

합성난관배양액에 첨가된 Insulin, Transferrin 및 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)가 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향

이 은 송
강원대학교 수의학과

Effect of Insulin, Transferrin and Platelet-Derived Growth Factor Supplemented to Synthetic Oviduct Fluid Medium on *In Vitro* Development of Bovine Embryos Matured and Fertilized *In Vitro*

E. S. Lee

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

SUMMARY

In vitro development of bovine embryos is affected by many factors such as energy substrates, amino acids, and some growth factors. It has been reported that mRNA of insulin, PDGF and their receptors are detected in cow embryos, and that some chelating agents such as EDTA and transferrin have beneficial role on mouse and bovine embryos. The author hypothesized that insulin, transferrin and PDGF added to a culture medium increase *in vitro* development of bovine embryos by chelating toxic substance(s) or increasing cell growth and metabolism.

Immature oocytes from slaughtered ovaries of Holstein cows and heifers were matured for 24 hours in a TCM199 containing 10% fetal calf serum, FSH, LH and estradiol with granulosa cells *in vitro*. Matured oocytes were coincubated with sperm for 30 hours in a modified Tyrode's medium (IVF). Embryos cleaved to 2- to 4-cell at 30 hours after IVF were selected and cultured in a 30- μ l drop of a synthetic oviduct fluid medium (SOFM) containing 0.8% BSA, Minimum Essential Medium essential and non-essential amino acids, and insulin, transferrin or PDGF for 9 days.

Supplementation of a SOFM with insulin, and/or transferrin did not increase developmental rate to expanding and hatching blastocyst of 2- to 4-cell bovine embryos compared with control. The highest developmental rate to hatching blastocyst was shown when PDGF was added at the concentration of 10 ng/ml among the supplementing doses tested in the present study ($p < 0.05$). Addition of PDGF without insulin to a SOFM could not increase embryo development, but combined addition of PDGF with insulin significantly increased ($p < 0.05$) embryo development to hatching blastocyst (50%) compared with control (38%).

In conclusion, insulin and PDGF supplemented to a SOFM may act synergistically and

have beneficial effect on *in vitro* development of 2- to 4-cell bovine embryos matured and fertilized *in vitro*.

(Key words : *in vitro* development, bovine embryo, insulin, PDGF, transferrin)

서 론

소의 난소로부터 채취된 미성숙난자는 체외에서 약 80~90%가 성숙되며 50~80%가 정상적으로 수정되나(Parrish 등, 1986; Fukui와 Ono, 1989) 수정후 배반포단계까지 발육하는 수정란의 비율은 전체의 50%이하로 아직 낮은 실정이다. 따라서 소 수정란을 효율적으로 생산할 수 있는 체외배양체계를 확립하기 위하여 각종 세포성장인자(Rappolee 등, 1988; Paria와 Dey, 1990; Larson 등, 1992; Lee와 Fukui, 1995; Lee 등, 1996), 에너지원(Kim 등, 1993; Rosenkrans 등, 1993) 및 아미노산(Moore와 Bondioli, 1993; Gardner와 Lane, 1993; Lee와 Fukui, 1996) 등이 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향이 검토되어 왔다.

세포성장인자는 포유동물 수정란의 증식 및 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 포유동물 수정란 및 난관에서 각종 세포성장인자 및 그 수용체 유전자의 발현이 확인되었는데(Rappolee 등, 1988; Watson 등, 1992; Watson 등, 1993) 이는 이들 세포성장인자가 수정란의 초기발육에 중요한 역할을 담당할 가능성을 시사한다. Insulin은 마우스(Harvey와 Kaye, 1990), 래트(Zhang과 Armstrong, 1990) 및 소(Matsui 등, 1994) 초기수정란의 발육을 촉진하는 것으로 보고되었으며, Rosenblum 등(1986)과 Mattson 등(1988)은 마우스 수정란에서 insulin의 binding을 확인하였다. Insulin의 배발달촉진효과에 관하여 Handyside와 Hunter(1984)는 insulin이 마우스 수정란의 세포수를 증가시킨다고 하였고, insulin이 첨가된 배양액에서 발육한 마우스 수정란을 이식한 결과 대조수정란에 비해 착상후 태아의 체중이 5%증가했다는 보고도 있다(Kaye 등, 1992). 한편 Shamsuddin 등(1993a, b)은 BSA를 포함하는 TCM199에 insulin, transferrin 및 selenium첨가하여 소 수정란을 배양시 체세포와의 공배양에 필적하는 배반포로의 발육성적을 얻었다고 보고하였다. 한편 PDGF는 소 난관상피

