

난관상피세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 초기발생에 미치는 영향

박병권 · 한만희 · 서길웅 · 이규송
충남대학교 농과대학

Effect of Co-culture with Porcine Oviductal Epithelial Cell Monolayers on the Development of *In Vitro* Produced Porcine Zygotes

Park, B. K., M. H. Han, K. W. Seo and K. S. Lee
College of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effects of co-culture for the development rate to morula /blastocyst stages of early porcine embryos, derived from oocytes matured and fertilized *in vitro*, with porcine oviductal epithelial cell monolayers(POEC) in the two different media, respectively.

The rates of embryos developed to 2-, 4-, 8~16-cell and morula /blastocyst stage were 57.2, 48.2, 37.2 and 19.3% in Ham's F-10 with POEC, and 51.4, 41.2, 31.1, and 15.5% in TCM-HEPES with POEC, respectively. The above development rates to morula /blastocyst stages were significantly higher than those of the embryos cultured in the Ham's F-10 and TCM-HEPES without POEC($P < 0.05$). The *in vitro* development rates to the morula /blastocyst stage of 1-cell embryos cultured in Ham's F-10 and TCM-HEPES without POEC were 1.1~1.2%. Especially, most of embryos were observed to arrest the development beyond 4-cell stages.

As shown in the above results, the co-culture of *in vitro* produced porcine embryos with POEC in the two different media enhanced the development of fertilized eggs to morula /blastocyst stages *in vitro*. However, we didn't find out any differences for the *in vitro* development to morula /blastocyst stages between Ham's F-10 and TCM-HEPES media.

I. 서론

가축의 체외성숙난포란을 체외수정시킨 후 체외에서 초기배의 발달을 유도할 경우, 축종에 따라 특정 배발달 단계에서 발생이 정지되는 '체외발생능정지(*in vitro* cell block)' 현상이 나타나고 있는데, 이와 같은 현상은 정상적인 수정과정, 즉 체내 수정과정에서는 거

의 찾아볼 수 없다. 체외배양에 의한 발생능정지현상은 여러 연구자들에 의하여 연구되고 있는데, 소에서는 8~16세포기(Frei 등, 1991), 돼지에서는 4세포기(Jarrel 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992)의 난할단계에서 일어난다고 보고하고 있다. 발생능정지현상의 원인에 대하여는 아직 명확히 밝혀지지 않았는데, Seshagiri와 Bavister(1991)는 체외배양시 배양액내에 에너지급원으로 첨가하는 glucose와 phosphate가

결합하여 'Crabtree effect'를 초래하기 때문이라고 보고하였으며, Frei 등(1991), Jarrell 등(1991) 및 Schoenbeck 등(1992)은 4-세포기까지는 모체유래 게놈(maternal genome)에 의하여 mRNA가 만들어지고 단백질을 합성하여 수정란의 대사를 지배하다가, 4-세포기 이후에는 수정후 합성된 배자유래게놈(embryonic genome)에 의하여 새로운 mRNA를 합성하여 수정란의 대사를 조절하는 과정에서 문제가 발생하기 때문이라고 보고하였다. 이러한 발생능정지현상을 극복할 수 있는 방법으로는 에너지급원의 배양액내 조성변화(Davis와 Day, 1978; Chatot 등, 1989; Ellington 등, 1990; Saito, 1994), 각종 성장촉진인자(Kane 등, 1992; Heyner 등, 1993; Thibodeaux 등, 1993)나 아미노산 및 비타민의 첨가(Meyen 등, 1989), 각종 체세포와의 공배양(Goto 등, 1992; Eyestone과 First, 1989; White 등, 1989; Allen과 Wright, 1984), 또는 이들 세포의 분비산물을 배양액에 첨가한 Conditioned Medium의 이용(Eyestone 등, 1991; Ding과 Foxcroft, 1994), 난관액 등과 같은 체액의 첨가(Eberhardt 등, 1994)나 동종 또는 이종 개체의 생식기내 배양(Yoshida 등, 1990; Prather 등, 1991) 및 적출기관내 배양(Krisher 등, 1989) 등이 알려져 있다. 특히, 가축 체외수정란의 발생능정지현상을 극복하기 위한 방법으로 체세포와의 공배양방법이 많은 연구자들에 의하여 이용되고 있는데, 이 때 공배양하는 체세포는 주로 자성생식도관 유래의 체세포 즉, 단층난구세포(Shamsuddin 등, 1993), 단층 또는 부유난관상피세포(Gandolfi와 Moor, 1987; Eyestone과 First, 1989; White 등, 1989; Ellington 등, 1990; Xu 등, 1992; Kano 등, 1994) 및 자궁내막 유래의 단층 또는 부유세포(Allen과 Wright, 1984; Goto 등, 1992)로서, 이를 이용하여 높은 배반포기 도달율을 획득한 것으로 보고하고 있다. 그러나, 돼지 난포란의 체외성숙에 관한 연구결과는 많지 않고, 연구자들 간에도 서로 다른 논지를 제시하고 있어서 돼지 미성숙난포란의 체외배양체계가 확립되어 있다고 할 수 없다.

