

# Matrigel이 첨가된 배양액에서 소 체외수정란의 발달

김동훈\* · 김세웅\* · 이민정 · 황인선 · 배성훈 · 양병철 · 임기순 · 성환후 · 양보석

축산연구소 응용생명공학과

## Development of *In vitro* Fertilized Bovine Embryos in Medium Supplemented with Matrigel

D. H. Kim\*, S. W. Kim\*, M. J. Lee, I. S. Hwang, S. H. Bae, B. C. Yang, G. S. Im,

H. H. Seong and B. S. Yang

Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute

### ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of Matrigel on the development of bovine embryos after *in vitro* fertilization. Bovine embryos were cultured in I) SOF + 0.8% BSA(SOF-B), II) SOF + 0.8% BSA plus 0.8% Matrigel(SOF-M) and III) SOF + 0.8% BSA and 10% FBS(SOF-BF). The addition of Matrigel appeared not to increase the proportion of blastocysts (SOF-B, 26.6%; SOF-M, 28.2%; SOF-BF, 26.2%). However, the proportion of hatched blastocysts were significantly increased ( $P < 0.05$ ) by Matrigel(SOF-B, 23.7%; SOF-M, 48.7%; SOF-BF, 18.5%). The means of cell number blastocyst was not significantly different among the treatment groups(SOF-B,  $172.7 \pm 35.5$ ; SOF-M,  $175.1 \pm 37.4$ ; SOF-BF,  $172.8 \pm 38.1$ ). The proportion of apoptotic cells in blastocyst was also found to be not significant among the treatment groups(SOF-B,  $3.6 \pm 3.2\%$ ; SOF-M,  $4.3 \pm 2.6\%$ ; SOF-BF,  $4.9 \pm 4.3\%$ ). In this experiment, Matrigel appeared to support embryonic hatching of bovine embryos. Results suggest that Matrigel, as extracellular matrix components, may be another avenue for formulating more physiological culture system in serum-free culture.

**(Key words :** Matrigel, Bovine, *In vitro* fertilization, Hatched blastocyst)

### I. 서 론

포유동물 수정란의 체외발달은 체외수정에서 가장 중요한 과정 중의 하나이다. 불충분한 체외발달 조건은 생존력이 저하된 수정란을 생산함으로서, 이러한 수정란을 이식했을 때 낮은 착상 및 임신율을 나타내기 때문이다. 따라서 체외에서 생산되는 수정란의 질적 향상을 위해서는 체내 조건과 유사한 발생환경을 조성하는 것이 매우 중요하다.

일반적으로 수정란의 체외배양을 위해서 수정란 배양액에는 혈청을 첨가하며, 이것은 수정란 배양에 혈청의 이용은 높은 유산율, 임신 합병증, 임신기간의 연장 그리고 비정상적 거대산자에 의한 높은 신생자 사망 등과 연관된 것으로 알려지고 있다(Hasler 등, 1995; Farin 등, 2001). 배양액 내에 혈청의 첨가는 대사작용의 이상, 미토콘드리아 미세구조의 손상 그리고 세포질 내 다량의 지질형성을 초래해서

\* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author : Kim, Dong-Hoon Ph.D. Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute 564 Omokchun-dong, Kwonsun-gu, Suwon 441-706, Korea.  
TEL: +82-31-290-1633, E-mail: kimdhj@hanmail.net

수정란 자체에 직접적인 악영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Farin 등, 2001; Gardner 등, 1994; Dorland 등, 1994; Crosier 등, 2000). 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 높은 배반포 발달과 정상적인 임신을 유지할 수 있는 무혈청 배양체계를 확립하는 것이 요구된다.

최근에는 포유동물 수정란의 체외발달을 위한 배양액은 많은 발전이 있어왔다. 비타민, 호르몬, 아미노산 그리고 항산화제와 같은 물질은 초기 수정란 발달에 필요한 대사과정에 유효한 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 물질들은 수정란 배양액의 구성성분으로 첨가되었으며, 무혈청 배양조건에서 수정란의 발달에 효과적임을 보고하였다(Gardner와 Lane, 1996; Dunlison 등, 1996). 연구자들은 보다 효과적인 무혈청 배양체계로서 난관과 자궁에서 분비되는 glycoprotein과 같은 특이적인 물질들을 배양액에 첨가하는 것을 고려하였다(Turpeenniemi-Hujanen 등, 1995; Harvey 등, 1995).

