

마우스 수정란의 體外發達에 미치는 소와 돼지의 卵管上皮細胞와의 共培養 效果

이 성 · 허의중* · 석호봉
단국대학교 농과대학 축산학과

Effect of Co-culture with Bovine and Porcine Oviductal Epithelial Cells on *In Vitro* Development of Mouse Embryos

Lee, S., E. J. Hur* and H. B. Seok

Department of Animal Science, College of Agriculture, Dankook University

SUMMARY

This experiment was carried out to evaluate the effect of mouse early embryonic development *in vitro* by co-culture with bovine and porcine oviductal epithelial cells(BOEC and POEC). The 2-cell embryos were collected from the oviducts of the superovulated and mated does with D-PBS /15% FCS at 48 hours after hCG injection. The *in vitro* developmental rate of blastocyst formation and the number of nuclei in the embryos were examined. For a comparative study of *in vivo* and *in vitro* development, the fresh blastocyst which developed *in vivo* for 120 hours after hCG injection was collected from the uterus, and their numbers of nuclei were also counted.

The higher developmental rates of blastocyst formation was appeared from 91% to 97% when the embryos were co-cultured with a monolayer of bovine or porcine oviductal epithelial cells in TCM 199 or Ham's F-10 and MediCult IVF media. No significant difference in developmental rates was shown between bovine and porcine oviductal epithelial cells.

The number of nuclei in the embryos cultured for 72 hours under each conditions was significantly reduced it than blastocyst *in vitro* conditions.

The number of nuclei in embryos cultured in TCM 199, Ham's F-10 and Medicult IVF medium were counted 68.1 ± 6.00 , 67.3 ± 4.49 , 66.4 ± 5.64 , and 94.3 ± 8.61 , 92.5 ± 7.60 , 92.1 ± 6.10 with BOEC and 93.3 ± 5.80 , 92.9 ± 6.53 , 92.3 ± 7.35 with POEC coculture, respectively. These numbers were lowered than 107.2 ± 7.43 *in vivo* conditions.

In conclusions, the coculture between the mouse early embryos, and oviductal epithelial cells of BOEC and POEC give to improve the developmental and hatching rates of blastocyst but *in vivo* culture systems for the growth of nuclei were ineligible than *in vitro* conditions.

(Key words : Co-culture, Oviductal epithelial cells, Mouse embryo, Nuclei count)

* 단국대학교 의과대학 산부인과학교실 (Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Dankook University)

I. 서론

체외수정 및 배아이식을 통한 임신율의 향상에 큰 진전이 없는 이유는 부적절한 체외배양 환경이 큰 요인으로 작용하며 이러한 문제점을 극복하기 위한 기초 연구로 적합한 체외배양 조건과 초기배 발달을 좌우하는 요소들에 대한 다양한 연구가 이루어져 오고 있으나 아직까지 체내와 유사한 배양조건의 확립에 대해서는 미비한 실정이다.

배양조건에 관한 연구로 체내와 가장 유사한 체외배양 조건을 만들어 줌으로써 배발달을 증진시키는 배양 방법이 연구되었다(Goto 등, 1994; Dawson 등, 1992; Rieger 등, 1992) 체외배양방법은 정상적인 체내 조건과 같은 환경을 조성해 주지 못하므로 배아의 발달율이 체내에서의 배아 발달율에 비해 저조하게 나타나며 이를 수정과 배아의 초기발생이 이루어지는 난관과 비슷한 환경을 조성해 줌으로써 체외에서도 체내와 비슷한 발달율을 얻을 수 있다(Bavister, 1988; Bongso 등, 1988; Bongso 등, 1989; Minami 등, 1992). 이러한 이유로 여러 배양법들이 개발되었으며 그 예로 포유류의 난관에 직접 배아를 넣어 체외배양하는 기관배양법(organ culture method; Whittingham, 1971; Minami 등, 1988), 포유류의 난관 상피세포(oviductal epithelial cell)를 분리하여 배아와 공배양하는 방법(co-culture system; Eyestone과 First, 1989; Sakkas와 Trounson, 1990), 자궁에서 상피세포(endometrial epithelial cell)를 분리하여 공배양하는 방법(Lindenberg 등, 1984; Bongso 등, 1988), 과립세포(granulosa cell)와 난구세포(cumulus cell)를 이용한 공배양(Dandekar 등, 1991) 등이 있으며 이중에서 난관상피세포가 채취와 배양이 용이하고 발생능의 향상 효과도 높아 인간을 포함한 여러 동물의 배발달에 좋은 영향을 미친다(Katska 등, 1995; Kano 등, 1994; Wiemer 등, 1991; 이 등, 1996)고 하였다.

