

자궁내막세포와의 공배양이 돼지 체외수정란의 초기발달에 미치는 영향

한만희 · 박병권 · 박창식 · 이규승
충남대학교 축산학과

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

M. H. Han, B. K. Park, C. S. Park and K. S. Lee

Department of Animal Science, 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 endometrial cell monolayers(PEM) in the two different media, respectively.

The rates of embryos developed to 2-, 4-, 8~16-cell and morula /blastocyst stage were 49.6, 40.5, 28.2 and 15.3% in Ham's F-10 with PEM, and 55.3, 45.9, 32.7, and 17.6% in TCM-HEPES with PEM, 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 PEM ($P < 0.05$). The *in vitro* development rates to the morula /blastocyst stage of 1-cell embryos cultured in Ham's F-10 and TCM-HEPES without PEM were 0~1.2%. 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 PEM 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.

(Key word: *in vitro* development, co-culture, porcine endometrial cell monolayer, porcine embryo)

서 론

대부분의 포유동물 수정란은 체외배양의 일정시기에 발육이 지연 또는 정지되는 현상이 초래되는데(Wright와 Bondiali, 1981), 이러한 현상을 체외 발생능정지현상(*in vitro* cell block)이라고 한다. 특히, 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시켜 체

외배양할 경우 이러한 현상은 빈번하게 나타나는데, 이는 미성숙 난포란의 이용성을 크게 감소시키는 요인으로 작용하고 있다. 축종별로 그 단계를 살펴보면, 소에서는 8~16-세포기에, 돼지는 4-세포기에 이러한 발생능정지현상이 나타나는데, 아직까지도 그 원인에 대하여 정확히 구명되어 있다고 할 수 없다(Bavister, 1988). 이와 같은 체외배양에 의한 발생능정지현상에 대한 연구보고를 살펴보면, Se-

shagiri와 Bavister(1991)는 햄스터의 수정란을 체외배양할 경우, 에너지급원으로 첨가하는 glucose와 phosphate가 결합하여 'crabtree effect'가 일어나 수정란의 발생능정지현상이 초래된다고 하였으며, Frei 등(1991), Jarrell 등(1991) 및 Schoenbeck 등(1992)은 발생능정지현상의 이유를 4-세포기까지는 모체유래게놈(maternal genome)에 의하여 mRNA가 만들어지고 단백질을 합성하여 수정란의 대사를 지배하다가, 4-세포기 이후에는 수정후 합성된 배자유래게놈(embryonic genome)에 의하여 새로운 mRNA를 합성하여 4-세포기 이후의 수정란의 대사를 조절하는 과정에서 문제가 발생하기 때문이라고 보고하였다. 이와 같은 연구자들의 보고를 종합하여 볼 때, 수정란의 대사가 모체유래게놈(maternal genome)에 의하여 지배되다가 자성진핵과 융성전핵이 합쳐져서 만든 배자유래게놈(embryonic genome)이 활성화(activation)되는 과정에서 체외의 부적절한 여러 요인에 의하여 초래되는 것으로 판단된다. 이러한 발육능정지현상을 극복할 수 있는 방법으로서 에너지급원의 배양액내 조성 변화(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, 단충난구세포(Shamsuddin 등, 1993), 단충 또는 부유난관상피세포(Gandolfi와 Moor, 1987 ; Eyestone과 First, 1989 ; White 등, 1989 ; Ellington 등, 1990 ; Xu 등, 1992 ; Kano 등, 1994) 및 자궁내막 유래의 단충 또

는 부유세포(Allen과 Wright, 1984 ; Goto 등, 1992)로서 이를 이용하여 높은 배반포기 도달률을 획득한 것으로 보고하고 있다.

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

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 난포란을 흡입하여 채취하였다. 이것은 15ml 원심분리관(conical tube, Corning, USA)으로 옮겨 온수조(39 $^{\circ}$ C)에서 5~10분간 정지시켜 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 실체현미경(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(Gibco, USA), 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/ml의 penicillin G(Sigma, USA)와 100 μ g/ml의 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 적하하여 36~42시간 동안 배양하여 성숙을 유도하였다. 체외성숙 배양액은 pH 7.4, 삼투압을 290~300mOsmol로 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 $^{\circ}$ C에 보존하면서 사용하였다.

3. 정자의 준비

성숙 수태지의 정소상체를 적출한 후, 정소상체 미부의 장막을 절개하여 18-gauge 주사침이 장착된 주사기로 정자부유액을 흡인하여 체외수정의 기본 배양액인 BO(Brackett과 Oliphant, 1975)에 4mg/ml의 BSA를 첨가한 5ml의 배양액에 침지하였다. 정소망액 및 정소상체액을 제거하기 위하여 1,500 rpm에서 1차원심분리를 한 후 pellet만을 취하여 BO배양액에 재부유시킨 다음, CO₂배양기내에서 30분 동안 swim-up시켜 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 \times 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 plas-

tic dish에 well당 20~30개의 난자-난구세포 복합체를 적하하여 20시간 동안 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도의 CO₂배양기에서 수정을 유도하였다.