(Eriksen 등, 1993) 및 난관액(Gandolfi 등, 1991)에서 검출되며, 소의 체내유래난자에서 배반포단계까지 PDGF수용체의 α -subunit-mRNA의 발현이 확인되었다(Watson 등, 1992). 포유동물 수정란의 체외발육에 관한 PDGF의 영향에 대해서 Eckert와 Niemann (1996), Yang 등(1993)은 체외배양액에 첨가된 PDGF가 소 수정란의 체외발육을 증가시킨다고 하였으나 Larson 등(1992)은 IGF-1, TGF β 및 bFGF와 함께 첨가된 PDGF는 오히려 16세포기 이상으로의 발육을 감소시킨다고 보고하였다. 현재까지 소 수정란의 발육에 대한 insulin, transferrin 및 PDGF의 효과는 보고자에 따라 다양한 결과를 보이고 있으며, 특히 insulin과 PDGF의 동시첨가 효과에 대한 결과는 많지 않다.

이에 본 실험에서는 보다 효율적인 소 수정란의 체외배양체계를 확립할 목적으로 혈청 및 체세포를 포함하지 않는 합성난관배양액에 insulin, transferrin 및 PDGF를 단독으로 또는 동시에 첨가하여 이들이 체외수정유래 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

도축장에서 Holstein 경산우 및 미경산우의 난소를 채취하여 35℃의 멸균 생리식염수가 들어 있는 보온병에 넣어 실험실로 운반하였다. 주사침(18 G)이 연결된 5 ml 주사기로 0.3%(w/v) BSA (fatty acid-free, fraction V, Sigma Chemical Co., USA), 10 mM HEPES (Sigma Chemical Co., USA) 및 2 mM sodium bicarbonate 첨가 TCM199(세정용 TCM199)을 소량 흡입한 후 직경 약 2~5 mm의 소난포로부터 미성숙난자를 채취하였다. 미성숙난자는 Kastrop 등(1990)의 기준에 준하여 4~5층 이상의 치밀한 난구세포가 부착되어 있고 균질한 세포질을 갖는 난자만을 선발하였다.

미성숙난자의 채취와 동시에 Moor와 Trounson (1977)의 방법에 준하여 과립막세포를 채취하였다.

과립막세포를 세정용 TCM 199내에 부유시켜 2회 원심, 세정하였으며(500×g, 5분) 원심후 50×10⁶ 개/ml의 세포부유액을 만들어 과립막세포의 최종 농도가 2×10⁶ 개/ml가 되도록 성숙용 배양액내에 첨가하였다.

체외성숙에는 4-well dish(Nuclon, Denmark)를 이용하였으며, 10%(v/v) fetal calf serum(FCS, Mitsubishi Kasei, Japan), 2.5 µg/ml FSH, 2.5 µg/ml LH 및 1 µg/ml estradiol을 첨가한 TCM 199(ICN biomedical Inc., UK)을 배양액으로 이용하였다. 미성숙난자를 세정용 TCM 199으로 3회 세정후 성숙용 TCM 199으로 1회 세정하여 과립막세포가 첨가된 4-well dish의 한 well에 30~40개를 넣어 39℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 95% 이상의 습도 조건을 갖춘 배양기(CO₂ 배양기)내에서 24시간 성숙배양하였다.

2. 체외수정

정자처리 및 체외수정은 Parrish 등(1986)의 방법에 준하여 실시하였으며, modified Tyrode's medium(Parrish 등, 1985; Fukui, 1990; mTALP)을 기본배양액으로 이용하였다.

난자의 성숙배양 22시간후에 Holstein종 동결정액을 37℃의 온수에 용해하여 정자의 운동성을 확인한 후 Pasteur pipette으로 1 ml의 수정능획득용 mTALP가 들어 있는 9~10개의 플라스틱 시험관(Becton Dickinson Labware, USA)에 0.2 ml의 정액을 분주하여 CO₂ 배양기내에서 1시간 swim-up 처리하였다. Swim-up 종료후 시험관 상부 0.8 ml를 흡인하여 15 ml의 원심관에 모은 후 2회 원심, 세정하였으며(500×g, 5분), 혈구계산판으로 정자의 수를 산정하여 500×10⁶ sperm/ml가 되도록 정자부유액을 작성하였다. 수정능획득을 위하여 정자부유액과 동량의 200 µg/ml heparin (Sigma Chemical Co., USA) 용액을 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 15분간 정치하였다.

