

체외배양 기술로 생산된 초기배에 의한 한우 송아지 생산기술 개발

II. 체외성숙, 수정된 소 초기배의 체외발생에 있어서 ITS와 EGF의 효과

서경덕 · 김호중 · 김갑수* · 김광식

연암축산원에전문대학

Development of Production Techniques for Korean Native Cattles Calves from Embryos by *In Vitro* Technology

II. Effects of ITS and EGF on Blastocyst Development of *In Vitro* Matured, Fertilized Bovine Oocytes

Seo, K. D., H. J. Kim, K. S. Kim* and K. S. Kim

Yonam College of Animal Husbandry & Horticulture

SUMMARY

This study was undertaken to investigate the effects of ITS and EGF on embryonic development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes in culture medium supplementing with or without calf serum.

When fertilized oocytes were cultured in TCM-199 containing 0, 0.1, 0.5 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ITS with 5% calf serum, the rates of development to blastocyst stage and the cell number of blastocysts were not significantly different among all treatments. And also monolayer of cumulus /granulosa cells prepared in containing calf serum and ITS were no beneficial effects of embryonic development.

On the other hand, when EGF was supplemented to TCM-199 containing calf serum or calf serum free, embryonic development rates($24.0 \pm 2.8\%$ to $29.2 \pm 1.7\%$ or 8% to 9%) and cell number of blastocysts($p < 0.05$) were significantly increased compared with EGF-free(22.1 ± 2.1 or 1.0%, $p < 0.05$). But when fertilized oocytes were cultured with cumulus /granulosa cells in TCM-199 containing EGF and calf serum, the rate of embryos development to the blastocyst stage and cell number of blastocysts were not significantly different compared with EGF-free and any concentrations.

These results showed that ITS and EGF was not improved the development of bovine embryo *in vitro* matured and *in vitro* fertilized with calf serum and /or monolayer of cumulus /granulosa cells.

(Key words : ITS, EGF, Embryonic development, Calf serum)

이 논문은 1996학년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

*영농조합법인 엠바이오텍(Embiotec Co., Inc. ET Worldwide)

I. 서 론

많은 포유동물의 난자는 체외배양을 하면, 어떤 결정된 분할기에 발생이 저해된다. 즉, 마우스 및 햄스터는 2세포기(Yanagimachi와 Chang, 1964), rat와 돼지는 4세포기(Davis와 Day, 1978), 양은 8세포기에 각각 발생이 저하되어 난분할이 중지되거나 또는 발생율이 현저하게 저하된다. 소에 있어서는 8세포기에 발생이 정지하고(Tervit 등, 1972; Wright 등, 1976), 8세포기보다 앞의 stage부터 배반포기까지 계속하여 체외배양하는 것은 불가능하였다. 여기서, 토끼의 난관(Boland, 1984) 및 양의 난관(Eyestone 등, 1987; Willadsen과 Polge, 1981)에 임시로 이식하는 방법이 이용되고, 이 방법으로 발생한 배반포배를 이식하여 산자가 얻어지기에 이르렀다. 그러나 임시로 이식되는 수란암추의 준비 및 외과적 이식에 의한 불필요한 조작은 배발생기구의 기초 및 발생공학적 연구에 커다란 장애가 되었다.

최근, 소 수정란을 체세포와 함께 공배양을 하는 것에 의해 발생장애를 넘어 분할하고 발생하는 것이 보고되어, 공배양을 하는 것에 의한 소 초기배의 체외배양이 가능하게 되었다. 그러나, 공배양에 이용되는 체세포의 종류와 초기배의 발생과의 관계, 어떠한 기구에 의해 발생이 촉진되어지는 것인가에 대해서는 대부분이 명확하지 않고, 이 해명이 계속하여 되어지고 있는 것이 현재의 상태이다.