이에 본 실험은 복합배양액인 Ham's F-10과 TCM-HEPES에 난관상피세포로 작성한 단층세포와 수정란을 공배양시키는 방법이 돼지 체외수정란의 초기배 발달에 미치는 영향을 규명하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 난포란의 준비

실험에 공시한 난포란은 품종의 구분없이 도축 직후의 암돼지(체중 100kg 내외)로부터 적출한 난소에서 채취하였다. 도살직후 적출한 난소를 100IU/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate (Sigma, USA)를 첨가한 30~36 $^{\circ}$ C의 멸균 생리식염수로 1~2회 세척한 다음, 동일 생리식염수에 침지하여 30분 이내에 실험실로 운반하였다. 실온(25~30 $^{\circ}$ C)에서 난소의 표면을 생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 39 $^{\circ}$ C의 온수조에 넣어 실험에 공시하였다.

난포란의 채취는 18-gauge의 주사침이 장착된 20ml 주사기로 2~5mm 직경의 포상난포로부터 연속적으로 난포액과 함께 흡입하여 채취하였다. 이것을 15ml 원심분리관(conical tube, Corning, USA)으로 옮겨 온수조(39 $^{\circ}$ C)에서 5~10분간 정치시켜 난포란의 침전을 유도한 다음, 침전물만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 87 \times 15mm 페트리접시(petri dish)에 넣고 4mg/ml(w/v) BSA(bovine serum albumin, Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 PBS(phosphate buffered solution)로 희석하여 실제현미경(20~40 \times)하에서 난세포질이 균일한 난포란을 난구세포의 부착상태에 따라 선별하여 체외성숙에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 Ham's F-10(Gibco, USA)을 체외성숙 기본배양액으로 하여 10%(v/v) FBS(56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화처리, Gibco, U.S.A), 10%(v/v) 돼지난포액(porcine follicular fluid, pFF), 호르몬(1 μ g/ml FSH, 2IU/ml hCG, 1 μ g/ml estradiol-17 β) 및 100IU/ml penicillin G(Sigma, U.S.A)와 100 μ g/ml streptomycin sulfate(Sigma, USA)를 첨가하여 4-well plastic dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하고 mineral oil (Sguibb, USA)로 피복한 후 2~3시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO₂배양기내에서 평형시킨 후 well당 30~35개의 미성숙 난포란을 적

하하여 36~42시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외성숙 배양액은 pH 7.4, 삼투압을 290~300 mOsmol로 조정하여 사용하였으며, 체외성숙배양액에 첨가하였던 난포액(pFF)은 직경 3~6mm의 포상난포에서 난포액을 흡인한 다음 15ml 원심분리관에 주입, 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 0.80 μ m millipore filter로 1차 여과하였다. 그리고 재차 0.22 μ m millipore filter로 여과·멸균한 후 분주하여 -20℃에 보존하면서 사용하였다.