세포외 기질(extracellular matrix: ECM) 단백질은 자성 생식기관에 풍부하게 존재하며, collagen matrix과 부착단백질인 laminin, fibronectin 등으로 구성되어 있다(Figueiredo 등, 2002; Desai 등, 1999). ECM 단백질은 다양한 조직에서 세포의 성장, 분열과 분화, 사멸에 조절적 역할 뿐만 아니라 착상시 수정란과 자궁의 상호작용에 직접적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Turpeenniemi-Hujanen 등, 1995). 그러나, ECM 단백질에 대한 연구는 주로 수정란의 초기 착상 및 착상단계에서의 역할에 대해서 진행되어 왔을 뿐 착상전 수정란의 발달에 대한 연구는 많이 이루어져 있지 않다.

Matrigel은 상업적으로 판매되고 있는 ECM 복합체로서, 세포배양시 Matrigel의 이용은 세포성장에 유용한 것으로 보고되고 있다(Kubota 등, 1988). 또한, 몇몇 연구들은 체외배양시 저농도 Matrigel의 첨가가 생쥐 수정란의 배반포 형성과 부화를 증진시킨다고 보고하고 있다(Lazzaroni 등, 1999, 정 등, 2000). 그러나 현재까지 소 수정란 체외배양에 있어서 Matrigel의

첨가효과를 실험한 결과는 보고되고 있지 않다. 따라서, 본 연구의 목적은 무혈청 배양조건에서 소 체외수정란의 체외발달에 있어서 배양액 내에 ECM 복합체인 Matrigel 첨가효과를 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포난의 회수

도축장에서 도살 직후 채취된 한우 난소를 37℃의 멸균 생리식염수가 충만된 보온병에 담아 실험실로 운반하였다. 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거한 후, 18 gauge 주사침이 부착된 주사기를 이용하여 2~7 mm 가시난포로부터 난포액을 흡입하였다. 흡입된 난포액은 조직배양용 petri dish에 옮겨, 실체현미경 하에서 난구세포가 치밀하게 부착되고 세포질이 균일한 난자만을 선별하여 난자세척용 배양액(HEPES-TCM199 + 10% FBS)으로 3회 세척 후, 체외성숙에 이용하였다.

### 2. 체외성숙

회수된 한우 난포난의 체외성숙에는 TCM-199 (Gibco-BRL, U.S.A.)을 기본배양액으로 10% FBS (Gibco-BRL, U.S.A.), 0.2 mM sodium pyruvate, 1µg/ml FSH(Folltropin-V, Vetrepharm, U.K.), 1µg/ml estradiol-17β(Sigma, U.S.A.) 그리고 10 ng/ml EGF (Sigma, U.S.A.)가 첨가된 배양액을 사용하였으며, 체외성숙 배양액 0.5ml의 소적을 만들어 멸균된 mineral oil로 피복하여 배양 2~3시간 전에 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 그리고 39℃ 조건에서 평형시키고, 각 소적에 30~50개의 난포난을 옮겨서 22~24시간 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

### 3. 체외수정

체외성숙이 유도된 난포난의 체외수정을 위해서, 먼저 성숙난포난을 Fert-TALP 배양액으

로 2회 세척을 하였다. 체외수정 배양액은 Fert-TALP 배양액에 6 mg/ml fatty acid free BSA (Sigma, U.S.A.), 10 µg/ml heparin(Sigma, U.S.A.) 그리고 PHE stock(20 µM penicillamine, 10 µM hypotaurine 그리고 1 µM epinephrine)을 첨가하여 이용하였으며, 2시간 이상 전배양을 실시한 mineral oil이 피복된 50 µl의 체외수정용 Fert-TALP 배양액 소적에 10개의 성숙난포난을 침적하였다. 정자처리는 15 ml cornical tube에 각 2 ml로 만든 90%, 45% percoll 이중층의 상층부에 동결-용해된 한우정액을 분주한 후, 1,500 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 tube 하단의 정자층 만을 회수하여 6 mg/ml Fraction-V BSA(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 Sp-TALP 배양액을 이용하여 세척을 2회 실시하였다. 체외수정은 성숙난포난을 함유하고 있는 Fert-TALP 배양액 소적에 정자부유액을 주입하여 실시하였으며, 이때 최종정자농도는  $2 \times 10^6$ /ml로 조정하였다.

