

Vero Cell과의 공동배양이 체외에서 생쥐 배아발생에 미치는 영향

인제대학교 의과대학 산부인과학교실 서울 백병원

이 윤 · 박준홍 · 강혜나 · 김용봉 · 이응수 · 박성관

The Effects of Vero Cell Co-culture on Mouse Embryo Development

Yoon Lee, June Hong Park, He Na Kang, Yong Bong Kim,
Eung Soo Lee and Sung Kwan Park

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, InJe University,
Seoul Paik Hospital, Seoul, Korea*

= Abstract =

Embryos of most mammalian species grown in vitro would undergo developmental arrest at the approximate time of genomic activation. Stage-specific cell block and the resulting rapid loss of embryo viability in conventional culture media have limited the duration for which embryos may be cultured prior to transfer. As a result, embryos are usually transferred to the uterus at the 4-to 8-cell stage to avoid the loss of viability associated with long-term in vitro culture. Early transfer has led to asynchrony of the endometrium-trophectoderm interaction at the time of implantation and a resultant reduction in the rate of implantation.

To overcome these problems, a variety of co-culture systems has been devised in which embryos can develop for a longer period prior to embryo transfer.

Vero cells, derived from African green monkey kidney, share a common embryologic origin with cells from the genital tract. In addition, they are potentially safe to use, since they are highly controlled for viruses and other contaminants. Therefore, co-culture using Vero cells has been widely utilized to enhance embryo viability and development, although not without controversies.

We thus designed a series of experiments to demonstrate whether Vero cells do indeed enhance mouse embryo development as well as to compare the efficacy of co-culturing mouse 1-cell embryos on Vero cell monolayer in both Ham's F-10 and human tubal fluid (HTF) culture media.

1-cell stage ICR mouse embryos were cultured either in the presence of Vero cells (Group A) or in conventional culture medium alone (Group B). In Ham's F-10 significantly more 3-to-8cell embryos developed in group A than group B (59.8 versus 10.0%; $p < 0.01$). In contrast, there was no significant difference in embryonic development both group A and group B in HTF. However, significant differences were noted only in later embryonic stage (13 and 0%; $p < 0.05$ of group A and B respectively, hatching or hatched). In Ham's F-10, we also could observe the beneficial

* 이 연구는 1995년도 인제연구 장학재단 연구비 보조로 이루어진 것임

effect of Vero cell on hatching process (70.7 and 42.1%; $p < 0.05$ of group A and group B respectively).

Key Words: Vero cell, Co-culture, Mouse embryonic development

서 론

1978년 세계에서 최초로 시험관 아기가 탄생한 이후 (Edward *et al.*, 1980), 체외수정술의 분야는 지난 15년간 급속한 발전을 하였다. 그러나 이러한 눈부신 발전에도 불구하고 체외수정술을 이용한 출산 성공률은 13% 정도로 매우 낮다 (Cohen *et al.*, 1993). 체외수정 프로그램에 있어서 이러한 낮은 성공률은 여러 가지로 설명될 수 있겠으나 그중에서도 수정란을 체외에서 배양하는 동안 일어날 수 있는 stage-specific cell block 과 기존 배양액내에서 배양시 배아의 생존력의 현저한 감소가 가장 중요한 원인이다 (Schillaci *et al.*, 1994). 이러한 세포분열의 정지와 체외에서의 배아의 생존률의 감소는 이식전 배아의 체외 배양시간을 인위적으로 제한하게 되었다. 그결과 시험관내에서 오랜 배양으로 인한 배아의 생존률의 감소를 피하기 위하여 체외수정 후 발생 4~8 세포기에 자궁내 이식하게 되었다.