체외수정을 위한 drop은 플라스틱 petri dish(Becton Dickinson Labware, USA)에 수정용 mTALP로 43 µl의 미소적을 만든 후 미네랄 오일(Sigma Chemical Co., USA)을 도포하여 CO₂ 배양기내에 정치하였다. 성숙배양 23시간째에 체외성

숙난자를 회수하여 세정용 mTALP로 3회 세정한 후 4~6개의 난자를 3 µl의 배양액과 함께 흡인, 미리 작성해 둔 수정용 미소적내에 주입하였으며 여기에 정자농도가 2×10⁶ sperm/ml가 되도록 정자부유액(4 µl)을 첨가하여 5% CO₂ 배양기내에서 30시간 체외수정하였다 (Lee 등, 1996).

3. 체외배양

체외배양에 사용한 배양액은 BSA농도를 8 mg/ml로 낮춘 합성난관배양액(Tervit 등, 1972; SOFM)을 기초배지로 여기에 2%(v/v) Minimum Essential Medium(MEM) 필수아미노산(Life Technologies Inc., USA), 1%(v/v) MEM 비필수아미노산(Life Technologies Inc., USA)을 첨가하여 사용하였다. 체외수정 30시간후 난자를 10 mM HEPES 및 2 mM sodium bicarbonate가 포함된 세정용 SOFM으로 옮겨 가볍게 pipetting 함으로써 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였으며, 1세포기 난자 및 분할된 수정란을 구분하여 2~4세포기로 분할한 수정란만을 실험에 사용하였다. 실험 전체를 통하여 수정 30시간후 2~4세포기로 분할한 수정란의 비율은 체외수정에 제공된 전체난자의 71% (59~73%) 였다. 체외배양은 미리 작성해 둔 30 µl의 SOFM 미소적에 4~6개의 수정란을 넣어 39℃, 5% CO₂, 7% O₂, 88% N₂ 및 습도가 포화상태인 배양기내에서 수정후 9일간 배양하였으며 체외배양후 7일 및 9일째에 수정란을 관찰하여 확장배반포 및 부화배반포의 발생률을 산정하였다.

본 실험에 사용한 insulin (Sigma Chemical Co., USA), human transferrin (Biomedical Technologies Inc., USA) 및 PDGF (Oncogene Science, USA) 는 제조회사의 설명에 따라 희석, 분주하였으며 배양액에 첨가 전까지 -35℃에 동결보존하였다.

4. 실험설계

실험 1에서는 insulin 및 transferrin의 농도 (각각 0.1~20 µg/ml 및 0.01~10 µg/ml)에 따른 수정란의 체외발육률을 조사하여 첨가농도를 결정한 후 insulin 및 transferrin의 단독 또는 동시첨가에

의한 소 수정란의 체외발육 개선효과를 검토하였다. 실험 1에서 transferrin의 첨가농도에 따른 배발육률에 유의적인 차이가 인정되지 않아 insulin과의 동시첨가실험에서는 제조회사의 추천용량 (1~5 $\mu\text{g/ml}$) 범위내의 농도인 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 transferrin을 첨가하였다.

실험 2에서는 1~20 ng/ml의 PDGF 첨가에 따른 체외발육률을 조사하여 최적 첨가농도를 결정하고 insulin과의 동시첨가에 의한 소 수정란의 체외발육률에 대해 검토하였다.

5. 통계학적 분석

각 실험에 있어서 확장배반포 및 부화배반포로의 체외발육률은 Statistical Analysis System(SAS, 1990)의 Categorical Data Modeling(CATMOD) procedure를 이용하여 각 군간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. Insulin 및 transferrin 첨가에 따른 소 수정란의 체외발육 (실험 1)

SOFM에 0.1, 1, 10 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 insulin을 첨가하여 소 수정란을 배양한 결과 각각 51, 51, 56 및 61%가 확장배반포로, 37, 34, 41 및 43%가 부화배반포로 발육하였다. Insulin 20 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군에서 가장 높은 체외발육률을 보였으나 각 첨가농도에 따른 체외발육률에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다(Table 1).

