz RM and Dardik A. 1991. Stimulatory effect of TGF- α /EGF on the rate of mouse blastocole expansion. *Biol. Reprod.*, 44(suppl.1):88.
- Sirard MA and Lambert RD. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.*, 119:167-169.
- Thibodeaux JK, Vecchio RP and Hansel W. 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.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, Mckenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- 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 oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 94:33-43.
- Yang BK, Yang X and Foote RH. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 40:521-530.
- Zhang X and Armstrong DT. 1991. Presence of amino acids and insulin in a chemical defined medium improves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 42:662-668.
- Zhang L, Blakewood EG, Denniston RS and Godke RA. 1991. The effect of *in vitro*-fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:301.