#### 4. 체외배양

체외수정 20~24시간 후, 수정된 난자는 난구세포를 제거하였다. 수정란은 8 mg/ml fatty acid free BSA가 첨가된 SOF 배양액으로 2회 세척을 한 후, 2시간 이상 전배양을 실시한 mineral oil이 피복된 20 µl의 SOF 배양액 소적에 5~10씩 넣어서 20시간 동안 배양을 실시한 다음, 2~4세포기 까지 발달된 수정란 만을 선별하여 실험에 이용하였다. 선별된 2~4세포기 체외수정란은 1) 8 mg/ml fatty acid free BSA가 첨가된 SOF 배양액(SOF-B), 2) 0.8%(v/v) Matrigel (BD, U.S.A.)과 8 mg/ml fatty acid free BSA가 첨가된 SOF 배양액(SOF-M), 그리고 3) 8 mg/ml fatty acid free가 첨가된 SOF 배양액에서 2일간 배양 후, 10% FBS가 첨가된 SOF 배양액에서 5일간 배양하였으며(SOF-BF), 체외수정 후 8일 째에 배반포 발달을 및 부화율을 조사하였다. 배양은 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> 그리고 39°C의 배양기 조건에서 실시하였다.

#### 5. 세포자연사 및 세포수 조사

체외에서 생산된 배반포의 세포자연사 및 세포수를 조사하기 위하여 김 등 (2006)의 방법에 준하여 TUNEL 분석을 실시하였다. 8일간 배양된 배반포는 0.3% PVP가 함유된 PBS(PVP-PBS)로 3회 세척한 후, 4% paraformaldehyde에 침적하여 4°C에서 24시간 동안 고정을 실시하였다. 고정된 배반포는 permeability를 위하여 0.5% Triton X-100에서 30분간 처리한 후, PVP-PBS에서 2번 세척하였다. 그리고 TUNEL reagent (Roche, Germany)에 배반포를 침적하여 39°C 배양기에서 1시간 동안 배양한 후, 0.5% Triton X-100와 PVP-PBS에서 각각 1번 세척하였다. 배반포의 핵을 염색하기 위하여 Hoechst 33342 (10 µg/ml)에 침적하여 상온에서 30분간 처리하였다. 염색된 배반포는 PVP-PBS에서 3회 세척을 실시한 후, slide glass 위에 mount하여 형광현미경 하에서 배반포의 전체 세포수와 세포자연사가 유발된 세포수를 각각 조사하였다.

#### 6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 실험결과에 대한 통계학적 분석은  $\chi^2$ -test와 Student's T-test를 사용하였으며, P<0.05일 때 유의한 것으로 정의하였다.

### III. 결 과

#### 1. Matrigel 첨가에 따른 소 체외수정란의 배반포 발달

배양액 내에 Matrigel 첨가에 따른 소 체외수정란의 배반포 발달율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 체외수정 후 40시간 째 2~4세포기로 발달된 수정란 만을 선별하여 체외배양을 실시한 결과, 체외수정 8일 째 배반포까지의 발달율은 SOF-B군이 26.6%, SOF-M군이 28.2% 그리고 SOF-BF군이 26.2%로서 실험군 간에 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 1. The effect of Matrigel on the development of bovine embryos

Group	No. of embryos cultured	No. of blastocysts(%)		
		Day-6	Day-7	Day-8
SOF-B	128	2 (1.6)	16 (12.5)	34 (26.6)
SOF-M	131	3 (2.3)	22 (16.8)	37 (28.2)
SOF-BF	130	6 (4.6)	24 (18.5)	34 (26.2)

No significant differences were found among groups.

Table 2. The effect of Matrigel on the hatching of bovine blastocysts

Group	No. of blastocysts examined	No. of developmental stage(%)		
		Blastocyst	Hatching-BL	Hatched-BL
SOF-B	39	24 (63.2)	5 (13.2)	9 (23.7) <sup>a</sup>
SOF-M	39	13 (33.3)	5 (12.8)	19 (48.7) <sup>b</sup>
SOF-BF	27	21 (77.8)	1 (3.7)	5 (18.5) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Value within column with different superscript differ (P<0.05).

