

돼지 난관액과 Oviductal Conditioned Medium이 다정자침입과 체외배발달에 미치는 영향

문승주 · 김재홍 · 나진수
전남대학교 동물자원학부

Effect of Oviductal Fluid and Oviductal Conditioned Medium on Polyspermy and *In Vitro* Development of Porcine Oocytes

Moon, S. J., J. H. Kim and J. S. Na

Department of Animal Science, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

SUMMARY

The objective of this study was to determine the effects of oviductal fluid and oviductal conditioned medium on polyspermy and *in vitro* development of porcine oocytes. The addition of oviductal fluid and oviductal conditioned medium in the prefertilization and fertilization medium significantly decreased polyspermy rates and the mean number of spermatozoa in penetrated eggs ($P < 0.05$). The acrosome reaction rate significantly increased when spermatozoa were exposed for 1.5, 3, 4.5h in oviductal fluid and oviductal conditioned medium ($P < 0.05$). When oocytes cultured for 192h, the percentage of oocytes that developed to the morula and blastocyst stage was higher in culture medium with oviductal fluid and oviductal conditioned medium than without oviductal fluid and oviductal conditioned medium ($P < 0.05$). These results indicated that the oviductal secretions will effectively reduce both the polyspermy rates and the mean number of spermatozoa in penetrated eggs. And the presence of culture with oviductal fluid and oviductal conditioned medium promotes *in vitro* development of porcine oocytes.

(Key Word : Oviductal fluid, Oviductal conditioned medium, Polyspermy, Porcine, Oocytes)

I. 서 론

체외수정기술은 번식효율의 극대화 및 효율적인 유전능력개량을 위해서 그 이용성이 요청되고 있다. 근래 돼지 미성숙난포란의 체외성숙, 정자의 수정능획득, 체외수정 및 체외수정란의 배양체계(Hamano 등, 1989; Yoshida, 1989; Beckmann 등, 1990; Nagai와 Moor, 1990; Wang 등, 1991; Reed 등, 1992; Kim 등, 1996) 등에 대한 많은 연구가 있었지만, 돼지

체외수정시 높은 다정자 침입율(Nagai 등, 1984; Funahashi와 Day, 1993; Kano 등, 1994)과 효과적인 정자의 수정능획득 유기방법 그리고 4세포기 난할 단계에서 많이 관찰되어지고 있는 체외발생능 정지현상(Jarrel 등, 1991; Schoenbeck 등, 1992) 등이 큰 문제로 지적되고 있다. 다정자 침입은 부적절한 표층반응과 수정부위에 도달하는 과도한 수의 정자에 기인하는 것으로 알려지고 있는데(Hunter, 1991), 다정자 침입을 줄일 수 있는 방법으로는 수정능획득 배양액내 난관상피세포와 난포액을 첨가한 정자와의 공배양

* 본 연구는 1996년도 전남대학교 학술진흥재단의 연구비 지원으로 수행되었음.

(Nagai와 Moor, 1990; Funahashi와 Day, 1993), 정자의 수정능 획득 유기방법으로는 난포액(Funahashi와 Day, 1993), heparin(Parrish 등, 1986), 난관액(Parrish 등, 1989), 그리고 난관상피세포와의 공배양(Nagai와 Moor, 1990), 체외발생능 정지현상을 극복할 수 있는 방법으로는 배양액내 성장촉진인자, 아미노산 및 비타민의 첨가(Kano 등, 1994; Heyner 등, 1993; Thibodeaux 등, 1993; Meyen 등, 1989)와 난관액 첨가(Anthony 등, 1989), 난관상피세포 등과 같은 체세포와의 공배양(Gandolfi와 Moor, 1987; White 등, 1989; Goto 등, 1992) 등 다양한 방법들이 보고되고 있다. 이와 같이 난관상피세포와 같은 난관 유래물질과 공배양하여 다정자침입율을 낮추고 체외 발달배양시 배발달율을 높일 수 있는 것은 glycosaminoglycan(GAG)이라는 물질에 기인하는 것으로 알려지고 있다(Parrish, 1989, 1994). 따라서 본 연구는 발정기 돼지에서 채취한 난관액과 oviductal conditioned medium(OVCM)이 다정자침입, 정자의 침체반응 및 체외발달에 미치는 효과를 규명 돼지체외수정란의 효과적인 생산과 이용방안을 제시하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난관액의 채취

난관액은 발정기 돼지로 부터 채취하였다. 즉, 발정 당일 마취 개복수술하여 난관에 도관(내경: 1.25mm, 외경: 2.25mm)을 삽입 고정하고 암돼지의 옆구리를 뚫어 도관의 다른 한쪽 끝을 체외로 빼낸 다음 10ml cornical tube를 부착 12시간 간격으로 난관액을 채취하였다. 채취한 난관액은 원심분리(1,000g/10분)후 상층액만 여과 동결보존 사용하였다.