한편, 소 초기배의 배양에는 일반적으로 소 태아 혈청이 배양액에 첨가되어지고 있다. 혈청 중에는 약 3.8 g/100 ml에 다량의 단백질이 포함되어 있다(黒田, 1984). 이 단백질의 대부분은 알부민과 글로불린이다. 그러나 혈청 중에는 다양한 종류의 호르몬 같은 물질과 미량이지만 각종의 성장인자가 포함되어 있다. 또 지질, 각종 아미노산, 당, 비타민, 무기염 등의 저분자 물질도 혈청 중에는 다량으로 존재한다. 따라서 공배양에 의한 발생촉진기구를 해명하기 위해서는 혈청을 제거한 성분이 파악된 무혈청배지를 이용할 필요가 있다. 또한 성분이 파악된 배지를 이용하는 것에 의해 혈청의 Lot간 변동의 문제를 극복하는 것이 가능하다. 그 위에 혈청 중에 포함된 호르몬 등 각종 물질이 배발생에 미치는 영향에 대한 검토를 할 경우에는 성분이

파악된 배지를 이용하는 것에 의해 그 효과를 명료하게 그리고 재현성이 높은 판정을 내리는 것이 가능하다.

최근 이러한 단순배지를 이용하여 난포란의 배발생에 미치는 다양한 성장인자의 효과를 검토하고 있다(Pinyopummintr와 Bavister, 1991; Roseckrans와 First, 1991; Seidel 등, 1991). 또한 이러한 성장인자는 착상전의 배와 생식기관에서 생산되는 것이 밝혀져 있고(Watson 등, 1992; Werb, 1990), 배발생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 폴리펩타이드인 상피성장인자(epidermal growth factor; EGF)는 mouse 초기배의 발생에 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며(Wood와 Kaye 등, 1989), 무혈청 배지에서 체세포를 배양할 때, ITS(insulin, transferrin, selenium의 혼합물질)를 첨가하는 것에 의하여 세포의 증식이 인정되었고(Barnes와 Sato, 1980; Bottenstein과 Sato, 1979), 소 초기배의 공배양에 있어서도 ITS의 첨가에 의하여 배반포배 발생이 가능했다고 보고하고 있다(Ellingston 등, 1990b).

이상에서 논한 것처럼 소 초기배에 있어서 공배양에 의한 발생촉진작용의 기구해명 및 세포성장인자와 배발생과의 관계에 대하여 무혈청 또는 혈청배지를 이용하여 조사한 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 체외성숙

도축된 한우로부터 난소를 회수하여 25℃의 생리식염수 중에 넣어 회수후 4시간 이내에 실험실로 옮겼다. 난소 주변에 부착된 혈액과 이물질을 75%의 에탄올로 제거한 후, 20G의 주사침이 부착된 10 ml의 주사기로 직경 2~6 mm의 난포로부터 난포액과 난포란을 채취하여 15 ml 원심관에 넣고 5분간, 38℃중에 방치하였다. 5분간 방치후 침전된 부분만을 시계접시에 옮겨 PBS+BSA(3 mg/ml)로 희석한 다음, 실험현미경하에서 세포질이 균질하고, 3층 이상의 난구세포가 부착된 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란을 PBS+BSA(3 mg/ml)와 성숙배지(TCM-199+10% 소난포액)로 각각 3회씩 세척하였다. 세척한 난포란을 미네랄 오일하에 제작한 200 μ l의 성숙배지에 30개씩 넣어 22~24시간 동안, 39℃, 5% CO₂ 중에서 성숙배양을 실시하였다.