Table 3. The effect of Matrigel on the cell number and apoptosis of bovine blastocysts

Group	No. of blastocysts examined	Cell number	Apoptotic cell number	Apoptotic cell (%)
SOF-B	17	172.7 ± 35.5	6.2 ± 5.6	3.6 ± 3.2
SOF-M	23	175.1 ± 37.4	7.4 ± 4.1	4.3 ± 2.6
SOF-BF	20	172.8 ± 38.1	7.7 ± 5.3	4.9 ± 4.3

Data are mean ± SD.

No significant differences were found among groups.

## 2. Matrigel 첨가에 따른 소 배반포의 부화

배양액 내에 Matrigel 첨가에 따른 소 배반포 부화율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 체외수정 후 8일째 배반포의 부화를 조사한 결과, 부화중인 배반포에 있어서는 각 실험군 간에 차이가 없었지만, 완전히 부화된 배반포의 비율은 SOF-M군이 48.7%로서 SOF-B군의 23.7% 그리고 SOF-BF군의 18.5% 보다 유의하게 높은 것으로 나타났다(P<0.05).

## 3. Matrigel 첨가에 따른 배반포의 세포수 및 세포자연사

배양액 내에 Matrigel 첨가에 따른 소 배반

포의 세포수 및 세포자연사를 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 체외수정 후 8일째 배반포의 세포수를 조사한 결과, SOF-M군이 175.1±37.4개, SOF-B군이 172.7±35.5개 그리고 SOF-BF군이 172.8±38.1 개로서 실험군 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 배반포에서 세포자연사가 유발된 세포수의 비율을 분석한 결과도 SOF-M군이 4.3±2.6%, SOF-B군이 3.6±3.2% 그리고 SOF-BF군이 4.9±4.3%로서 실험군 간에 차이가 없는 것으로 분석되었다.

## IV. 고찰

세포외 기질(extracellular matrix, ECM)은 포유동물의 자성 생식기관에 풍부하게 존재하며, 체

외에서 세포의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다(Martin과 Kleinman, 1981). 따라서 수정란 체외배양시 ECM 단백질의 이용은 체내배양과 유사한 환경조건을 모방할 수도 있다. 수정란의 체외발달에 있어서 ECM의 구성성분인 fibronectin이 코팅된 배양용기에서의 배양은 배반포의 발달을 유의하게 증가시키며(Piekos 등, 1995), 또한 ECM이 코팅된 배양용기에서 배양은 배반포 발달 뿐만 아니라 부화율도 유의하게 향상시킨다고 보고하고 있다(Desai 등, 1999). 이러한 결과들은 수정란의 체외배양에 있어 ECM 단백질이 첨가물질로서 충분한 가치가 있음을 보여주고 있다.

Matrigel은 Engelbreth-Holm-Swarm(EHS) mouse sarcoma로 부터 추출한 용액상태의 ECM 복합체로서 주성분은 laminin, collagen IV, heparan sulfate proteoglycans, entactin, nidogen 등의 ECM 단백질이며, transforming growth factor-beta(TGF- $\beta$ ), fibroblast growth factor(FGF), tissue plasminogen activator (tPA) 등의 성장인자가 소량 존재한다(Kleinman 등, 1982; McGuire와 Seeds, 1989). Matrigel의 특징은 0~4°C 온도에서는 액체상태로 존재하지만, 실온 이상의 온도가 되면 중합체를 형성하여 겔 상태를 유지하게 된다. 따라서 일반적인 Matrigel 이용방법은 세포배양 용기 표면에 코팅하여 세포배양에 이용하는 것이다. 이러한 방법으로 Matrigel을 이용하면 세포배양시 세포의 성장을 촉진하는 것으로 보고되고 있으며(Kubota 등, 1988), 또한 수정란 배양에서도 배양액을 단독 사용했을 때 보다 수정란의 성장을 촉진해서 배반포 발달 및 부화율을 증가시키는 것으로 나타났다(Carnegie 등, 1995). 그러나 Matrigel을 세포배양 용기 표면에 코팅하는 방법은 처리과정의 번거로움이 있다. 이러한 처리과정의 번거로움을 해결하고자 배양액에 직접 첨가하여 수정란 배양에 이용하는 방법을 모색한 결과, Matrigel을 0.5~0.8%의 저농도로 배양액에 첨가하면 세포배양 온도에서도 중합체를 형성하지 않고 용액상태를 유지함을 확인하였다. 또한, 이러한 방법으로 생쥐수정란을 배양하여 배반포 발달 및 부화율이 유의하게 증진되는 것을 확인하였다(Lazzaroni 등,