Transferrin의 첨가농도 (0.01, 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g/ml}$) 에 따른 확장배반포로의 발육률은 각각 57, 50, 56 및 47%였으며, 부화배반포로의 발육률은 각각 38, 27, 35 및 38%로 각 첨가농도에 따른 체외발육률에는 유의적인 차이가 없었다(Table 2).

Insulin, transferrin의 단독 및 동시첨가에 따른 소 수정란의 체외발육률을 조사한 결과는 Table 3 과 같다. 대조군, insulin 단독첨가, transferrin 단독첨가 및 insulin과 transferrin의 동시첨가군은 각각 55, 69, 58 및 60%의 확장배반포로의 발육률을 보여 각 군간에 유의차가 인정되지 않았다. 부화배

Table 1. *In vitro* development of 2- to 4-cell bovine embryos cultured in a SOFM containing various concentrations of insulin

Insulin($\mu\text{g/ml}$)	No. of embryos cultured ^a	No. (%) of embryos developed to ^b	
		ExBL	HBL
0.1	150	76 (51)	55 (37)
1	150	77 (51)	51 (34)
10	150	84 (56)	61 (41)
20	150	91 (61)	65 (43)

^a Five replicates.

^b ExBL; expanding blastocyst, HBL; hatching blastocyst.

Table 2. Effect of transferrin supplemented to SOFM on *in vitro* development of 2- to 4-cell bovine embryos matured and fertilized *in vitro*

Transferrin ($\mu\text{g/ml}$)	No. of embryos cultured ^a	No. (%) of embryos developed to ^b	
		ExBL	HBL
0.01	150	85 (57)	57 (38)
0.1	150	75 (50)	41 (27)
1	150	84 (56)	53 (35)
10	150	70 (47)	57 (38)

^a Three replicates.

^b ExBL; expanding blastocyst, HBL; hatching blastocyst.

Table 3. Effect of insulin and/ or transferrin supplemented to SOFM on *in vitro* development of 2- to 4-cell bovine embryos matured and fertilized *in vitro*

Treatment ^a	No. of embryos cultured ^b	No. (%) of embryos developed to ^c	
		ExBL	HBL
Control	200	110 (55)	68 (34)
Insulin	200	137 (69)	78 (39)
Transferrin	200	116 (58)	73 (37)
Insulin + transferrin	200	119 (60)	87 (44)

^a Insulin; 20 µg/ml, transferrin; 1 µg/ml.

^b Five replicates.

^c ExBL; expanding blastocyst, HBL; hatching blastocyst.

Table 4. Effect of platelet-derived growth factor (PDGF) supplemented to SOFM on *in vitro* development of 2- to 4-cell bovine embryos matured and fertilized *in vitro*

PDGF (ng/ml)	No. of embryos cultured ^a	No. (%) of embryos developed to ^b	
		ExBL	HBL
1	150	82 (55)	45 (30) ^c
10	150	86 (57)	63 (42) ^d
20	150	84 (56)	47 (31) ^c

^a Four replicates.

^b ExBL; expanding blastocyst, HBL; hatching blastocyst.

^{cd} Different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

Table 5. Effect of insulin and/ or PDGF supplemented to SOFM on *in vitro* development of 2- to 4-cell bovine embryos matured and fertilized *in vitro*

Treatment ^a	No. of embryos cultured ^b	No. (%) of embryos developed to ^c	
		ExBL	HBL
Control	200	116 (58)	76 (38) ^d
Insulin	200	117 (58)	94 (47) ^{de}
PDGF	200	120 (60)	91 (46) ^{de}
Insulin + PDGF	200	132 (66)	118 (50) ^e

^a Insulin; 20 µg/ml, PDGF; 10 ng/ml.

^b Six replicates.

^c ExBL; expanding blastocyst, HBL; hatching blastocyst.

^{de} Different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

반포로의 발육률은 각각 34, 39, 37 및 44%로 각 군 간에 유의적인 차이가 인정되지 않았으나 insulin, transferrin의 동시첨가군이 대조군에 비해 높은 경향이 있었다($0.05 < p < 0.1$).