자연임신의 경우 4~8 세포기의 배아는 수란관에 위치하여 포배기에 이르기 까지 70~75시간을 더 발생한 후 자궁내로 이동하여 20~24 시간 뒤 착상하게 된다. 그러나 체외수정 프로그램에 있어서 4~8 세포기 배아의 자궁내 이식은 착상전 90~99 시간 동안 자궁내 환경에 배아가 계속 노출 됨으로서 착상시 배아와 자궁내막 상호간 이질성이 유발되어 그결과 배아의 퇴화와 착상률의 현저한 감소를 일으키게 된다 (Menezo *et al.*, 1990; Bongso *et al.*, 1992). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 배아를 자궁내 이식하기전 좀더 오랫동안 체외에서 발생시키기 위하여 다양한 공동 배양계가 고안되었다. 공동배양계의 종류로는 cellular trophoblastic vesicle (Heyman *et al.*, 1987)과 cellular monolayer 두가지가 있는데 이중 후자가 널리 사용되고 있다. Monolayer로 사용되는 cell line 으로는 자궁내막세포 (Wiemer *et al.*, 1989), 난관세포 (Bongso *et al.*, 1992) 및 Vero cell (Menezo *et al.*, 1990) 등이 있는데 이들은 종 (Boland *et al.*, 1984), 기관 (Menezo *et al.*, 1990), 호르몬 (Papaioannou & Ebert, 1986)에 특이성이

없는 것이 특징이다. 이중 Vero cell 은 African green monkey kidney cell 로 생식기관 세포와 그 발생기원이 같고 (Menezo *et al.*, 1990) 기존 배양액내에서 쉽게 증식하며 virus나 기타 오염물질로부터 안전하게 사용될수 있다는 장점을 갖고 있다. 그러므로 체외배양시 배아의 생존률을 증진시키기 위하여 Vero cell과의 공동배양이 널리 이용되고 있으나 그 효과에 대하여는 아직도 논란이 있다.

본 실험은 ICR 계 생쥐 1-세포기와 후기 2-세포기 배아를 Ham's F-10과 HTF배양액내에서 Vero cell 과 각각 공동배양함으로써 배아의 발생을 관찰하고 공동배양하지 않은 대조군과 비교 분석하여 배아의 발생에 미치는 공동배양의 효과를 알아봄으로서 앞으로 이를 인간에 적용하여 체외 수정프로그램에서 임신 성공률을 높이고자 실시 하였다.

재료 및 방법

1. Vero cell monolayer의 준비

냉동된 Vero cell vial을 37°C water bath에서 녹인 후, Ham's F-10 + 10% fetal bovine serum (FBS) 로 세척한 다음 $2-3 \times 10^6$ cells 농도로 tissue culture flask (75 cm², Falcon, Becton, Dickinson, NJ, USA)에 넣어 37°C, 5% CO₂, 95% 공기가 공급되고 99% 습도가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 4~5일 후 증식된 세포들 (8×10^6 cells)을 0.05% trypsin/ 0.02% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)로 trypsinization시켜 cell suspension을 만든 후 3 부분으로 나누어 하나는 보존을 위하여 $2-3 \times 10^6$ cells 농도로 -196°C 에 동결시켰고, 다른 하나는 새로운 flask에 $2-3 \times 10^6$ cells 농도로 계속 배양시켰으며, 또 다른 하나는 4 well-mul-tidish (Nunc)에 1×10^5 cell/well 농도로 배양하여 2일후 monolayer가 형성되면 실험에 사용하였다 (Fig. 1).

한편 Vero cell의 증식을 위한 계대배양은 4 계대가 넘으면 증식이 현저하게 둔화되므로 실험에 사용하는 Vero cell은 4계대를 넘지않도록 하였다.