1999; 정 등, 2000). 본 연구에서 소 체외수정란의 발달에 있어서 배양액 내에 Matrigel의 첨가 효과를 검토한 결과는 배반포 발달은 증진시키지 않았으나, 배반포 부화율을 유의하게 향상시키는 것으로 나타났다.

일반적으로 체외배양된 수정란은 부화율이 낮은 것으로 보고되고 있으며, 이것은 투명대 경화현상 혹은 투명대 용해제의 감소가 그 원인으로 추정된다(Zhang 등, 1991; Schiewe 등, 1995). 배양액에 혈청의 첨가는 plasminogen을 공급함으로써 투명대 경화현상을 감소시켜 배반포의 부화를 증진시키며, 특히 소 수정란은 투명대를 용해시키고 부화를 용이하게 하는 plasmin으로 plasminogen을 전환시키는 것으로 알려져 있다(Kaaekuahiwi와 Menino, 1990). 그러나 BSA를 이용한 무혈청 배양액은 세포 공배양 그리고 혈청 배양액 체계에 비하여 수정란의 부화율이 낮고 그리고 그 시기가 지연되는 것으로 보고되고 있다(Carnegie 등, 1995; Nedambale 등, 2004).

몇몇 연구보고에 의하면, 수정란 배양시 배양액 내 ECM 단백질의 첨가는 배반포 부화율을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 초기 수정란에서 Protease activity는 배양기질과 ECM 단백질에 의해서 영향을 받을 수 있다(Desai 등, 1999). 수정란에 의해 분비되는 urokinase plasminogen activator(uPA), type IV collagenase와 같은 기저막 분해효소들은 탈락막을 통해 수정란이 침투하게 함으로서 착상과정에서 중요한 역할을 수행한다(Turpeenniemi-Hujanen 등, 1995). 면양의 배반포에서 ECM 구성 단백질인 fibronectin, collagen type IV 그리고 laminin이 trophoctoderm과 inner cell mass 성장에 미치는 효과를 조사한 결과는 ECM의 종류가 세포 outgrowth와 uPA 분비에 직접적인 영향을 준다고 보고하고 있다(Bartlett와 Menino, 1995). 또한 trophoblast를 laminin과 배양했을 때, 보다 높은 type IV collagenase activity를 나타냈다(Emonard 등, 1990). 사람 수정란 배양에 있어서, laminin의 첨가는 type IV collagenase activity를 증진시킴으로써 체외 부화율을 향상시킨다고 보고하고 있다(Turpeenniemi-Hujanen 등, 1995). 이러한 결과들

은 수정란 체외배양체계에 있어서 ECM 단백질의 첨가는 수정란이 체외환경에서 배양되는 동안 수정란에 보다 생리적 조건에 가까운 환경을 제공함으로써 부화 및 착상관련 과정을 촉진하는 역할을 수행하는 것으로 사료된다. 본 실험에서도 ECM 복합체인 Matrigel을 배양액에 첨가한 결과, 소 체외수정란의 부화가 일찍 시작될 뿐만 아니라 유의하게 증진되는 것을 확인하였다.

배반포의 세포수 및 세포자연사(apoptosis)가 유발된 세포수는 체외생산된 배반포의 질을 평가하는데 있어서 중요한 지표이다. 배반포의 세포수는 착상전 수정란의 생존성에 대한 정확한 지표가 되며(Papaioannous와 Ebert, 1988), 이러한 세포수는 성장환경, 체외배양조건 등에 의하여 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(Stojkovic 등, 1998). 세포자연사는 환경적 스트레스 그리고 염색체 이상에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다(Hardy, 1997; Matwee 등, 2000). 수정란에서의 세포자연사는 체내수정란에 비해서 체외수정란에서 많이 유발되며, 이러한 세포자연사의 유발 정도는 배양액과 배양방법과 같은 체외배양 환경에 의존적인 것으로 보고되고 있다(Brison과 Schultz, 1997). 배양액 내에 heparan sulfate proteoglycans, Matrigel의 첨가는 생쥐 수정란에서 세포수를 증가시키며, 세포자연사가 유발되는 세포수가 감소한다고 보고하고 있다(Figueiredo 등, 2002; 정 등, 2000). 그렇지만 본 연구에서는 Matrigel의 첨가가 소 체외수정란의 배반포 세포수를 증가시키거나, 세포자연사가 유발되는 세포수를 감소시키는 경향을 확인할 수는 없었다.