공배양의 효과에 대한 기전은 명확히 밝혀져 있지 않지만 수정란과 상피세포와의 공배양시 배양액내에 존재하는 독성물질을 중화시키거나 성장인자, 호르몬 등이 분비되어 배아의 성숙과 발달을 향상시키며 발생을 저해하는 물질을 제거하는 효과를 얻을 수 있으며

(Bavister, 1988), 다른 종의 난관 상피세포와의 공배양 효과에 대한 연구에서도 배발달율과 특히 배반포로의 발달율에 좋은 효과를 나타내며(Sparks 등, 1992; Xu 등, 1992; Minami 등, 1988; Eyestone 등, 1985) 사용되는 세포의 종이나 조직에 대한 특이성이 없는 것으로 알려져 있다.

이에 본 연구에서는 마우스 초기배를 소 및 돼지의 난관 상피세포와 공배양하여 배반포 형성 후 핵수를 조사하여 배양액 단독으로 배양된 경우와 비교하여 체외 발달율이 향상될 수 있는지와 체내에서 발달된 배아와 얼마나 유사한 발달양상을 보이는가를 비교하여 안정되고 효과적인 배양체계를 마련하기 위한 기초연구로 본 실험에 착수하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 본교 실험동물사육실에서 사육된 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다. 자성은 4~6주령, 체중은 20~30g의 것을, 용성(교배용)은 12~16주령, 체중은 30~45g의 것을 사용하였다. 사육실 환경은 온도(22~25℃), 일조(light : dark = 11 : 13) 및 환풍은 자동조절하였으며, 사료(삼양사)와 물은 자유급식하였다.

2. 배양액의 제조

배아 및 난관세포의 회수에는 heat-inactivated된 7.5% FCS이 함유된 D-PBS를 이용하였고 배아 및 난관세포의 배양에는 복합배양액으로서 Ham's F-10 (Gibco), TCM 199(Gibco)과 MediCult(Medicul-t, Denmark) IVF 배양액을 사용하였다.

각 배양액에는 모두 75mg의 penicillin G와 streptomycin sulfate를 첨가하였고 Ham's F-10에는 Ca-lactate(Calbiochem) 245.2mg과 sodium bicarbonate 2,106mg을, TCM 199에는 Ca-lactate 245.2mg과 sodium bicarbonate 2,200mg을 추가로 첨가하여 제조하였고 0.1N의 HCl과 NaOH를 사용하여 pH는 7.4~7.6으로, 삼투압은 280~285mOsm/kg으로 보정하여 사용하였다.

Ham's F-10 및 TCM 199의 단백질원으로는 태아 체대혈청을 15%의 농도로 첨가하여 사용하였다.