2. 체외수정

한우 동결정액을 38℃의 온수에 넣어 용해후 15 ml의 원심관에 넣고 10 mM의 caffeine과 20 µg/ml의 heparin를 첨가한 m-Tyrode's(BSA-free B.O.)액으로 2회 원심세척을 실시하였다(500 g, 5분). 원심세척후, 상층액을 제거후 BSA-free B.O.액과 BSA(20 mg/ml)를 첨가한 m-Tyrode's를 동량 첨가하여 정자의 최종농도가 2×10^6 /ml로 되도록 혼합 조정하였다. 배양접시에 100µl의 정자 현탁액을 제작한 후 탄산가스 평형시킨 미네랄 오일로 덮어 30분간 전배양을 실시하였다. 성숙배양시킨 난포란을 BSA(10 mg/ml)를 첨가한 m-Tyrode's로 3회 세척후 정자 현탁액 중에 5~10개씩 넣어 수정을 행하였다. 수정후 6시간에 난포란의 주변에 부착된 정자와 난구세포를 유리피펫으로 제거하여 다양하게 준비한 배발생 배지에 옮겨 수정후 8일까지 배양하고 배반포배의 발생 또는 발생한 배반포배의 세포수를 염색하여 관찰하였다.

3. 체외발생

1) 실험 1

수정시킨 난포란을 TCM-199에 ITS(0.1, 0.5, 1.0 µg/ml)와 5% 송아지 혈청(calf serum, CS)을 첨가한 배지 중에 수정후 48시간까지 배양후, ITS-free의 동일배지로 준비한 난구/과립막세포(2×10^6 /ml)로 제작 준비한 단층에 옮겨 수정후 8일까지 배양하여, ITS가 초기배의 발생 중에 미치는 효과를 조사하기 위해 배반포배 발생률과 배반포배의 세포수를 계산하기 위해 basic fuchsin으로 염색하여 도립현미경 하에서 관찰하였다(Byun 등, 1991).

2) 실험 2

수정시킨 난포란을 ITS(0.1, 0.5, 1.0 µg/ml)와 5% CS를 첨가한 TCM-199 배지로 30시간 배양하여 준비한 난구/과립막세포의 단층에 옮겨 수정후 48시간까지 배양하였다. 그 후에는 ITS-free의 TCM-199 +5% CS로 준비한 단층에 옮겨 수정후 8일까지 배양하여, ITS가 첨가된 배지로 배양한 체세포가 초기배의 배발생에 미치는 효과를 관찰하였다.

3) 실험 3

EGF가 수정된 난포란의 발생에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 TCM-199에 EGF(10, 50, 100 ng/ml) 단독 또는 EGF와 5% CS를 첨가한 배지중에 수정후 8일까지 배양하고 배반포배의 발생률과 배반포배의 세포수를 계산하였다.

4) 실험 4

수정시킨 난포란을 EGF와 CS를 첨가한 TCM-199로 30시간동안 배양준비한 난구/과립막세포의 단층에 옮겨 수정후 8일까지 배양하고 배반포배의 발생률과 발생된 배반포배의 세포수를 계산하여 EGF가 첨가된 배지로 준비한 체세포가 난포란의 발생에 미치는 효과를 관찰하였다.

4. 통계학적 분석

본 실험의 통계처리는 동일 실험을 5회 이상 반복하고, 그 결과를 종합하여 분산분석(ANOVA)과 Fisher의 protected least significant difference(PLSD) test로 실시하였다.

III. 결 과

1. 실험 1

수정후 48시간 동안 배양액 중에 ITS의 첨가 유무에 관계없이 배반포배의 발생률은 유사하였으며(19.5±1.6~25.1±1.7%, Table 1), 배반포배의 세포수에 있어서도 81.7±7.7~86.7±7.8개로 동일하였다.

2. 실험 2

수정후 난포란을 ITS와 CS가 첨가된 배지로 준비한 난구/과립막세포의 단층에서 수정후 48시간 동안 배양하고 ITS-free로 준비한 단층에서 계속하여 배양한 결과, 배반포배의 발생률에 있어서 12.0~32.3%, 11.1~25.0%, 7.4~39.4%와 7.7~29.0%(0, 0.1, 0.5와 1.0 µg/ml)로 차이가 인정되지 않았다(Table 2).