2. Insulin 및 PDGF 첨가에 따른 소 수정란의 체외 발육 (실험 2)

PDGF 1, 10 및 20 ng/ml을 SOFM에 첨가하여 수정란을 배양한 결과 55, 57 및 56%의 확장배반포로의 발육률을 나타내어 첨가농도간에 유의적인 차이가 없었으나 부화배반포로의 발육률은 각각 30, 42 및 31%로 10 ng/ml PDGF 첨가군이 다른 두 군에 비해 유의적으로 높음 ($p < 0.05$) 결과를 나타내었다 (Table 4).

SOFM에 PDGF 및 insulin을 단독으로 또는 동시첨가하여 소 수정란의 체외발육에 대한 개선효과를 검토한 결과 확장배반포로의 발육률은 각 군간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 그러나 insulin과 PDGF를 동시에 첨가한 경우 50%의 부화배반포로의 발육률을 나타내 대조군의 38%에 비해 유의적으로 높은 ($p < 0.05$) 체외발육률을 나타내었다 (Table 5).

고 찰

Transferrin은 세포에 철 이온을 공급하거나 또는 배양액중에 존재하는 해로운 중금속이온과 결합하여 독성작용을 억제함으로써 세포의 증식을 자극한다고 보고되었으며 (Rousseau와 Menezo, 1993; 日本組織培養學會, 1984) insulin은 마우스 수정란에서 단백질합성을 증가시키고 insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 수용체에 결합하여 세포의 증식을 자극하며 (Harvey와 Kaye, 1988; 1991), 세포에 존재하는 transferrin 수용체의 수에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (Davis 등, 1986).

실험 1에서는 다양한 농도의 transferrin, insulin 첨가효과를 검토한 후 이들이 2~4세포기 소 수정란의 체외발육에 미치는 영향을 조사하였는데 insulin 및 transferrin의 단독 및 동시첨가에 의한 배발달개선효과는 관찰할 수 없었다. 이는 transferrin과 insulin이 마우스 (Nasr-Esfahani와 Johnson MH, 1992) 및 소 수정란의 발육을 촉진한다는 보고 (Shamsuddin, 1993b)와는 상이한 결과이다. 마우스 수정란에 있어서 transferrin의 배발육촉진효과가 수용체와의 결합을 통한 직접적인 작용에 기인했는지 또는 배양액내의 중금속이온을 제거하는 중합작용에 의한 효과인지는 확실히 알려져 있지 않다. 본 실험에서 사용한 합성난관배양액내에는 BSA, 19종의 아미노산이 함유되어 있는데 BSA 및 아미노산 또한 배양액중의 독성물질이나 이온과 결합하여 독성작용을 억제함으로써 수정란의 발육을 촉진시키는 작용이 보고되어 있다 (Kane, 1987, Van Winkle 등, 1990). 따라서 transferrin이 수정란의 발육에 해로운 중금속의 중합체로서 작용했다면 이미 배양액내에 존재하는 BSA나 아미노산에

의해 그 효과가 나타나지 않았을 것으로 추측된다. BSA에 의한 배발육촉진효과는 BSA의 정제과정에서 함유될 수 있는 저분자량물질 및 BSA에 결합되어 있는 지방산의 작용에 기인하며, 저분자량물질로서는 혈중에 존재하는 세포성장인자의 가능성이 시사되었다 (Kane, 1987). Matsui 등 (1994)은 BSA대신 합성 중합체인 polyvinyl alcohol (PVA)을 포함하는 배양액을 사용하였는데 본 실험에서 사용한 배양액중의 BSA의 존재가 실험결과에 영향을 미쳤을 가능성도 배제할 수 없다.