전체적인 연구결과들을 살펴보았을 때, 소 체외수정란 발달을 위한 배양액에 Matrigel의 첨가가 생쥐실험 결과와 같이 배반포 발달 및 세포수 증가 그리고 세포자연사 감소를 나타내지 않았지만, 배반포 부화율은 생쥐실험 결과와 같이 유의하게 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과의 차이는 사용된 Matrigel 원재료의 기원 그리고 동물종 특이적 차이에 기인한 것으로 사료된다.

결론적으로, Matrigel은 소 체외수정란 배양

을 위한 무혈청 배양체계에서 배양액 첨가제로서 유용하게 이용될 수 있는 것으로 사료된다. 그리고 앞으로의 연구는 Matrigel이 소 수정란의 부화를 향상시키는 조절기전에 대한 연구가 신호전달 수준에서 이루어져야 할 것이다.

## V. 요 약

본 연구의 목적은 소 체외수정란의 체외발달에 있어서 Matrigel의 첨가효과를 조사하는 것이었다. 소 체외수정란은 I) SOF+0.8% BSA (SOF-B), II) 0.8% Matrigel이 첨가된 SOF+0.8% BSA (SOF-M), 그리고 III) SOF+0.8% BSA 배양 후, SOF+10% FBS(SOF-BF)에서 배양을 실시하였다. 배양액 내 Matrigel의 첨가는 배반포 발달율을 증가시키지 않는 것으로 나타났다(SOF-B, 26.6%; SOF-M, 28.2%; SOF-BF, 26.2%). 그러나, 부화 배반포의 비율은 Matrigel 첨가에 의하여 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(SOF-B, 23.7%; SOF-M, 48.7%; SOF-BF, 18.5%) ( $P<0.05$ ). 배반포의 세포수를 조사한 결과는 각 처리군 간에 차이가 없는 것으로 나타났으며(SOF-B,  $172.7 \pm 35.5$ ; SOF-M,  $175.1 \pm 37.4$ ; SOF-BF,  $172.8 \pm 38.1$ ), 또한 세포자연사가 유발된 세포수의 비율도 각 처리군 간에 차이가 없는 것으로 조사되었다(SOF-B,  $3.6 \pm 3.2\%$ ; SOF-M,  $4.3 \pm 2.6\%$ ; SOF-BF,  $4.9 \pm 4.3\%$ ). 본 실험결과는 Matrigel이 소 체외수정란의 부화과정을 촉진시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, 세포외 기질 복합체인 Matrigel의 첨가는 무혈청 수정란 배양체계에서 보다 생리적인 환경을 조성할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## VI. 인 용 문 헌

1. Bartlett, S. E. and Menino, A. R. Jr. 1995. Evaluation of extracellular matrices and the plasminogen activator system in sheep inner cell mass and trophectodermal outgrowth *in vitro*. Biol. Reprod. 52:1436-1445.