3. 실험 3

수정후 난포란을 발생배지에 EGF 단독 또는 5% CS와 함께 배양한 결과, EGF를 단독으로 첨가한 경우에 있어서 배반포배 발생률이 전체적으로 낮아 9%,

Table 1. Effect of ITS concentrations in the development medium with calf serum *in vitro* development of bovine follicular oocytes

Conditions of culture	No. of oocytes cultured	No. (%) of blastocyst	Cell number of blastocyst(n)	Range of cell number
5% CS	129	29(19.5±1.6)	81.7±7.7(23)	30~198
5% CS+				
ITS(0.1 µg/ml)	126	34(25.1±1.7)	86.7±7.8(23)	32~162
ITS(0.5 µg/ml)	119	28(21.7±4.9)	83.2±7.8(25)	37~217
ITS(1.0 µg/ml)	129	24(20.0±4.6)	82.8±7.7(19)	37~174

Table 2. Effect of ITS concentration in the development medium on *in vitro* development of bovine follicular oocyte cultured with monolayer of cumulus/granulosa cells

Conditions of culture	No. of oocytes cultured	No. (%) of blastocyst	Range(%) of blastocyst
5% CS+CG*	233	50(21.9±2.9)	12.0~32.3
5% CS+CG+			
ITS(0.1 µg/ml)	216	43(19.7±2.2)	11.1~25.0
ITS(0.5 µg/ml)	214	43(19.4±3.8)	7.4~39.4
ITS(1.0 µg/ml)	199	37(18.2±3.0)	7.7~29.0

*Cumulus /granulosa cells.

Table 3. Effect of EGF and with or without calf serum addition to the culture medium on *in vitro* development of bovine follicular oocytes

Conditions of culture	No. of oocytes cultured	No. (%) of blastocyst	Cell number of blastocyst(n)	Range of cell number
TCM-199	100	1(1.0±1.0) ^a	84.0± 0.0(1)	84
EGF(10 ng/ml)	100	9(9.0±0.0) ^b	127.8±17.9(5)	82~188
EGF(50 ng/ml)	100	9(9.0±0.0) ^b	139.3±29.4(3)	81~176
EGF(100 ng/ml)	100	8(8.0±0.0) ^b	141.1±18.9(7)	81~212
TCM-199+5% CS	400	78(22.1±2.1) ^a	114.7± 5.0(38) ^a	95~199
TCM-199+5% CS+				
EGF(10 ng/ml)	400	93(24.0±2.8)	113.6± 5.5(38) ^a	95~140
EGF(50 ng/ml)	400	100(25.0±1.6)	154.8±12.0(38) ^b	110~223
EGF(100 ng/ml)	430	111(29.2±1.7) ^b	168.1±12.4(38) ^b	110~268

^{a,b} Values with different superscripts are significantly different (p<0.05).

9% 그리고 8%(10, 50, 100 ng/ml) 였으나 EGF-free 1%에 비하여 발생율이 높게 관찰되었다(p<0.05, Table 3).

배반포배의 세포수에 있어서도 EGF가 첨가된 배지 중에서 배양한 배가 81~212개로 EGF-free의 84개에 비하여 역시 높았다.

한편 EGF와 혈청을 동시에 첨가한 경우, 배반포배의 발생율은 EGF 단독첨가보다 증가하였으며, 그 첨가 농도에 따라 증가하는 경향이 보여, 100 ng/ml은 29.2±1.7%로 대조구의 22.1±2.1%에 비하여 높은 배발생율이 관찰되었다(p<0.05). 또한 배반포배의 세포수에 있어서도 EGF-free의 114.7±5.0와 비교해

Table 4. Effect of EGF concentration in the development medium on *in vitro* development of bovine follicular oocyte cultured with monolayer of cumulus/granulosa cells

Conditions of culture	No. of oocytes cultured	No. (%) of blastocyst	Cell number of blastocyst(n)	Range of cell number
5% CS+CG*	116	23(19.6±2.3)	136.8±11.1(10)	79~194
5% CS+CG+ EGF(10ng/ml)	117	24(20.2±2.2)	145.4±13.7(11)	98~214
EGF(50ng/ml)	122	34(26.8±4.0)	126.8±14.6(10)	81~213
EGF(100ng/ml)	107	25(23.2±3.0)	119.6±16.7(9)	60~171

*Cumulus /granulosa cells.