실험 2에서는 PDGF의 최적 첨가농도를 조사하고 배 발육에 대한 insulin과의 동시첨가효과에 대하여 검토하였다. PDGF 첨가농도에 따른 배발육효과를 검토한 실험에서 Yang 등 (1993)은 CR_{1aa} 배양액에 1 ng/ml와 5 ng/ml를 첨가시 5 ng/ml가 대조군보다 높은 배 발육률을 보였다고 하였고, Eckert와 Niemann (1996)은 TCM199에 1, 10, 100 ng/ml를 첨가한 결과 각 농도간에 유의적인 차이를 관찰할 수 없다고 하였으나, 본 실험에서 PDGF의 최적 첨가농도는 10 ng/ml로 선인들의 보고와 상이한 결과를 보였다. 이러한 결과의 차이는 배양액의 종류 (SOFM, CR_{1aa} 및 TCM199), 배양액내의 macromolecule (BSA 또는 PVA) 및 배양방법의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

Paria와 Dey (1990)은 수정란을 집단으로 배양시 수정란자체가 분비하는 autocrine factor가 자신들의 발육을 자극하며, 수정란을 1개씩 배양하거나 배양액의 양을 증가시키면 이러한 autocrine 작용에 의한 배발육개선효과가 사라진다고 보고하였다. 소의 수정란에서는 insulin 및 PDGF 수용체의 mRNA가 배반포단계까지 지속적으로 발현되며, TGF α , TGF β , PDGF, IGF-1 및 IGF-2의 mRNA가 발현된다 (Watson, 1992). Insulin은 단독으로 또는 다른 세포성장인자와의 상호작용을 통하여 세포의 증식에 관여하며, PDGF존재하에서 세포자체로부터 IGF-1 등 다른 세포성장인자의 합성 및 분비를 증가시키므로써 세포의 autocrine 작용을 자극한다고 보고되었다 (日本組織培養學會, 1987).

본 실험에서는 PDGF를 단독으로 첨가시 대조군에 비해 유의적인 발육개선효과를 관찰할 수 없었으나 ($0.05 < p < 0.1$) insulin과 동시에 첨가시 부화

배반포로의 발육이 개선되었는데, 수정란의 집단배양에 의한 autocrine 작용(Paria와 Dey, 1990) 또는 PDGF 수용체의 down regulation (Heldin 등, 1982)이 PDGF의 단독첨가효과를 상쇄한 것으로 생각할 수 있으며, 동시첨가된 insulin이 PDGF 또는 다른 autocrine factor에 영향을 미쳐 배 발육을 촉진한 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 BSA 및 아미노산을 포함하는 합성난관배양액에 첨가된 insulin 및 PDGF는 협동적으로 작용하여 소 수정란의 체외발육을 증가시키는 것으로 사료된다.

적 요

소 수정란의 체외배양에 있어서 혈청 및 체세포를 포함하지 않는 합성난관배양액에 insulin, transferrin 및 PDGF를 단독으로 또는 동시에 첨가하여 이들이 체외수정유래 소 수정란 (2~4세포기)의 체외발육에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. BSA 및 아미노산을 포함하는 합성난관배양액에 단독으로 첨가된 transferrin 및 insulin은 2~4세포기 소 수정란의 체외발육을 유의적으로 개선하지는 못했다. Insulin 및 transferrin을 동시에 첨가시 부화배반포로의 발육이 증가하는 경향이 있었으나 유의적인 차이는 없었다 ($0.05 < p < 0.1$).
2. BSA 및 아미노산을 포함하는 합성난관배양액에 PDGF의 단독첨가가 소 수정란의 체외발육을 개선시키는 효과는 없었으나, insulin을 동시에 첨가시 부화배반포로의 발육이 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$).

참고문헌

Davis RJ, Corvera S and Czech MP. 1986. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. J. Biol. Chem., 261:8708-8711.

Eckert J and Niemann H. 1996. Effects of plat-

elet-derived growth factor (PDGF) on the *in vitro* production of bovine embryos in protein-free media. Theriogenology, 46:307-320.

Eriksen T, Terkelsen O, Hyttel P, Mollgard K and Greve T. Regional morphology and localization of PDGF in bovine oviduct epithelium. Theriogenology 39:15 (abstr).

Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormones, and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 86:501-506.

Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 26:40-46.

Gandolfi F, Brevini TAL, Modina S and Lauria A. 1991. Detection and characterization of a growth factor in bovine oviduct secretions. J. Reprod. Fert., 7:6 Abstract.

Gardner DK and Lane M. 1993. Amino acids and ammonium regulate the development of preimplantation mouse embryos in culture. Biol. Reprod., 48:377-385.

Handyside AH and Hunter S. 1984. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts *in situ* using polynucleotide specific fluorochromes. J. Exp. Zool., 31:429-434.

Harvey MB and Kaye PL. 1988. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos. Endocrinology, 122:1182-1184.