3. 난관 상피세포의 준비

1) 소 및 돼지 난관 상피세포의 준비

도축장에서 도살 직후에 적출된 난관을 penicillin G(75mg/L), streptomycin sulfate(75mg/L)와 amphotericin B(0.25mg/L)가 포함된 D-PBS로 세척 후 알루미늄 호일로 잘 포장하여 얼음을 채운 보온 상자에 넣어 1시간내에 실험실로 운반하였다. 난관 주위의 결체조직과 혈액 등을 깨끗이 제거한 후 항생제가 포함된 D-PBS로 세척하고 멸균된 거어즈로 난관 표면을 깨끗이 닦아낸 후 오염의 가능성이 있는 양 끝부분을 약 1cm 정도 잘라낸 뒤에 난관협부 끝부분에서 누두부 방향으로 slide glass를 이용하여 난관표면을 부드럽게 scrapping 한 후(Eyestone 등, 1989) D-PBS(7.5% FCS) 2ml씩을 관류시켜 난관 상피세포를 회수하였다. 채취된 상피세포를 300×G에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 다시 D-PBS로 부유시켜 같은 방법으로 세척하였다. 세척 후 상층액은 버리고 침전된 상피세포 덩어리(pellet)에 1ml의 D-PBS를 첨가하여 일회용 주사기(1ml)를 이용하여 서서히 흡입하고 부유시키는 과정을 약 3회 정도 되풀이하여 세포덩어리를 잘게 부수고 최종적으로 2ml의 D-PBS를 첨가하여 동일한 방법으로 세척하여 세포를 준비하였다.

2) 난관 세포계의 배양

분리된 난관 상피세포의 초기배양을 위하여 각각의 배양액(15% HCS가 첨가된 Ham's F-10, TCM 199과 MediCult IVF 배양액)을 첨가하여 잘 혼합하고 혈구계측기를 사용하여 세포수를 세서(Dawson, 1992) 배양액에 최종 농도가 10^6 cells/ml이 되도록 세포수를 조절하여 배양하였다. 배양확인 은 배양 3일 후 역반사현미경하에서 하였고 부착된 단일층의 정도를 확인한 후 배양액을 교체하였으며 이후 2일 간격으로 배양액을 교체하였다.

계대배양은 완전한 단일층이 형성된 상피세포에 0.25% Trypsin-0.53mM EDTA를 첨가하여 세포들을 분리시킨 후 초기의 세포회수시와 동일한 방법으로 세척한 후 세포수를 10^5 cells/ml로 조절하여 4-well 조직배양접시(Nunc)에 분주하여 계대배양을 시작하였

다. 배양액의 교체는 48시간마다 하였고 배양접시 표면에 약 70% 정도로 단일층이 형성되었을 때 공배양에 이용하였다.

4. 2-세포기 배아의 회수

암컷 생쥐의 복강에 7.5 I.U.의 PMSG(Sigma)와 7.5 I.U.의 hCG(Sigma)를 각각 48시간 간격으로 주사하여 다배란 유도를 하였다. hCG를 주사한 후 자연 교미를 유도하였으며 교미의 여부는 hCG 주사 후 12~14 시간에 암컷의 질전 유무에 의하여 확인하였다.

후기 2-세포기 배아의 회수를 위해 hCG 주사 44~48시간 경과 후 경추탈구로 도살하고 복부를 절개하여 양 난관을 무균적으로 채취하여 30-gauge needle이 부착된 일회용 주사기(1ml)로 누두부에서 난관협부 쪽으로 D-PBS 0.2ml을 관류하여 후기 2-세포기 수정란을 회수하였다.

5. 난관 상피세포와의 공배양 및 발생 관찰

회수된 후기 2세포기 배아를 계대배양된 상피세포와 공배양하여 발달율을 조사하였다. 회수된 수정란은 세척 후 형태적으로 정상적인 수정란만을 실험에 공시하여 공배양군과 배양액 단독배양 군의 무작위로 나누어 배양하였다. 각 난관 상피세포의 monolayer가 형성된 4-well 배양접시내에 수정란을 투입, 공배양하여 후기배로의 발달상태를 관찰하였다. 발생 관찰은 매 24시간 간격으로 96시간까지 하였고 배양액은 48시간마다 교체하였다.

6. 핵수 판정

각 처리구의 체외배양란은 체외배양 72시간 후에, 대조구의 체내배양란은 hCG 투여 후 120시간만에 팽윤배반포를 채란하여 각각의 핵수를 조사하였다. 투명대를 녹이기 위한 acidic tyrode(AT)용액은 100ml의 물에 sodium chloride 800mg, potassium chloride 20mg, calcium chloride 24mg, magnesium chloride 10mg, glucose 100mg, polyvinylpyrrolidone (PVP) 400mg을 만들어 0.2N의 HCl로 pH를 2.5로 조절한 후 멸균여과하여 -20°C 에 보관하였다.