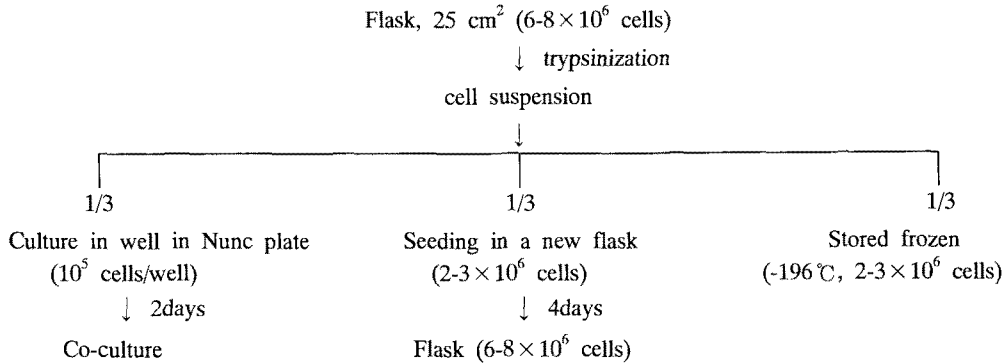


Figure 1. Diagram of the procedure for maintenance of established Vero cell line for the co-culture.

2. 실험동물 및 배아의 준비

본 실험에서는 명 14시간, 암 10시간으로 광주기를 조절하고 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 약 1주동안 사육한 Swiss albino인 ICR계통의 5~6주된 암컷생쥐 (CrI-CD-1[ICR] BR)를 사용하였다.

배아를 얻기위하여 5 IU의 Pregnant Mares' Serum Gonadotrophin (PMSG, Sigma)을 암컷에 복강주사하고 48시간 후 5 IU의 human chorionic gonadotrophin (hCG, Sigma)을 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 교배시켰다. 다음날 아침 질전(vaginal plug)이 관찰된 암컷을 골라 hCG주사후 28시간에 1-세포기 배아를, 50시간에 후기 2세포기 배아를 수관란으로 부터 각각 얻었다.

3. 배양액과 공동배양의 준비

Ham's F-10 + 10% FBS를 기본 배양액으로 하여 실험 26시간전에 Vero cell을 10^5 cells/well농도로 4 well dish에 깔고 24시간후 monolayer가 형성되면 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척한 후 다시 배양액을 넣어 2시간 전배양한 후 배아를 넣어 발생률을 관찰하였다. 또한, Vero cell monolayer와 1-세포기 배아의 공동배양시 사용된 배양액들의 효과를 비교하기 위하여 human tubal fluid (HTF)를 배양액으로 사용한 경우는 실험 72시간 전에 Vero cell을 10^5 cells/well농도로 4 well dish에 깔고 Ham's F-10 + 10% FBS와 HTF + 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA)를 1:1 비율로 섞은 혼합 배양액에서 24시간 적응시킨 후 HTF + 4 mg/ml BSA로 배양액을 교체하여 48시간 더 배양한 후 배아를 넣어 공동배양하였다.

한편 대조군은 Vero cell monolayer 없이 배양액만으로 배아를 배양한 군으로하여 공동배양한 실험군과 배아 발생률을 비교 관찰하였으며 실험 결과의 통계학적 유의성은 Chi square test 방법으로 사용하여 p값이 0.05보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다.

연구 결과

1. Vero cell과의 공동배양이 ICR계 생쥐 1-세포기 배아의 발생률에 미치는 영향

ICR계 생쥐 1-세포기 배아를 Ham's F-10과 HTF 배양액에서 48 시간 배양하였을 때 Ham's F-10의 경우 대조군과 공동배양군 간 3-세포기 이상 발생률은 10.0% (6/60), 와 59.8% (55/92)로 공동배양군이 훨씬 높았으나 ($p < 0.01$), HTF경우는 61.3% (38/62)와 69.5% (57/82)로 공동배양군에서 약간 높게 나타났으나 상호 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

한편, 할구들의 질적인 불량도를 나타내는 세편화의 빈도는 대조군의 경우 Ham's F-10과 HTF 군에서 각각 13.3% (8/60)와 14.5% (9/62)를 보인 반면, 공동배양군은 0% (0/92)와 4.9% (4/82)로 각각 나타나 공동배양군에서 사용된 배양액의 종류에 관계없이 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$) (Table 1).

그리고 각 군에서 3-세포기 이상의 발생을 보인 배아들을 배양 48시간에 골라 다시 72~96시간까지 배양하였을 때 HTF의 경우 배반포율은 대조군과 공동배양군에서 각각 34.2%, 36.8%로 유사하게 나타났으나 부화율은 0%와 22.8%로 공동배양군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$) (Table 2).