유의하게 높은 168.1±12.4개였다($p < 0.05$).

4. 실험 4

수정된 난포란을 EGF와 CS가 첨가된 TCM-199로 배양준비한 난구/과립막세포 단층에서 배양한 결과 배반포배의 발생을 및 배반포배의 세포수가 19.6±2.3~23.2±3.0%와 119.6±16.7~145.4±13.7개로 EGF 첨가 유무와 농도간의 차이가 인정되지 않았다 (Table 4).

IV. 고 찰

본 연구에서는 ITS 와 EGF가 체외성숙, 수정한 소 난포란의 체외발생에 미치는 효과에 대하여 검토하였다.

배발생 배지에 첨가한 ITS의 효과실험에서 얻은 결과는 Seidel 등(1991)과 Takagi 등(1991)이 소에서, 그리고 Colver 등 (1991)이 mouse에서 보고한 결과와 유사하였다. 한편 다른 체세포에 있어서는 ITS가 첨가된 배지에서는 증식하였으나, 대부분의 초기배의 발생에 있어서는 그 효과가 인정되지 않았다. 실험 2에서 ITS와 CS를 첨가한 배지로 난구/과립막세포를 30시간 배양하여 준비한 단층으로 수정시킨 난포란의 배반포배의 발생을 관찰하였으나, ITS-free의 배지로 준비한 난구/과립막세포와 그 차이가 인정되지 않았다. ITS는 insulin, transferrin과 selenium를 혼합한 것으로써, Alloworth과 Albertini 등(1993)은 소 난포란의 체외성숙 배지에 ITS를 첨가했을 때 난구세포의 확산과 핵성숙에 있어서 대조구(ITS-free) 또는 혈청만을 첨가한 구와 차이가 없었다고 보

고하였다. 그리고 Shamsuddin 등(1994)은 소 초기 배의 발생배지에 ITS와 BSA를 첨가했을 때, BSA 단독 첨가구보다는 배반포배의 발생율이 높았으나, 발정중의 혈청 또는 소 난관 상피세포와 공배양한 초기 배의 발생율에는 차이가 인정되지 않았다고 보고하였다. 그러나 무혈청 배지를 이용한 체세포의 배양에 있어서, insulin, transferrin 과 selenium을 각각 또는 혼합하여 첨가하는 것에 의해 세포의 증식이 이루어졌다고 보고하였으며(Kawada 등, 1990), Flood 등 (1993)이 체외성숙, 수정시킨 소 난포란의 무혈청배지의 배양에 있어서 transferrin의 단독으로는 배반포배의 발생이 혈청을 첨가한 대조구와 유사하였다고 보고한 것처럼 insulin, transferrin 과 selenium를 각각 첨가했을 때는 그 효과가 없었으나, 혼합하여 첨가하는 것에 의하여 배반포배의 발생이 촉진되었다고 보고하고 있다(Ellington 등, 1990a; Ellington 등, 1990b; Kim 등, 1990).

본 실험의 결과에 있어서는 ITS+CS의 직접 또는 ITS+CS로 준비한 체세포가 수정한 소 난포란의 체외 발생에 있어서 CS만을 첨가한 구와 차이가 인정되지 않았다. 이 결과는 Carney 와 Foote(1991)가 medium RD(RPMI-1640 과 Dulbecco's MEM, 1:1 v/v)에 ITS를 5 µg/ml 첨가한 배지로 토끼의 1세 포기 배의 배발생에 있어 다른 조건하에서 배양한 배와 차이가 인정되지 않았다고 보고하고 있는 것과 유사하며, Flood 등(1993)은 transferrin은 체세포의 증식에는 요구되나 초기배의 발생에는 요구되지 않는다고 하였다. 이것은 아마도 발생배지에 혈청을 첨가하는 것에 의해 ITS의 효과가 상쇄되었으며, 이는 혈청중에 포함된 미지의 성분이 배발생의 작용에 ITS