제조된 AT 용액을 실온에 맞춘 후 핵수를 조사할 배반포배를 약 3분간 방치하여 투명대를 제거한 후 배

양액으로 3차례 세척하였다(Papaioannou 등, 1988). 투명대가 제거된 배반포배를 2.5 μ g/ml의 bisbenzimidide(Hoechst A33342, Sigma)가 함유된 배양액으로 옮겨 20분동안 배양하여 염색한 후 신선 배양액으로 3차례 세척하였다. 배반포배를 slide glass에 도말하여 UV-1A filter가 부착된 형광현미경(Optiphot-2, Nikon)하에서 관찰하여 핵수를 조사하였다(Pursel 등, 1985).

7. 통계처리

통계학적 분석은 T-test를 실시하였으며, p값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 난관 상피세포와의 공배양효과

난관 상피세포와 마우스 초기배를 공배양하여 얻은 배 발달율은 Table 1과 같다. BOEC에서 공배양한 경우 배반포로의 배발달율은 TCM 199에서 96.5%, Ham's F-10에서 95.5%, MediCult IVF media에서 94%를 나타냈으며 부화율은 각각의 배양액에서 90.5, 89.5, 85.5%를 나타내었다. POEC과의 공배양에서도

배반포로의 배 발달율은 TCM 199에서 97%, Ham's F-10에서 94.5%, Medicult IVF media에서 91%를 나타냈으며 부화율은 각각 89, 90, 84.5%를 나타내었다.

BOEC에서 배양한 경우에 부화율에서 TCM 199, Ham's F-10 두 배양액과 Medicult IVF media 간의 유의차가 인정되었고 POEC에서 배양한 경우에는 전 발달단계에 걸쳐 TCM 199, Ham's F-10 두 배양액과 Medicult IVF media 간의 유의차가 인정되었다 ($P < 0.05$).

난관 상피세포와 배아와의 공배양은 배양액만으로 단독 배양하는 경우에 빈번히 발생하는 배세포의 분할 정지, 퇴화 및 배세포의 질이 저하되는 것을 현저히 감소, 개선시킬 수 있으며 생체내의 환경과 가장 근접한 배양방법으로서 난관 내부와 유사한 환경을 조성하여 배아 발달율을 높일 수 있다고 여러 연구자들에 의해 이미 알려져 왔다(Kano 등, 1994; Minami 등, 1988). 또한 현재까지의 연구보고에 의하면 난관 상피세포를 포함한 여러 종류의 체세포와 수정란을 공배양할 경우 수정란의 체외발달을 촉진시키며 배반포 발달율과 부화율의 증가와 더불어 세포수의 증가가 나타난다고 알려져 있다(Freeman 등, 1993; Goto 등, 19

Table 1. *In vitro* development of 2-cell mouse embryos when co-cultured with bovine and porcine oviductal epithelial cells in different media

Co-culture cells	Media	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
			Blastocyst	Hatching	Degeneration
BOEC*	TCM 199/HCS	200	193 (96.5 \pm 2.56) ^{NS}	181 (90.5 \pm 3.66) ^a	7 (3.5 \pm 2.56) ^{NS}
	Ham's F-10/HCS	200	191 (95.5 \pm 2.56) ^{NS}	179 (89.5 \pm 2.07) ^a	9 (4.5 \pm 2.56) ^{NS}
	Medicult IVF	200	188 (94.0 \pm 3.02) ^{NS}	171 (85.5 \pm 3.66) ^b	2 (6.0 \pm 3.02) ^{NS}
POEC**	TCM 199/HCS	200	194 (97.0 \pm 1.85) ^a	178 (89.0 \pm 4.14) ^a	6 (3.0 \pm 1.85) ^a
	Ham's F-10/HCS	200	189 (94.5 \pm 2.98) ^a	180 (90.0 \pm 4.7) ^a	11 (5.5 \pm 2.98) ^a
	Medicult IVF	200	182 (91.0 \pm 3.55) ^b	169 (84.5 \pm 3.96) ^b	18 (9.0 \pm 3.55) ^b

^{a,b} Table with different superscripts in the same column was significantly different at $P < 0.05$.