Table 1. Development of 1-Cell Stage ICR Mouse Embryos during the First 48 Hours

Culture Condition (n)	Number of Embryos Developed at Each Stage			
	1-cell (%)	2-cell (%)	3-to 8-cell (%)	Fragmentation (%)
Control				
Ham's F-10 (n=60)		46 (76.7)	6 (10.0)*	8 (13.3) [†]
HTF (n=62)	2 (3.2)	13 (21.0)	38 (61.3)	9 (14.5) [‡]
Co-culture [§]				
Ham's F-10 (n=92)	6 (6.5)	31 (33.7)	55 (59.8)*	0 (0) [†]
HTF (n=82)	3 (3.7)	18 (22.0)	57 (69.5)	4 (4.9) [‡]

* p<.01; †, ‡ p<.05; § embryos cultured on Vero cell monolayer.

Table 2. Development of 3- to 8-Cell Stage ICR Mouse Embryos for the Last 24 Hours (Hours 72 to 96)

Culture Condition (n)	Number of Embryos Developed at Each Stage		
	Morula (%)	Blastocyst (%)	Hatching and Hatched Blastocyst (%)
Control			
Ham's F10 (n=6)	4 (66.7)		
HTF (n=38)	11 (28.9)	13 (34.2)	0 (0)*
Co-culture [†]			
Ham's F10 (n=55)	5 (9.1)		
HTF (n=55)	24 (42.1)	21 (36.8)	13 (22.8)*

* p<.05; †Embryos cultured on Vero cell monolayer.

Table 3. Development of Late 2-Cell Stage ICR Mouse Embryos in Ham's F 10 Medium with Vero Cell Monolayer

Culture Condition (n)	Number of Embryos Developed at Each Stage			
	Morula (%)	Blastocyst (%)	Hatching & Hatched Blastocyst (%)	Fragmentation (%)
Control (n=57)	44 (77.2)	39 (68.4)	24 (42.1)*	8 (14.0) [†]
Co-culture (n=75) [§]	66 (88.0)	63 (84.0)	53 (70.7)*	2 (2.7) [†]

*p<.05; †p<.01; § embryos cultured on Vero cell monolayer.

2. Vero cell과의 공동배양이 ICR계 생쥐 후기 2-세포기 배아의 발생률에 미치는 영향

ICR 계 생쥐 후기 2-세포기 배아를 Ham's F-10 배양액내에서 Vero cell과 함께 공동배양하여 배 발달에 미치는 Vero cell의 영향을 조사하였을 때 상실배 (대조군 77.2% (44/57); 공동배양군 88.0% (66/75))와 배반포 (대조군 68.4% (39/57); 84.0% (63/75))까지의 발생률에는 유의한 차이는 보이지 않았으나 부화율 (대조군 42.1% (24/57); 공동배양군 70.7% (53/75))에서는 유의한 차이를 보였다 (p<0.05)(표 3). 그리고, 배아의 질적 불량도를 반영하는 세편화의 빈도는 역시 초기 배아발달

의 경우와 동일하게 공동배양군에서 유의하게 낮았다 (p<0.05) (Table 3).

고 찰

대부분의 포유류의 1-세포기 배아를 체외에서 배양하면 제 1 난할과 제 2 난할사이 intermitotic period동안 발생 정지현상이 나타나 2-세포기에서 배아발달이 정지된다. 이러한 'in vitro 2-cell block'현상은 Vero cell과 공동배양을하면 극복될 수 있음이 여러 학자들에 의하여 제시되었다.

Lai 등 (1992)은 Vero cell이 생쥐 배아발달에

미치는 공동배양의 효과를 사용된 다양한 종류의 배양액과 쥐의 strain별로 관찰한 결과 Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F 12) 배양액을 사용한 경우 strain ICR은 공동배양한 Vero cell의 효과를 관찰하지 못하였으나 strain CB6F1과 DF1에서는 유의한 효과를 나타냈다. 반면, HTF배양액을 사용하였을 경우 ICR, CB6F 1 및 DF3 strain 모두 배반포까지 발생률이 대조군과 공동배양군에서 비슷하여 Vero cell의 효과를 관찰할 수 없었다.