5. 단층자궁내막세포의 준비

도축되는 암태지의 난소에 포상난포가 다수 보이는 배란 전기형태의 난소가 있는 자성생식기관을 선택, 자궁경 하단 부위를 절단하여 난관 및 난소가 붙어 있는 상태로 35~37 $^{\circ}$ C 멸균생리식염수가 충만된 보온병에 침지하여 60분 이내에 실험실로 운반하였다. 자궁각 중간부위와 난관 협부하단을 절단한 후 자궁각 선단에서 Allen과 Wright(1984)의 방법으로 자궁내막세포를 취하고 0.1% Trypsin-EDTA(Sigma, USA)용액에 침지하여 scissors로 쉐절한 다음, pipetting을 하여 세포를 분리해냈다. 분리해낸 세포는 신선배양액으로 2회 원심분리한 후, 세포수가 1~5 \times 10⁶cell/ml가 되도록 조정하여 4-well plastic dish에 0.5ml씩 분주, 단층배양을 유도하였다. 배양 48시간에 신선배양액으로 교환하면서 바닥에 부착되지 않은 세포를 제거하였으며, 5일간 배양하면서 단층자궁내막세포를 작성하여 실험에 공시하였다. 자궁내막세포를 체외에서 배양할 경우, 바닥에 부착하여 단층을 유도하는 세포군과 부유해서 포강을 형성하며 운동섬모가 있어 운동성을 갖는 부유세포군의 두가지 세포군이 있었으나, 본 실험에서는 단층세포와 1차배양(primary culture) 세포만을 이용하였다.

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 $^{\circ}$ C, 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 well 당 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.

결과 및 고찰

체외에서 성숙 및 수정된 돼지 초기 수정란을 Ham's F-10과 TCM-HEPES 배양액에서 단층자궁 내막세포와 함께 공배양하여 배발달을 유기한 결과는 Table 1, 2 및 3과 같다.

발생배양액을 Ham's F-10으로 하여 공배양 했을 경우, 체외수정된 난자가 2-, 4-, 8~16-세포기, 상실배/배반포기로 발달한 비율은 각각 49.6, 40.5, 28.2 및 15.3%이었는데, 공배양하지 않은 대조구는 각각 47.7, 35.0, 8.3 및 0.9%로 나타났다. 또한, TCM-HEPES를 발생배양액으로 하여 공배양하였을 경우는 2-, 4-, 8~16-세포기, 상실배/배반포배로 발달률이 각각 55.3, 45.9, 32.7 및 17.6%이었으며, 단순배양한 대조구는 53.4, 40.8, 6.8 및 0.0%로 각각 조사되었다. 두 배양액 공히, 4-세포기까지의 발달률은 공배양 처리구가 35.8~50.0%, 단순배양 대조구가 35.0~40.8%로서 차이를 나타내지 않았

Table 1. Effect of co-culture with porcine endometrial 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	58	32(55.2)	26(44.8)	17(29.3)	11(18.9)
	II	52	26(50.0)	21(40.4)	16(30.8)	8(15.4)
	III	53	23(43.4)	19(35.8)	13(24.5)	6(11.3)
	Total	163	81(49.6) ^a	66(40.5) ^a	46(28.2) ^a	252(15.3) ^a
Cell-free		109 ³	52(47.7) ^a	38(35.0) ^a	9(8.3) ^b	1(0.9) ^b

¹ With one-cell presumptive embryos

² Involved 2 expanded blastocysts

³ Data from 3 replicates

^{ab} Means in the same column with different superscript letters significantly ($p < 0.05$)

Table 2. Effect of co-culture with porcine endometrial 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	46	27(58.7)	23(50.0)	17(36.9)	10(21.7)
	II	60	32(53.3)	28(46.7)	21(35.0)	13(24.5)
	III	53	29(54.7)	22(41.5)	15(28.3)	8(15.1)
	Total	159	88(55.3) ^a	73(45.9) ^a	52(32.7) ^a	282(17.6) ^a
Cell-free		103 ³	55(53.4) ^a	42(40.8) ^a	7(6.8) ^b	0(0.0) ^b

¹ With one-cell presumptive embryos

² Involved 3 expanded blastocysts

³ Data from 3 replicates

^{ab} Means in the same column with different superscript letters significantly ($p < 0.05$)

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

Culture system	Replicates	No. of embryos examined	No. of embryos developed to(%)			
			2-cell	4-cell	8 to 16-cell	Mor. or Bla.
HF-PEM ¹	3	163	81(49.6)	66(40.5)	46(28.2)	25(15.3)
TCM-PEM ²	3	159	88(55.3)	73(45.9)	52(32.7)	28(17.6)

¹ HF-PEM: Ham's F-10 with porcine endometrial cell monolayers

² TCM-PEM: TCM-HEPES with porcine endometrial cell monolayers

다. 그러나, 상실배/배반포기 도달률은 공배양 처리구가 11.3~21.7%인 반면에, 단순배양 대조구는 0.0~0.9%의 극히 저조한 발달률을 나타내어서 대부분의 수정란이 4-세포기 단계에서 발달이 정지되는 것으로 조사되었다. 한편, HF-PEM과 TCM-PEM의 두 배양액간에는 유의차가 인정되지는 않았지만, TCM-PEM 처리구에서 상실배/배반포기로의 발달률이 높은 경향을 나타냈다.