*BOEC : bovine oviductal epithelial cells.

**POEC : porcine oviductal epithelial cells.

94; Shamsuddin 등, 1993).

공배양에 사용되는 난관 상피세포는 일반적으로 1차 배양 또는 2차 이상 계대배양된 세포를 사용하나 섬모세포와 분비세포(ciliated and secretory cell)가 서로 혼합되어 있는 1차 배양세포보다는 분비세포로만 구성되어 세포 분할 및 발달에 필요한 영양소를 공급하는 계대배양세포를 주로 사용하며 마우스(Minami 등, 1992), 돼지(White 등, 1989), 소(McCaffrey 등, 1991), 양(Watson 등, 1994) 등 여러 포유동물의 수정란 혹은 2세포 배아를 난관 상피세포와 공배양하였을 경우 대조군에 비하여 매우 높은 배반포로의 발달율을 볼 수 있다. 다른 종의 난관 상피세포와의 공배양 효과에 대한 연구에서도 배 발달율에 좋은 효과를 나타내며(Sparks 등, 1992) 사용되는 세포의 종이나 조직에 대한 특이성이 없는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서도 2차 계대 배양된 난관 상피세포를 공배양에 사용하여 발달율과 부화율을 조사하였으며 높은 배반포 발달율과 부화율을 나타내었다. 이러한 결과는 난관 상피세포에서 분비된 물질이 배아의 후기발달에 작용하여 세포의 증식을 촉진시키고 배아의 발달을 억제하는 물질들이 제거됨으로써 발달율과 부화율이 높게 나타난다고 사료되며(Bongso 등, 1989), 특히 난관 상피세포에서 분비되는 배아 성장촉진인자에 의한 효과가 주된 원인인 것으로 생각된다.

2. 핵의 수 조사

이상의 실험에서 서로 다른 종류의 배양액과 배양방법에 따른 핵의 수 조사에서는 각 실험군마다 현격한 차이를 나타냈다. 체리군인 체외배양된 팽윤배반포 배아와 대조군인 체내에서 발달한 팽윤배반포 배아의 핵의 수 조사 결과는 Table 2와 같다. 가장 많은 핵수를 보인 것은 체내에서 발달한 배아로서 평균 107.17개의 핵수를 보였다. 공배양한 군에서는 TCM 199 배양액에서 BOEC와 공배양한 경우 94.27개, POEC와 공배양한 경우 93.33개를 나타냈으며, 배양액에서만 배양한 경우에는 TCM 199에서 68.1개의 핵수를 나타냈다. 체내배양군, 공배양군, 배양액 단독 배양군간에는 모두 고도의 유의차가 인정되었으며 모든 배양군에서 전반적으로 TCM 199 배양액이 다른 배양액에 비해 다소 증가된 경향을 나타냈다.

본 연구에서는 초기배아의 체외 배양시 최적의 배양 조건을 알아보기 위하여 마우스의 2-세포 후기배를 서로 다른 배양액과 배양조건에서 배양하였다. 즉 체내의 환경과 유사한 배양환경을 알아보기 위해 배양액 단독으로 배양한 경우와 난관 상피세포와 공배양하여 팽윤 배반포로 발달한 배아를 체내에서 발달한 배아와 핵의 수를 비교함으로써 발달율을 비교하였다. 실험결과 배양액 단독배양군에서 보다는 공배양군에서 훨씬 많은 핵수를 나타냈지만 체내에서 배양된 배아에 비해

Table 2. Effect of different media and co-culture systems on the number of nuclei in mouse embryos cultured *in vitro* for 72 hours or collected *in vivo* for 120 hours after