ICR strain으로 실험한 본 연구 결과에서도 Vero cell 성장에는 적합하나 배아발달에는 적합하지 않은 Ham's F-10 배양액을 사용한 경우 (Sakkas *et al.*, 1989) 공동배양군에서 'in vitro 2-cell block'현상을 극복하여 3~8세포기까지의 발생률은 대조군에 비하여 유의하게 높았으나 상설배까지의 발달은 양군간 차이가 없어 Lai 등 (1992)의 결과와 같았다. 반면 배아발달에는 적합하나 Vero cell 성장에는 부적합한 HTF 배양액을 사용하였을 경우 (Quinn *et al.*, 1985) 양군 공히 배반포까지 비슷한 발생률을 나타내 Vero cell의 효과를 관찰하지 못하였다. 이러한 소견들을 감안할 때 Vero cell은 배아초기 발생시 나타날 수 있는 발생 정지현상을 극복하는데 중요한 역할을 할 것으로 시사되며 이러한 극복을 위해서는 공동배양시 사용되는 배양액의 선택이 중요할 것으로 생각된다. 또한, Lai 등 (1992)의 결과에서 나타난 것처럼 성공적인 배아발달을 위해서는 생쥐의 strain 역시 관계가 있는 것 같다.

Vero cell이 많은 동물의 배아의 질을 높이는 데 도움이 되는 이미 주지된 사실이다. Vero cell과 공동배양한 배아는 일반 배양액내에서 자란 그것에 비하여 배아내 할구수는 유의하게 많은 반면 난할시 나타나는 세편화의 빈도는 유의하게 적다 (Wiemer *et al.*, 1989; Sakkas *et al.*, 1989; Goodeaux *et al.*, 1990). 또한, Vero cell은 배아의 형태와 난할의 증진에도 유의한 효과를 나타내는데 (Van Blerkom, 1993) 그 결과 배아의 착상률과 착상후 배아발달도 향상된다. 본 연구에서도 배아의 질적 불량도를 나타내는 세편화의 빈도는 Vero cell과 공동배양한 군에서 유의하게 낮게 나타나 Menezo 등 (1990)의 결과와 일치하였는데 이는 배아의 세편화의 원인을 외부환경에 대한 stress라고 볼 때 Vero cell이 환경과 배아사이에 간접적으로 작용하여 stress에 대한 완충작용

을 함으로서 외부환경의 stress로 부터 보호하여 주기 때문으로 생각된다.

Vero cell은 체외환경을 생체내 조건과 유사하게 개선시킴으로서 배아발달에 유의한 효과를 나타내는것 같다. 그러나, Vero cell과 배아를 공동배양하였을 때 배아발달이 증진되는 기전에 대해서는 아직도 불분명하다. 어떤 학자들은 Vero cell이 일반배양액내 존재하고 있는 heavy metal divalent cations나 metabolic inhibitor같은 독성물질을 제거함으로서 유의한 효과를 나타낼것 (Ouhibi *et al.*, 1990; Bongso *et al.*, 1993)이라고 주장하는 반면 다른 학자들은 아직도 확실하게 밝혀져 있지는 않지만, 배아발달을 촉진시키는 인자를 Vero cell이 분비함으로서 배아발생에 직접 혹은 간접으로 영향을 줄것이라는 가설을 지지하고 있다 (Heyman *et al.*, 1987; Gandolfi *et al.*, 1989). 일반배양액내에서 배아를 배양시 첨가되는 혈청단백은 배양액내 배아의 발달에 저해되는 독성물질을 킬레이트화 시킴으로서 배아에 대한 독성을 감소시킨다 (Flood & Shirley, 1991). 혈청단백을 첨가하지 않은 배양액내에서 Vero cell과 같은 somatic cell과 공동배양하였을 때 배아발달이 지속되었다는 사실 (Fukui *et al.*, 1991)은 Vero cell이 배양액내 존재하는 독성물질을 제거함으로서 그 효과가 나타났음을 시사한다.