3. 정자의 준비

성숙 수태지의 정소상체를 적출한 후, 정소상체 미부의 장막을 질개하여 18-gauge 주사침이 장착된 주사기로 정자부유액을 흡인하여 체외수정의 기본배양액인 BO(Brackett과 Oliphant, 1975)에 4mg/ml의 BSA를 첨가한 5ml의 배양액에 침지하였다. 정소망액 및 정소상체액을 제거하기 위하여 1,500rpm에서 1차 원심분리를 한 후 pellet만을 취하여 BO배양액에 재부유시킨 다음, CO₂배양기내에서 30분 동안 swim-up 시켜 운동성이 양호한 상층액만을 취하여 15mg/ml BSA와 2mM caffeine (caffeine benzonate, Sigma, USA)이 함유되어 있는 체외수정용 배양액으로 1,500rpm에서 5분간 원심분리한 후, 운동성이 있는 정자수가 1~5×10⁵개/ml가 되도록 하여 4-well plastic dish에 0.5ml씩 분주하고 mineral oil로 피복한 다음, CO₂배양기내에서 2시간 동안 전배양하여 수정능획득을 유지하였다.

4. 난포란의 체외수정

36~42시간 동안 체외성숙이 유도된 난자-난구세포 복합체(oocyte-cumulus complexes)를 형태적으로 난구세포가 팽화된 것만을 선별하여, 2시간 전에 수정능획득을 위한 전배양에 들어갔던 4-well plastic dish에 well당 20~30개의 난자-난구세포 복합체를 적하하여 20시간 동안 39℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도의 CO₂배양기에서 수정을 유도하였다.

5. 단층 난관 상피세포의 준비

Xu 등(1992)의 방법에 따라, 도축되는 암태지의 난소를 확인하여 난소에 출혈체나 황체가 없고, 포강이 형성된 성숙난포가 있는 배란직전의 자성생식기관을

35~37℃의 멸균생리식염수가 담겨있는 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 난관의 난관체와 자궁-난관접속부 부위를 절단한 후 forceps으로 양쪽 끝을 막고 난관 표면을 scraping한 다음, 18-gauge 주사침이 장착된 10ml주사기에 10% (v/v) FBS가 첨가된 TCM-HEPES, Ham's F-10 배양액을 각각 5ml씩 넣어 15ml원심분리관에 관류하고, 5분간 1,000 rpm의 속도로 원심분리하였다. 원심분리한 후 상층액을 버리고 pellet만을 취하여 발생배양액으로 재부유하여 4-well plastic dish에 0.5ml씩 적하하고 48시간 동안 배양하면서 난관상피세포의 부착·증식을 유도하였다. 난관상피세포는 체외에서 배양할 경우, 바닥에 부착하여 단층세포를 형성하는 세포군과 운동성모가 있고 포강을 형성하며 증식하는 부유세포군의 2종류 세포가 확인되었다. 본 실험에서는 초대배양(primary culture)세포만을 이용하여, 바닥에 부착하여 단층세포를 형성하는 세포군만을 실험에 공시하였다. 또한, 배양액은 48시간 주기로 신선배양액을 50%씩 교환해 주었으며, 최초 배양일로부터 6주 동안 유지가 가능하였다.

6. 수정란의 체외배양 및 공배양

수정란의 체외배양에 사용된 배양액은 Ham's F-10(Gibco, USA)과 TCM-HEPES(Sigma, USA)에 각각 10%의 FBS(56℃, 30분간 비동화처리)를 첨가하여 12시간 동안 CO₂배양기내에서 전배양하여 평형을 유지시킨 후 사용하였다. 정자주입 20시간 후에 수정배양액으로 부터 수정된 난자를 회수하여 난구세포 및 정자를 완만한 pipetting으로 완전히 제거한 후 단층세포가 작성된 각 4-well plastic dish에 well당 20~25개씩의 1-세포기 수정란을 적하하여 배발생을 유도하였다.

7. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계 처리는 χ^2 검정을 실시하여 P<0.05 이하의 유의성만을 대조구와 처리구간의 통계학적 차이로 인정하였다.

III. 결과 및 고찰

체외에서 성숙 및 수정된 돼지 초기 수정란을 Ham-

Table 1. Effect of co-culture with oviductal epithelial cell monolayers on *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes in Ham's F-10

Culture system	Exp. no.	No. of embryos examined ¹	No. of embryos developed to(%)			
			2-cell	4-cell	8 to 16-cell	Mor. or Bla.
Co-culture	I	43	23(53.5)	19(44.2)	16(37.2)	7(16.3)
	II	50	32(64.0)	28(56.0)	19(38.0)	12(24.0)
	III	52	28(53.8)	23(44.2)	19(36.5)	9(17.3)
	Total	145	83(57.2) ^a	70(48.2) ^a	54(37.2) ^a	28 ² (19.3) ^a
Cell-free		83 ³	45(54.2) ^a	36(43.3) ^a	8(9.6) ^b	1(1.2) ^b

¹ With one-cell presumptive embryos

² Involved 4 expanded blastocysts

³ Data from 3 replicates

^{a,b} Means in the same column with different superscript letters significantly($p < 0.05$).

's F-10과 TCM-HEPES 배양액에서 단충난관상피세포와 함께 공배양하여 배발달을 유기한 결과는 Table 1, 2 및 3과 같다.

발생배양액을 Ham's F-10으로 하여 공배양했을 경우, 체외수정된 난자가 2-, 4-, 8~16-세포기, 상실배/배반포기로 발달한 비율은 각각 57.2, 48.2, 37.2 및 19.3%이었는데, 공배양하지 않은 대조구는 각각 54.2, 43.3, 9.6 및 1.2%로 나타났다. 또한, TCM-HEPES를 발생배양액으로 하여 공배양하였을 경우는 2-, 4-, 8~16-세포기, 상실배/배반포기로 발달율이 각각 51.4, 41.2, 31.1 및 15.5%이었으며, 단순배양한 대조구는 46.1, 33.7, 7.9 및 1.1%로 각각 조사되었다. 두 배양액 공히, 4-세포기까지의 발달율은 공배양 처

리가 36.0~56.0%, 단순배양 대조구가 33.7~43.3%로서 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 상실배/배반포기 도달율은 공배양 처리구가 10.0~24.0%인 반면에, 단순배양 대조구는 1.1~1.2%의 극히 저조한 발달율을 나타내어서 대부분의 수정란이 4-세포기 단계에서 발달이 정지되는 것으로 조사되었다. 한편, HF-POEC와 TCM-POEC의 두 배양액간에는 유의차가 인정되지는 않았지만, HF-POEC 처리구에서 상실배/배반포기로의 발달율이 높은 경향을 나타냈다.

이와 같은 결과는 양에서 난관상피세포와 공배양했을 때 배반포기로의 발달율이 45.0% (Gandolfi와 Moor, 1987), 소에서 난관상피세포와의 공배양 실험에서 Ham's F-10을 기본배양액으로 하여 단순배양했

Table 2. Effect of co-culture with porcine oviductal epithelial cell monolayers on *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes in TCM-HEPES

Culture system	Exp. no.	No. of embryos examined ¹	No. of embryos developed to(%)			
			2-cell	4-cell	8 to 16-cell	Mor. or Bla.
Co-culture	I	52	27(51.9)	21(40.4)	18(34.6)	11(21.6)
	II	50	23(46.0)	18(36.0)	13(26.0)	5(10.0)
	III	46	26(56.5)	22(47.8)	15(32.6)	7(15.2)
	Total	148	76(51.4) ^a	61(41.2) ^a	46(31.1) ^a	23 ² (15.5) ^a
Cell-free		89 ²	41(46.1) ^a	30(33.7) ^a	7(7.9) ^b	1(1.1) ^b

¹ With one-cell presumptive embryos

² Involved 2 expanded blastocysts

³ Data from 3 replicates

^{a,b} Means in the same column with different superscript letters significantly($p < 0.05$).