<i>In vitro</i> culture		No. of Embryos Cultured	No. of nuclei / Expended blastocyst
Media	Co-culture		
TCM 199 /HCS	Media only	30	68.1 ± 6.00c (48~82)
	BOEC	30	94.3 ± 8.61b (67~111)
	POEC	30	93.3 ± 5.80b (79~103)
Ham's F-10 /HCS	Media only	30	67.3 ± 4.89c (51~78)
	BOEC	30	92.5 ± 7.60b (75~110)
	POEC	30	92.9 ± 6.53b (78~108)
Medicult IVF media	Media only	30	66.4 ± 5.64c (49~81)
	BOEC	30	92.1 ± 6.09b (75~104)
	POEC	30	92.3 ± 7.35b (75~108)
<i>In vivo</i> developed		30	107.2 ± 7.43a (89~121)

^{NS} Table with different superscripts in the same column was significantly different at P < 0.05.

서는 훨씬 미치지 못하고 있다. 이러한 결과는 난관 상피세포와 공배양시 체내와 유사한 환경을 조성해 체외 발달율에 있어서 상당히 효과적인 결과를 보여주지만 체내에서의 발달과 비교해 보면 아직까지 미흡한 실정이다. 현재까지의 연구보고로는 다양한 종류의 체세포와 수정란을 공배양할 경우 일반적으로 수정란의 체외 발달율을 촉진시켜 배반포로의 발달을 향상, 부화율의 증가와 더불어 세포수의 증가가 이루어진다고 알려져 있으나 이러한 공배양이 배아의 발달에 어떠한 작용을 하는지는 분명하지 않다. 그러나 공배양시 배양액내의 세포 독성물질 제거(Flood와 Shirley, 1991), growth factor의 방출(Simmen 등, 1993) 및 glycine, glutathione 등과 같은 산화 방지 물질의 방출(Rieger, 1992) 등과 같은 효과로 인해 발달율이 향상되는 것으로 사료된다.

IV. 적 요

소와 돼지의 난관 상피세포가 마우스 초기배의 발달에 미치는 영향과 체외배양에 있어 최적의 배양조건을 알아보기 위하여 ICR 계통의 마우스에 PMSG 7.5 IU와 hCG 7.5 IU를 각각 복강주사하고 자연교미하여 48시간 경과 후에 난관에서 2-세포 초기배를 D-PBS로 관류하여 회수하였다. 회수된 배아는 소와 돼지의 난관 상피세포와 공배양하여 그 효과를 배반포 발달율과 핵의 수를 조사하였다. 또한 생체내와 실험관내의 발육상태를 비교하기 위하여 hCG접종후 120 시간동안 생체내에서 발육시킨 신선 배반포배를 자궁에서 채취하여 그 핵수를 계산하였다.

마우스 초기배는 TCM 199, Ham's F-10, Medicult IVF 배양액에서 소 난관 상피세포 또는 돼지 난관 상피세포와 공배양할 경우 91~97%의 높은 배반포 발달율을 보였으며 난관 상피세포간의 차이는 나타나지 않았다.

각 배양조건에 따라 배양된 배반포의 핵수는 체내에서 자란 배반포에 비해 체외에서 배양한 배반포에서 유의적으로 적었다. 체외배양중 핵수는 공배양하지 않은 TCM 199, Ham's F-10, Medicult IVF medium에서 각각 68.1 ± 6.00 , 67.3 ± 4.49 , 66.4 ± 5.64 개로 나타났으며 BOEC와 공배양하였을 경우에는 94.3 ± 8.61 , 92.5 ± 7.60 , 92.1 ± 6.10 개, POEC와 공배양하

였을 때는 93.3 ± 5.80 , 92.9 ± 6.53 , 92.3 ± 7.35 개로 체내에서 배양된 배반포의 경우의 107.2 ± 7.43 개보다 적었다.