Loutradis 등 (1987)은 BWW medium에 30 μ M의 hypoxanthine을 첨가하여 생쥐배아를 배양하였을 때 2-cell block이 유도되고 Vero cell과 같은 somatic cell과 공동배양하면 배아발생이 지속되었음을 보고하면서 hypoxanthine이 배아발생정지현상에 중요한 원인이되며 공동배양으로 사용된 somatic cell이 이 물질을 제거함으로서 배아발달이 진행되었을 것이라고 주장하였다. 본 연구에서도 hypoxanthine을 포함하고 있는 Ham's F-10 배양액내에서 배아를 Vero cell과 공동배양하였을 때 배아의 발달이 증진되었으나 hypoxanthine을 포함하고있지않은 HTF 배양액내에서는 Vero cell의 유의한 효과를 관찰하지 못하였는데 이 소견 역시 배양액내에 존재하고 있는 배아발생에 해로운 물질을 Vero cell이 제거함으로서 효과가 나타나는 것 같다.

Bavister (1988) 역시 somatic cell이 배양액내 배아발달 저해물질을 제거함으로서 유의한 효과가 나타날 것이라는 주장을 지지하면서 여러종류의 somatic cell과 공동배양하였을 때 사용된 somat-

ic cell 모두 배아발달에 유익한 효과가 관찰되었기 때문에 이러한 효과의 발생은 어떤 특정한 체세포계가 관계가 있는 것이 아니라 상피의존적이라 하였다. 그러나, Heyman 등 (1987)과 Gandolfi 등 (1989)이 주장하였듯이 somatic cell로부터의 embryotrophic factor분비 가능성도 고려하여야 한다.

수정이 이루어지는 수란관의 환경은 상대적으로 저산소성이다 (Gosden & Byatt-Smith, 1986). 실제로 저산소성 (5% O₂)배양조건에서 배양하였을 경우 배아발달이 향상되었다는 연구보고가 많다 (Hoppe & Pitts, 1973; Quinn & Harlow, 1978). 대기성 산소농도 (20% O₂)상태에서 배양을 하면 배아는 높은 산소농도에 노출되어 oxidative stress를 받아 superoxide anions 혹은 hydrogen peroxides 등 free radical이 세포내에 발생하여 배아발달이 저해된다 (Pabon *et al.*, 1989).

Fukui 등 (1991)은 대기성 산소농도 상태에서 somatic cell과 배아를 공동배양한 군과 5%로 산소농도를 낮추고 배아만 단독 배양한 대조군에서 포배까지 발생률을 비교한 결과 양군 상호 유사하였다고 보고하였는데 이는 somatic cell이 배양액내 산소농도를 감소시키거나 혹은 toxic radicals를 감소시킴으로서 배아발달에 높은 산소로 인한 유해한 효과를 완화시킬수 있었음을 시사한다.

부화과정에 미치는 Vero cell의 효과에 관하여 Wiemer 등 (1989)은 somatic cell이 chymotrypsin같은 단백분해효소를 분비함으로써 투명대를 소화시켜 부화과정을 용이하게 할 것이라고 보고하였다. 또한 Ouhibi 등 (1990)도 Vero cell은 단백분해효소를 분비함으로써 배양액내 존재하는 배아에 대한 저해물질을 파괴, 제거함으로써 배아발달에 유익한 효과를 나타낼 것이라고 하였다.

본 연구에서 생쥐후기 2-세포기와 Vero cell과 공동배양하였을 때 Vero cell은 배반포의 부화과정에 현저한 효과를 나타냈으며 이때 사용된 배양액의 종류는 초기 배아발생시와는 달리 중요하지 않은 것으로 관찰되었다. 즉, 배아가 점점 발달할수록 공동배양의 효과는 현저하여 졌는데 이는 배아가 성장할수록 왕성한 세포대사 활동과 배양액의 degradation 결과로 배아발달을 저해시키는 물질이 발생하는데 Vero cell은 chymotrypsin 같은 단백분해효소를 분비함으로써 저해물질을 파괴 제거하여 해로운 환경으로부터 배

아를 구출하고 투명대를 소화시킴으로서 부화과정을 도울것으로 생각된다.