와 유사한 효과가 있기 때문인 것으로 추측된다. 또한 체세포의 준비에 있어서 혈청을 첨가하는 것만으로도 초기배의 발생을 돕는 물질이 충분하게 분비되었기 때문이며, ITS+CS가 체세포의 증식에는 관여하지만 이 과정 중에 분비되는 물질이 배발생에 미치는 효과는 없는 것으로 생각되어, ITS를 첨가하는 조건, 즉 배지의 종류, 혈청의 첨가유무 및 체세포의 존재 유무에 따라 다르게 나타날 수 있다고 생각된다.

EGF를 무혈청 배지 또는 CS와 함께 첨가하는 것에 의하여 수정한 소 난포란의 배반포 발생을 및 배반포배의 세포수가 증가하는 경향이 관찰되었다. 이것은 아마도 mouse(Colver 등, 1991; Paria와 Dey 1990)와 돼지(Corps 등, 1990)에서 보고한 것처럼, 배의 영양막세포에 결합하여 포배강의 형성을 자극하기 때문이라고 생각된다. 또한 Paria와 Dey(1990)은 EGF가 첨가된 배지 중에서 배양한 배의 세포수가 증가하는 것은 EGF가 배의 영양막세포의 증식에 작용하기 때문이라고 보고하였다. 본 실험의 결과에 있어서도 혈청의 첨가 유무에 관계없이 EGF가 첨가된 배지에서 배양한 초기배의 세포수가 유의하게 높은 것이 관찰되었다(실험 3). Yang 등 (1993)도 체외성숙, 수정된 2~8세포기의 소 초기배의 체외배양에 있어 혈청 또는 BSA가 첨가된 기초배지에 EGF를 10~100 ng/ml를 첨가하는 것에 의하여 배반포배의 발생율이 증가하였다고 보고하였다.

폴리펩타이드 성장인자인 EGF는 세포표면에 결합하는 것에 의해 그 생물학적인 효과가 발휘된다고 인정되고 있다. 이러한 작용은 세포내의 핵산과 단백질 합성의 증가에 있어 2차적인 전달체로서 작용한다. 이러한 EGF의 증거로서, 상피세포와 중배엽에서 유래된 세포의 유사분열 촉진물질로 작용하는 것과, mouse의 착상전 배에 존재하는 것이 확인된 것 등이다(Wood와 Kaye, 1989). 또한 혈청 중에 1.2~8 ng/ml, 난포액에도 동물종에 따라 다르나 2~15 ng/ml의 EGF가 포함되어 있다고 보고하고 있으며(Das 등, 1992; Hsu 등, 1987; Westergaard와 Andersen, 1989), 이것은 난포의 성장과 분화에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며(Roy, 1993a), 한편 EGF는 초기배의 발생뿐만 아니라 많은 종의 난포란의 체외성숙에 있어서 그 작용이 인정되어져 있다(Ding과 Foxcroft, 1994; Gomez 등, 1993; Keefer

등, 1994). 그러나 Keefer 등(1994)은 EGF가 첨가된 CR1배지 중에서 2세포기 배 또는 8세포기 배의 소 초기배를 배양했을 때, 배반포배의 부화율은 증가되었으나, 배반포배의 발생율과 그 세포수에 있어서는 효과가 인정되지 않았다고 보고하였다. 이들은 이에 대하여, 아마도 동물종과 실험방법에 기인되며, 초기배의 유래에 따라 배의 표면에 존재하는 EGF의 receptors 수가 다르기 때문이라고 보고하고 있다. 이와 비슷한 결과가 난구/과립막세포의 단층을 EGF와 CS가 첨가된 배지로 배양준비하여 수정된 소 난포란을 배양한 실험 4에서 관찰되었다. 또한 Im 과 Park (1995)도 체외성숙, 수정한 소 난포란을 10% 혈청과 10~50 ng/ml의 EGF를 첨가한 배지로 준비한 과립막세포의 단층에서 배양하였을 때, EGF의 첨가 유무와 농도간의 차이가 인정되지 않았다고 보고하였다. 이것은 아마도 체세포의 체외배양에는 혈청중에 포함된 EGF 농도 만으로도 난구/과립막세포의 증식에 미치는 EGF의 작용이 충분하기 때문이다. 바꿔서 말하면, 체세포로부터 분비되는 것으로 알려진 배발생 촉진인자의 분비자극은 혈청 중의 EGF로 만으로도 충분할 것이다.