Table 3. Effect of co-culture with porcine oviductal epithelial cell monolayers on *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes in different media

Culture system	Repliates	No. of embryos examined	No. of embryos developed to(%)			
			2-cell	4-cell	8 to 16-cell	Mor. or Bla.
HF-POEC ¹	3	145	83(57.2)	70(48.2)	54(37.2)	28(19.3)
TCM-POEC ²	3	148	76(51.4)	61(41.2)	46(31.1)	23(15.5)

¹ HF-POEC: Ham's F-10 with porcine oviductal epithelial cell monolayers

² TCM-POEC: TCM-HEPES with porcine oviductal epithelial cell monolayers

을 경우 상실배/배반포기로의 발달율이 4.0%, 공배양처리구에서 46.0%의 결과와 TCM-199을 발생배양액으로 단순배양 및 공배양했을 때 각각 3.0%와 43.0%(Eyestone과 First, 1989)라는 보고와 대체적으로 일치하였다. 그러나, White 등(1989)이 보고한 돼지에서 2-세포기 이후의 초기수정란을 난관상피세포의 배양 2시간 만에 공배양했을 경우 배반포기까지의 발달율이 70.0%, Ellington 등(1990)이 CZB-coculture 조건에서 5일간 배양했을 경우 상실배기 및 배반포기로 발달율이 84.0% 및 Shamsuddin 등(1993)이 소에서 난관상피세포와 공배양했을 경우 난할율이 65.0%, 상실배/배반포기 도달율이 29.0%라고 보고한 것에 비하여는 다소 낮은 결과였다.

IV. 적 요

본 연구는 체외에서 성숙 및 수정된 돼지 체외수정란을 두 종류의 서로 다른 배양액에 자생생식도관에서 유래하는 체세포인 난관상피세포와 공배양하였을 경우 배발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 단층배양이 유도된 단층난관상피세포와 초기체외수정란을 Ham's F-10에서 공배양한 결과 2-, 4-, 8~16-세포기, 상실배/배반포기로 발달하는 비율은 각각 57.2, 48.2, 37.2 및 19.3%였으며, TCM-HEPES에서는 각각 51.4, 41.2, 31.1 및 15.5%였다.
2. 난관상피세포와 공배양을 하지 않고 단순하게 배양액으로만 배양하였을 때 상실배/배반포기까지의 발달율은 1.1~1.2%로서 극히 저조하였다. 특히, 대부분의 수정란이 4-세포기 단계에서 발달이 정지되었다.

3. 돼지 체외수정란을 단층난관상피세포와 공배양하였을 때, 단순배양한 결과보다 유의적으로 높은 상실배/배반포기의 발달율을 나타냈으며 ($P < 0.05$), 두 배양액간 발달율의 유의차는 인정되지 않았다.

V. 인용문헌

1. Allen, R. L. and R. W. Wright, Jr. 1984. *In vitro* development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. J. Anim. Sci., 59:1657-1661.
2. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
3. Chatot, C. L., C. A. Zimek, B. D. Bavister, G. L. Lewis and L. Torres. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 86:679-688.
4. Chian, Ri-cheng and M. A. Sirard. 1995. Fertilizing ability of bovine spermatozoa co-cultured with oviduct epithelial cells. Biol. Reprod., 52:156-162.
5. Davis, D. L. and B. N. Day. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. J. Anim. Sci., 46:1043-1053.
6. Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1994. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. Biol. Reprod., 50:1377-1384.