결 론

배아발생에 미치는 Vero cell의 효과를 관찰하기 위하여 ICR계 생쥐 1-세포기 배아와 후기 2-세포기 배아를 Vero cell과 각각 공동배양함으로써 배아의 발달을 관찰하고 공동배양하지않은 대조군과 비교분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Vero cell은 생쥐배아를 제외배양시 일어날 수 있는 'In-vitro 2-cell block'을 극복함으로써 초기배아발달에 중요한 역할을 하고,
2. 공동배양시 사용되는 배양액의 종류 선택이 성공적인 배아발달에 중요하며,
3. Vero cell은 후기배아발달에 있어서도 배반포의 부화과정에 현저한 효과를 나타냈다.

참 고 문 헌

- Bavister BD: Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo or in vitro. *Theriogenology* 1988, 29, 143-154.
- Boland MP: Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 1984, 21, 126-137.
- Bongso A, Ng SC, Fong CY, et al: Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell co-culture. *Fertil Steril* 1992, 58, 569-574.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, et al: The search for improved in-vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Hum Reprod* 1993, 8, 1155-1162.
- Cohen J, DeMouzon J, Lancaster P: 1993 World collaborative report on assisted reproduction: results of 1991 attempts. *J Assist Reprod Genet* 1993, 10 (Supple 6), 2 (Abstr).
- Edward RG, Steptoe PC, Purdy JM: Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 1980, 87, 737-756.
- Flood L, Shirley B: Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol Reprod*

- Dev* 1991, 30, 226-231.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, et al: Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in-vitro. *J Reprod Fertil* 1991, 92, 125-131.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Moor RM: Effect of oviductal environment on embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* 1989, 38, 107-115.
- Goodeaux LL, Thibodeaux JK, Voelkel SA, et al: Collection, co-culture, and transfer of Rhesus preimplantation embryos. *Assist Reprod Technol Androl* 1990, 1, 370-379.
- Gosden RG, Byatt-Smith JG: Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model predictions and implication. *Hum Reprod* 1986, 1, 65-68.
- Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, et al: In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1987, 27, 59-68.
- Hoppe PC, Pitts S: Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol Reprod* 1973, 8, 420-426.
- Lai YM, Stein DE, Soong YK, et al: Evaluation of Vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. *Hum Reprod* 1992, 7, 276-280.
- Loutradis D, John D, Kiessling AA: Hypoxanthine causes a 2-cell block in random bred mouse embryos. *Biol Reprod* 1987, 37, 311-316.
- Menezo Y, Guerin J, Czyba J: Improvement of human embryo development in vitro by co-culture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990, 42, 301-306.
- Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, et al: Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell support. *Hum Reprod* 1990, 5, 737-743.
- Pabon JE Jr, Findly WE, Gibbons WE: The toxic effects of short exposures to the atmosphere oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 1989, 51, 896-900.
- Papaioannou VE, Ebert KM: Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *J Reprod Fertil* 1986, 76, 603-608.
- Quinn P, Harlow GM: The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryo in vitro. *J Exp Zool* 1978, 206, 73-80.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985, 44, 493-498.
- Sakkas D, Trounson AO, Kola I: In-vitro cleavage rates and viability obtained for early cleavage mouse embryos in co-culture with oviduct cells. *Reprod Fertil Dev* 1989, 1, 127-136.
- Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E: Vero cell effect on in-vitro human blastocyst development: preliminary result. *Hum Reprod* 1994, 9, 1131-1135.
- Van Blerkom J: Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cells. *Hum Reprod* 1993, 8, 1525-1539.
- Wiemer KE, Cohen J, Amborski F, et al: In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum Reprod* 1989, 4, 595-600.
- Wiemer K, Cohen J, Wiker S, et al: Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblast: morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989, 52, 503-508.