2. Brison, D. R. and Schultz, R. M. 1997. Apoptosis during mouse blastocyst formation; evidence for a role survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.* 56:1088-1096.
3. Carnegie, J., Claman, P., Lawrence, C. and Cabaca, O. 1995. Can Matrigel substitute for Vero cells in promoting the *in vitro* developemnt of mouse embryos? *Hum. Reprod.* 10:636-641.
4. Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E. and Farin, C. E. 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.* 62:1459-1465.
5. Desai, N., Scarrow, M., Lawson, W., Kinzer, D. and Goldfarb, J. 1999. Evaluation of the effect of interleukin-6 and human extracellular matrix on embryonic development. *Hum. Reprod.* 14:1588-1592.
6. Dorland, M., Gardner, D. K. and Trounson, A. 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 13:70 (abstract).
7. Dungleison, G., Barlow, D. and Sargent, I. L. 1996. Leukemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum. Reprod.* 11: 191-196.
8. Emonard, H., Christiane, Y., Smet, M., Grimaud, J. A. and Foidart, J. M. 1990. Type IV and interstitial collagenolytic activities in normal and malignant trophoblast cells are specifically regulated by the extracellular matrix. *Invasion Matastasis* 10:170-177.
9. Farin, P. W., Crosier, A. E. and Farin, C. E. 2001. Influence of *in vitro* system on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55:151-170.
10. Figueiredo, F., Jones, G. M., Thouas, G. A. and Trounson, A. O. 2002. The effect of extracellular matrix molecules on mouse preimplantation embryo development *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 14:443-451.
11. Gardner, D. and Lane, M. 1996. Alleviation of the “2-cell block” and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum. Reprod.* 11:2703-2712.
12. Gardner, D., Lane, M., Spizer, A. and Batt, P. A. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50:390-400.
13. Hardy, K. 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol. Hum. Reprod.* 3:919-925.
14. Harvey, M., Leco, K. J., Arcellana-Panlilio, M. Y., Zhang, X., Edwards, D. R. and Schultz, G. A. 1995. Roles of growth factors during peri-implantation development. *Mol. Hum. Reprod.* 10: 712-718.
15. Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Strokes, J. E. and Trimmer, S. A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-152.
16. Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K. and Martin, G. R. 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21:6188-6199.
17. Kaaekuahiwi, M. A. and Menino, Jr. A. R. 1990. Relationship between plasminogen activator production and bovine embryos development *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 68:2009-2014.
18. Kubota, Y., Kleinman, H., Martin, G. R. and Lawley, T. J. 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell. Biol.* 107:1589-1598.
19. Lazzaroni, L., Fusi, F. M., Doldi, N. and Ferrari, A. 1999. The use of Matrigel at low concentration enhances *in vitro* blastocyst formation and hatching in a mouse embryo model. *Fertil. Steril.* 71:1133-

- 1137.
20. Martin, G. and Kleinman, H. 1981. Extracellular matrix proteins give new life to cell culture. *Hepatology* 1:264-266.
  21. Matwee, C., Betts, D. H. and King, W. A. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 8: 57-68.
  22. McGuire, P. G. and Seeds, N. W. 1989. The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* 40:215-227.
  23. Nedambale, T. L., Dimnyes, A., Groen, W., Dobrinsky, J. R., Tian, X. C. and Yang, X. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62:437-449.
  24. Papaioannous, V. E. and Ebert, K. M. 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.
  25. Piekos, M., Frasor, J., Mack, S., Binor, Z., Soltes, B., Molo, M. W., Radwanska, E. and Rawlins, R. G. 1995. Evaluation of co-culture and alternative culture systems for promoting *in-vitro* development of mouse embryos. *Hum. Reprod.* 10:1486-1491.
  26. Schiewe, M. C., Hazeleger, N. L., Scilimenti, C. and Balmaceda, J. P. 1995. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. *Fertil. Steril.* 63:288-294.
  27. Stojkovic, M., Buttner, M., Zakhartchenko, V., Berm, G. and Wolf, E. A. 1998. Reliable procedure for differential staining of *in vitro* produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Menezes's B2 medium. *Anim. Reprod. Sci.* 50:1-9.
  28. Turpeenniemi-Hujanen, T., Feinberg, R. F., Kauppila, A. and Puistola, U. 1995. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil. Steril.* 64: 132-138.
  29. Zhang, X., Rutledge, J. and Armstrong, D. T. 1991. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. *Mol. Reprod. Dev.* 29:292-296.
  30. 김세웅, 이민정, 황인선, 배성훈, 양병철, 임기순, 성환후, 양보석, 정희태, 김동훈. 2006. 물리적 탈핵 방법이 소 복제수정란의 발달 능력에 미치는 영향. *한국동물번식학회지* 30:207-212.
  31. 정병목, 추형식, 강병문, 계명찬. 2000. 용해된 Matrigel 첨가 배지에서 착상전 생쥐 배아의 발생. *대한불임학회지* 27:381-385.
- (접수일자 : 2006. 9. 25. / 채택일자 : 2006. 12. 8.)