이상의 결과로 난관 상피세포인 BOEC와 POEC는 마우스 초기배아와의 체외공배양시 배아의 발달과 분화에 이로운 영향을 주어 발달율과 부화율을 향상시키나 핵수 증가에서는 체내조건보다 미흡한 것으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Bavister, B. D. 1988. Role of the oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 29:113-154.
2. Bongso, A., B. Gajra, P. L. Ng, P. C. Wong, S.C. Ng and S. Ratnam. 1988. Establishment of human endometrial cell cultures. *Hum. Reprod.*, 3:705-713.
3. Bongso, A., S. C. Ng, H. Sathananthan, P. L. Ng, M. Rauff and S. S. Ratnam. 1989. Establishment of human ampullary cell culture. *Hum. Reprod.*, 4:486-494.
4. Dandekar, P. V., M. C. Martin and R. H. Glass. 1991. Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil. Steril.*, 55:95-99.
5. Dawson, M. 1992. Initiation and maintenance of cultures, Cell Culture Labfax, Butler, M., and Dawson, M., BIOS Scientific Publishers Ltd, St. Thomas House, Becket Street, Oxford, 25-42.
6. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 85:715-720.
7. Eyestone, W. H., D. L. Northey, M. L. Leibfried-Rutledg. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.*, 32(Suppl. 1), 100a(Abstr.).
8. Flood, L. P. and B. Shirley. 1991. Reduction

- of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:226-231.
9. Freeman, M. R., M. C. Bastias, G. A. Hill, K. G. Osteen. 1993. Coculture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct, and uterine endometrium. *Fert. Steril.*, 59:138-142.
 10. Goto, K., N. Iwai, K. Ide, Y. Takuma, and Nakanishi. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro*: comparison of cell-free culture with coculture. *J. Reprod. Fert.*, 100:239-243.
 11. Kano, K., T. Miyano, and S. Kato. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:1061-1068.
 12. Katska, L., B. Rynska and Z. Smorag. 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocyte. *Theriogenology*, 43:859-870.
 13. Lindenberg, S., J. G. Lauritsen, M. H. Nielsen and J. F. Larsen. 1984. Isolation and culture of human endometrial cells. *Fertil. Steril.*, 41:650-652.
 14. McCaffrey, C., T. G. McEvoy, M. G. Diskin, F. C. Gwazdauska, M. T. Kane and J. M. Sreenan. 1991. Successful co-culture of 1-4-cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.*, 91:119-124.
 15. 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 Research*, 19:235-240.
 16. 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.
 17. Papaioannou, V. E. and K. M. Ebert. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development*, 102:793-803.
 18. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad Jr., R. E. Hammer and R. L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 24:687-691.
 19. 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.
 20. Sakkas, D. and A. O. Trounson. 1990. Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 90:109-118.
 21. Shamsuddin, M., B. Larsson, H. Gustafsson and H. Rodriguez-Martinez. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* matured and fertilized oocyte with or without support from somatic cells. *Theriogenology*, 39:1067-1079.
 22. Simmen, R. C., Y. M. Ko and F. A. Simmen. 1993. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology*, 39:163-175.
 23. Sparks, A. E. T., F. C. Gwazdauskas and M. L. McGillia. 1992. Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology*, 37:587-594.
 24. Watson, A. J., P. H. Watson, D. Warnes, 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.
 25. 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.
26. Whittingham, D. G. 1971. Development of zygotes in cultured mouse oviduct. I. The effect of varying oviductal conditions. J. Exp. Zool., 169:391-398.
27. Wiemer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski, A. I. McKenna, G. H. Fick and G. A. Schultz. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. Mol. Reprod. Develop., 30:330-338.
28. 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 oocyte matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fert., 94:33-43.
29. 이성, 허의중, 석호봉. 1996. 소와 돼지의 卵管上皮細胞와의 共培養이 마우스 初期胚의 體外發達에 미치는 영향. 韓國受精卵移植學會誌. 11(3):201-210.
(접수일자 : 1997. 5. 1. / 채택일자 : 1997. 5. 27.)