결론적으로, ITS를 체외성숙, 수정한 소 난포란의 체외발생을 위한 배양액에 혈청과 함께 첨가하는 경우, 그 유용한 작용은 인정되지 않았으나, EGF와 혈청을 함께 첨가하는 것에 의해 난포란의 배반포배의 발생율과 배반포배의 세포수가 촉진되었다. 그러나 난구/과립막세포가 존재하는 것에 의해 그 영향이 감소되었다.

V. 적 요

본 연구는 혈청이 첨가 또는 무첨가 된 배지에서 ITS와 EGF의 첨가수준이 체외성숙, 수정된 난포란의 배발생율과 배반포의 세포수에 미치는 효과를 규명하기 위해 실시하였다.

수정된 난자를 0, 0.1, 0.5 그리고 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ITS와 5% 혈청이 첨가된 TCM-199에 배양했을 때, 배반포배의 발생율과 배반포배의 세포수에는 ITS의 무첨가 또는 첨가 농도간에 따라 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다. 또한 혈청과 ITS가 첨가된 TCM-199 배지로 배양된 난구/과립막 세포의 단층 역시 배

반포배의 발생에는 유용한 효과가 없었다. 반면에 EGF가 첨가된 TCM-199 배지에 있어서 배발생율과 배반포배의 세포수는 혈청의 존재 여부와 관계없이 무첨가 배지에 비해 유의적인 차이로 증가하였다. 그러나 혈청과 EGF가 첨가된 TCM-199 배지로 배양된 난구/과립막 세포의 단층에서 수정을 한 난포란을 배양했을 때, 배반포의 발생율과 배반포배의 세포수는 EGF의 첨가수준에 따라 차이가 없었다.

본 연구를 요약하면, ITS와 EGF는 난포란을 혈청과 난구/과립막 세포와 공배양할 때 체외성숙, 수정된 소 난포란의 배발생에 영향을 주지 못한다는 것이 인정되었다.

VI. 인용문헌

1. Alloworth, A. E. and D. F. Albertini. 1993. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev. Biol.*, 158: 101-112.
2. Barnes, F. L. and G. Sato. 1980. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Analytical. Biochem.*, 102:255-270.
3. Boland, M. P. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 21:126-137.
4. Bottenstein, J. E. and G. H. Sato. 1979. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)*., 76:514-517.
5. Byun, T. H., S. H. Lee and H. B. Song. 1991. Development of a rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animals. *Korean. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
6. Carney, E. W. and R. H. Foote. 1991. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J. Reprod. Fert.*, 91:113-123.
7. Colver, R. M., A. M. Howe., P. G. McDonough and J. Boldt. 1991. Influence of growth factors in defined culture medium on *in vitro* development of mouse embryos. *Fertil. Steril.*, 55:194-199.
8. Corps, A. N., D. R. Brigstock., C. J. Littlewood and K. D. Brown. 1990. Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on preimplantation trophoderm of the pig. *Development*, 110:221-227.
9. Das, K., W. R. Phipps., H. C. Bryzski and G. E. Tagatz. 1992. Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation *in vitro*. *Fert. Steril.*, 57:895-901.
10. Davis, D. L. and B. N. Day. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 45:1043-1053.
11. Ding, J. and G. R. Foxcroft. 1994. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
12. Ellington, J. E., P. B. Farrell and R. H. Foote. 1990a. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube(oviduct) epithelial cell co-culture versus *in vivo* development in the cow. *Theriogenology*, 34:837-844.
13. Ellington, J. E., P. B. Farrell., M. E. Simkin., R. H. Foote., E. E. Goldman and A. B. McGrath. 1990b. 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.
14. Eyestone, W. H., M. L. Leibfried-Lutledge., D. L. Northy., B. G. Gilligan and N. L. First. 1987. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*, 28:1-7.
15. Flood, M. R., T. L. Gage and T. D. Bunch.