이와 같은 결과는 소에서 수정란을 자궁내막세포와 공배양했을 때 배반포기 도달률이 32.5%라고 보고한 Goto(1992)의 결과보다는 낮지만, 김 등(1993)이 보고한 배반포 도달률 11.8% 보다는 다소 높은 결과였다. 또한, Allen과 Wright(1984)가 단층자궁내막세포와의 공배양이 단순하게 배양액만으로 배양한 처리구보다 배발달지수가 각각 1.59±2.2와 0.63±1.3로서 유의(P<0.05)한 증가를 보였다는 보고와 일치하는 결과라 사료된다.

적 요

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

1. 단층배양이 유도된 단층자궁내막세포와 함께 초기체외수정란을 Ham's F-10에서 배양한 결과 2-, 4-, 8~16-세포기, 상실배/배반포기로 발달하는 비율은 각각 49.6, 40.5, 28.2 및 15.3%였으며, TCM-HEPES에서는 각각 55.3, 45.9, 32.7 및 17.6%이었다.

2. 자궁내막세포와 공배양을 하지 않고 단순하게 배양액으로만 배양하였을 때 상실배/배반포기까지의 발달률은 0~0.9%로서 극히 저조하였다. 특히, 대부분의 수정란이 4-세포기 단계에서 발달이 정지되었다.
3. 돼지 체외수정란을 단층자궁내막세포와 공배양하였을 때, 단순배양한 결과보다 유의적으로 높은 상실배/배반포기의 발달률을 나타냈으며(P<0.05), 두 배양액간에는 유의차가 인정되지 않았다.

참고문헌

- Allen RL and Wright RW, Jr. 1984. *In vitro* development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. J. Anim. Sci., 59:1657-1661.
- Bavister BD. 1988. Role of oviductal secretion in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology, 29:143-154.
- Chatot CL, Zimek CA, Bavister BD, Lewis GL and Torres L. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 86:679-688.
- Davis DL and Day BN. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. J. Anim. Sci., 46:1043-1053.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. Biol. Reprod., 50:1377-1384

- Eberhardt DM, Henricks DM, Dickey JF and Diehl JR. 1994. Oviductal fluid and growth factors failed to enhance development of porcine embryos. *Theriogenology*, 41:1163-1172.
- Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE and McGrath AB. 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.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
- Eyestone WH, Jones JM and First NL. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, 92:59-64.
- Frei RE, Schultz GA and Church RB. 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.
- 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.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanish Y. 1992. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J. Anim. Sci.*, 70:1449-1453.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y and Nakanish Y. 1992. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro* :comparison of cell-free culture with co-culture. *J. Reprod. Fert.*, 100:239-243.
- Heyner S, Shah N, Smith RM, Watson AJ and Schultz GA. 1993. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology*, 39:151-161.
- Jarrell VI, Day BN and Prather RS. 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.
- 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.
- Kano K, Miyano T and Kato. S. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:1061-1068.
- Krisher Rebecca L, Robert Petters M, Bryan Johnson H, Barry Bavister D and Anthony Archibong E. 1989. Development of porcine embryos from the one-cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ culture. *J. Exp. Zool.*, 249:235-239.
- Meyen BA, Rosenkrans CF Jr and Davis DL. 1989. Development of pig blastocysts *in vitro* is altered by serum, bovine serum albumin and amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 31:463-471.
- Prather RS, Sims MM and First NL. 1991. Culture of porcine embryos from the one- and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. *Theriogenology*, 3-12.
- Saito T, Hiroi M and Kato. T. 1994. Development of glucose studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol. Reprod.*, 50:266-270.
- Schoenbeck RA, Peters MS, Rickords LF, Stumpf TT and Prather RS. 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.
- Seshagiri PB and Bavister BD. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos:evidence for the 'crabtree effect'. Mole. Reprod. & Develop., 30:105-111
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 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.
- Thibodeaux JK, Del Vecchio RP and Hansel W. 1993. Role of platelet-derived growth factor *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. J. Reprod. Fert. 998:61-66.
- Walker SK, Heard TM and Seamark RF. *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture : success and perspectives. Therio., 37:111-126.
- White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL JR and Wood TC. 1989. Early embryo development *in vitro* by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod., 41:425-430.
- Wright RW Jr and Bondioli KR. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci., 53:702-729.
- Xu K, 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 oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fert., 94:33-43
- Yosida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. fert., 88:1-8.
- 김상근, 김명현, 김무강, 이규승. 1993. 난구, 난관 상피세포 및 자궁내막세포와의 공동배양이 돼지 난포란의 체외수정 및 분할율에 미치는 영향에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 17(1):133~139