7. Eberhardt, D. M., D. M. Henricks, J. F. Dickey and J. R. Diehl. 1994. Oviductal fluid and growth factors failed to enhance development of porcine embryos. *Theriogenology*, 41:1163-1172.
8. 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.
9. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85: 715-720.
10. 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.
11. Frei, R. E., G. A. Schultz and R. B. Church. 1991. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8~16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 86:637-641.
12. Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 81:23-28.
13. Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma and Y. Nakanish. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
14. Goto, K., N. Iwai, Y. Takuma and Y. Nakanish. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro* : comparison of cell-free culture with co-culture. *J. Reprod. Fert.*, 100:239- 243.
15. Hernandez-Ledezma, J. J., C. Villanneva, J. D. Sikes and R. M. Roberts. 1992. Effect of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by *in vitro* maturation *in vitro* fertilization procedures. *Theriogenology*, 39:1267-1277.
16. Heyner. S., N. Shah., R. M. Smith., A. J. Watson and G. A. Schultz. 1993. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology*, 39: 151-161.
17. Jarrell, V. I., B. N. Day and R. S. Prather, 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: Quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol. Reprod.*, 44:62-68.
18. Kane, M. T., E. W. Carney and J. E. Ellington. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology*, 38: 297-313.
19. Kano, K., T. Miyano and S. Kato. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:1061-1068.
20. Krisher, R. L., R. M. Petters and B. H. Johnson. 1989. Effect of oviductal condition on the development of one-cell porcine embryos in mouse or rat oviducts maintained in organ culture. *Theriogenology*, 32:885-892.
21. Leifried-Rutledge, M. L., M. F. Harvey and N. L. First. 1989. The molecular biology of mammalian oocyte maturation. In the molecular biology of fertilization. Schatter, H. and G. Schatten Academic Press. INC., pp. 259-301.
22. Meyen, B. A., C. F. Rosenkrans, Jr. and D. L. Davis. 1989. Development of pig blastocyst *in vitro* is altered by serum, bovine ser-

- um albumin and amino acids and vitamins. *Therio.*, 31:463-470.
23. Pavasuthipaisit, K., S. Lhuangmahamongkol, C. Tocharus, Y. Kitiyanant and P. Prempre. 1994. Porcine ovidutal cells support *in vitro* bovine embryo development. *Theriogenology*, 41:1127-1138.
 24. Pincus, G. and E. U. Enzmann. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro*. *Theriogenology*, 35:253.
 25. Prather, R. S., M. M. Sims and N. L. First. 1991. Culture of porcine embryos from the one- and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. *Theriogenology*, 3-12.
 26. Saito, T., M. Hiroi and T. Kato. 1994. Development of glucose studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol. Reprod.*, 50:266-270.
 27. Schoenbeck, R. A., M. S. Peters, L. F. Rickords, T. T. Stumpf and R. S. Prather. 1992. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryo. *Biol. Reprod.*, 47:1118-1125.
 28. Seshagiri, P. B. and B. D. Bavister. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "crabtree effect". *Mole. Reprod. Dev.*, 30:105-111.
 29. Shamsuddin, M., B. Larsson, H. Gustafsson and H. Rodriguez-Martinez. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology*, 39:1067-1079.
 30. Thibodeaux, J. K., R. P. Del Vecchio and W. Hansel. 1993. Role of platelet-derived growth factor *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 998:61-66.
 31. White, K. L., K. Hehnke, L. F. Rickords, L. L. Southern, D. L. Thompson, Jr, and T. C. Wood. 1989. Early embryo development *in vitro* by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. Reprod.*, 41:425-430.
 32. Xu, K., B. R. Yadav, R. W. Rorie, L. Planete, 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 oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 94:33-43.
 33. Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. *Jpn. J. Ver. Sci.*, 49(4):711-718.
 34. Yoshida, M., Y. Ishizaki and H. Kawagishi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 88:1-8.