1993. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology*, 39: 823-833.
16. Gomez, E., J. J. Tarin and A. Pellicer. 1993. Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.*, 60:40-46.
 17. Hsu, C. J., S. D. Holmes and J. M. Hammond. 1987. Ovarian epidermal growth factor activity, concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Bioche. Biophys. Res. Commun.*, 147:242-247.
 18. Im, K. S. and K. W. Park. 1995. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 44:209-216.
 19. Kawada, H., J. M. Shannon and R. J. Mason. 1990. Improved maintenance of adult rat alveolar type II cell differentiation *in vitro*: Effect of serum-free, hormonally defined medium and a reconstituted basement membrane. *American J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 3:33-43.
 20. Keefer, C. L., S. L. Stice., A. M. Paprocki and P. Golueke. 1994. *In vitro* culture of bovine IVM-IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*, 41:1323-1331.
 21. Kim, C. I., J. E. Ellington and R. H. Foote. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM-199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33:433-440.
 22. Kobayashi, K., S. Yamashita and H. Hoshi. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Fertil.*, 100:439-446
 23. Paria, B. C. and S. K. Dey. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 87:4756-4760.
 24. Pinyopummintr, T. and D. B. Bavister. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
 25. Rosenkrans, C. F. and N. L. First. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35:266(abstr).
 26. Roy, S. K. 1993a. Transforming growth factor- β potentiation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral follicles in mediated by a latent induction of epidermal growth factor. *Biol. Reprod.*, 48:558-563.
 27. Seidel, G., W. Nauta and S. E. Olsen. 1991. Effects of myoinositol, transferrin, and insulin on culture of bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, 69(suppl 1):403(abstr).
 28. Shamsuddin, M., B. Larsson., H. Gustafsson and H. Rodriguez-Martinez. 1994. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology*, 41:1033-1043.
 29. Takagi, Y., K. Mori., M. Tomozawa., T. Takahashi., S. Sugawara and J. Masaki. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*, 35:1197-1207.
 30. Tervit, H. R., D. G. Whittingham and L. E. A. Rowson. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497
 31. Watson, A. J., A. Hogan., A. Hahnel., K. E. Wiemer and G. A. Schultz. 1992. Expression

- of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 31:87-95.
32. Werb, Z. 1990, Expression of EGF and TGF- α genes in early mammalian development. *Mol. Reprod. Dev.*, 27:10-15.
33. Westergaard, L. G. and Y. Andersen. 1989. Epidermal growth factor(EGF) in human preovulatory follicles. *Hum. Reprod.*, 4:257-260.
34. Willadsen, S. M. and C. Polge. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Record.*, 108:211-213.
35. Wood, S. A. and P. L. Kaye. 1989. Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 85: 575-582.
36. Wright, R. W., G. B. Anderson, P. T. Cupps and M. Drost. 1976. Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 14:157-162.
37. Yanagimach, R. and M. C. Chang. 1964. *In vitro* fertilization of golden hamster ova. *J. Exp. Zool.*, 156:361-376.
38. Yang, B. K., X. Yang and R. H. Foote. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes *Theriogenology*, 40:521-530.
39. 黒田, 1984. 細胞成長因子, 朝倉書店 日本, p 217. (접수일자 : 1998. 2. 20. /채택일자 : 1998. 3. 20.)