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.

Harvey MB and Kaye PL. 1991. Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-1 through the insulin receptor. Mol. Reprod. Dev.,

- 29:253-258.
- Heldin C-H, Wasteson A and Westermark B. 1982. Interaction of platelet-derived growth factor with its fibroblast receptor : Demonstration of ligand degradation and receptor modulation. *J. Biol. Chem.*, 257:4216-4221.
- Kane MT. 1987. *In vitro* growth of preimplantation rabbit embryos. In: *The Mammalian Preimplantation Embryo*(Bavister BD ed.), Plenum, pp. 193-217.
- Kastrop PMM, Bevers MM, Destree OHJ and Kruip ThAM. 1990. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26: 222-226.
- Kaye PL, Bell KL, Beebe LFS, Dungleison GF, Gardner HG and Harvey MB. 1992. Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reprod. Fertil. Dev.*, 4:373-386.
- Kim J-H, Niwa K, Lim JM and Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.*, 48:1320-1325.
- Larson RC, Igotz GG and Currie WB. 1992. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. *Development*, 115:821-826.
- 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.
- Lee ES, Fujii Y and Fukui Y. 1996. A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 45:1151-1162.
- Lee ES and Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acids uptake by *in vitro* produced bovine morulae and blastocysts. *Biol. Reprod.* 55:1383-1389.
- Lee ES, Jung YG, Araki N and Fukui Y. 1996. Effect of human or murine leukemia inhibitory factor on *in vitro* development of bovine morulae cultured singly or in a group. *J. Mamm. Ova Res.*, 13:19-23.
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1994. Effect of insulin and insulin-like growth factor- I on the development of bovine embryos. *J. Mamm. Ova Res.*, 11:132-133.
- Mattson BA, Rosenblum IY, Smith RM and Heyner S. 1988. Autoradiographic evidence for insulin and insulin-like growth factor binding to early mouse embryos. *Diabetes*, 37:585-589.
- Moor K and Bondioli, KR. 1993. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryo. *Biol. Reprod.*, 48:833-840.
- Moor RM and Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.*, 49:101-109.
- Nasr-Esfahani MH and Johnson MH. 1992. How does transferrin overcome the *in-vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo. *J. Reprod. Fert.*, 96:41-48.
- 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.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*, 24:537-549.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 5: 591-600.
- Rappolee DA, Brenner CA, Schultz R, Mark D and Werb Z. 1988. Developmental expression of PDGF, TGF- α , and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. *Science*, 241:1823-1825.
- Rosenblum IY, Mattson BA and Heyner S. 1986. Stage-specific insulin binding in mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.*, 116: 261-263.
- Rosenkrans, Jr CF, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK and First NL. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49:459-462.
- Rousseau J-P and Menezo Y. 1993. Role of the female genital tract in the transport and survival of gametes and the fertilized egg. In: *Reproduction in Mammals and Man*(Thibault C, Levasseur M-C and Hunter RHF ed.), Ellipses, pp. 369-386.
- SAS. 1990. User's Guide: Statistics, Version 6, Cary, NC: Statistical Analysis System Institute Inc.
- Shamsuddin M, Larson B and Rodriguez-Martinez H. 1993b. Culture of bovine IVM /IVF embryos up to blastocyst stage in defined medium using insulin, transferrin and selenium or growth factors. *Reprod. Dom. Anim.* 28:209-210.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H and Rodriguez-Martinez H. 1993a. *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.
- Tervit HR, Whittingham DG and Rowson LEA. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497.
- Van Winkle LJ, Haghighat N and Campione AL. 1990. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. *J. Exp. Zool.*, 253:215-219.
- Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE and Schultz GA. 1992. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 32:87-95.
- Watson AJ, Watson PH, Arcellana-Palilio M, Warnes D, Walker SK, Schultz GA, Armstrong DT and Seamark RF. 1994. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. *Biol. Reprod.*, 50:725-733.
- 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. 1990. Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 42:662-668.
- 日本組織培養學會. 1984. 細胞成長因子. 初版, 朝倉書店, 東京. pp. 152-155.
- 日本組織培養學會. 1987. 細胞成長因子 part II. 初版, 朝倉書店, 東京. pp. 79-82.

(접수일자 : 1997. 11. 17 / 채택일자 : 1997. 12. 20)