2. Oviductal conditioned medium(OVCM)의 준비

OVCM은 발정기 암돼지의 난관을 채취 난관내벽이 보이도록 절개하고 길이 3-4mm정도씩 자른 다음 petri dish에 배양액(TCM-199) 5ml에 자른 난관 10조각 정도씩 넣고 epidermal growth factor(25ng/ml)를 넣은 다음 CO₂배양기내에서 배양하였다. 16~18시간 배양후 2ml의 신선한 배양액을 보충 24시간 배양한

후 원심분리(2,000g/30분)하여 상층액만 여과 동결보존 사용하였다(Anderson과 Killian, 1994).

3. 체외성숙

미성숙난포란의 체외성숙배양은 BSA(Sigma, USA)가 첨가되지 않은 Whitten's배양액에 10% 돼지 난포액과 10IU/ml HCG와 PMSG를 첨가 0.2μm syringe filter로 여과한 후 4-well dish에 500μl씩 분주 mineral oil(Sigma, USA)로 피복한 다음 각 well당 난구세포가 치밀하게 부착된 미성숙난포란을 50개씩 옮겨 CO₂ 배양기(39℃, 5% CO₂)에서 20시간 배양한 후 호르몬이 첨가되지 않은 배양액에 옮겨 총 40시간 배양 체외성숙을 유도하였다(Funahashi와 Day, 1993).

4. 정자의 준비

수압법으로 정액을 채취한 후 20℃에서 16시간동안 보존하여 사용하였다. 정액 5ml와 동량의 BSA-saline을 혼합 200g에서 3분간 원심분리후 상층액 5ml와 동량의 BSA-saline을 혼합 1,200g에서 3분간 2~3회 원심분리하였다. 원심분리후 TCM-199에 0.4% BSA를 첨가 pH 7.8로 조정된 수정능 획득 배양액과 혼합하여, 정자수가 2×10⁸/ml가 되도록 조절한 후 CO₂ 배양기(39℃, 5% CO₂)에서 90분간 배양수정에 대비하였다.

5. 체외수정

미성숙난포란을 40시간동안 체외성숙유도 후 TCM-199에 0.4% BSA와 10mM caffeine sodium benzonate를 첨가 pH 7.4로 조절된 체외수정용 배양액 50μl에 난자를 10개씩 배치하고 정자의 최종농도가 1×10⁶/ml가 되도록 조절 체외수정을 유도하였다. 정자주입후 6시간동안 CO₂ 배양기(39℃, 5% CO₂)에서 배양하고 체외발달 배양액(TCM-199)에 옮겨 배양, 난자내 정자침입율, 다정자 침입율 등을 조사하였다.

6. 정자침입율조사

배양후 난자는 acetic acid와 ethanol을 1 : 3으로 혼합한 용액에 48시간 이상 고정시킨 후 1% orcein, 45% acetic acid로 염색, 위상차현미경하에서 정자의 난자내 침입, 응성전핵형성을 등을 조사하였다. 난자내

정자와 음성전핵이 관찰되면 정자의 침입이 이루어졌다고 판단하고 하나이상의 정자와 음성전핵이 관찰되면 다정자침입으로 간주하였다.

7. 정자의 침체반응 조사

CTC(chloridetetracycline) 염색방법으로 정자를 염색 정자의 침체반응을 조사하였다(Wang 등, 1991). 즉, 정액을 3% PVP용액과 혼합, 원심분리(500g/6분)후 45 μ l CTC염색용액과 동량의 세척된 정액을 혼합 알루미늄호일로 빛을 차단하고 여기에 다시 8 μ l의 CTC고정액과 혼합하고, CTC염색용액과 고정액이 혼합된 정액을 slide에 취하고 DABCO(Sigma) 한방울과 잘 혼합하여 형광현미경하에서 정자 두부를 관찰 침체반응을 조사하였다.

8. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과의 통계분석은 분산분석(ANOVA)과 χ^2 검정방법으로 실시하였으며 비율로 표시한 성적은 arcsin변환후 통계분석을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 다정자침입과 침체반응에 미치는 영향

수정능획득배양액에 난관액을 각각 1%와 10%첨가 90분간 정자와 공배양한 후 체외수정 결과는 Table 1에 제시한 바와 같다. 대조구의 정자침입율은 92.3%, 난관액을 1%와 10%첨가한 구에서는 각각 76.5%와 52.8%로 첨가구에서 유의적으로 낮게 나타났으며($P < 0.05$), 첨가농도에 따라서도 유의적인 차이를 보였다. 그러나 다정자 침입비율은 10%와 1% 첨가구에서 각각 39.5%와 57.7%로 대조구의 71.7%에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$). 또한 난자내 침입한 평균정자수도 처리구에서 유의적으로 낮았다($P < 0.05$). Table 2는 정자를 OVCM과 공배양한후 체외수정결과를 제시하고 있는데 대조구의 정자침입율이 96.0%로 83.3%인 처리구에 비하여 유의적으로 높았지만($P < 0.05$), 다정자침입율과 난자내 평균정자 침입수는 처리구에서 각각 52.9%와 2.3개로 대조구의 76.4%와 6.4개에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다. 포유동물에서 다정자침입현상은 빈번히 일어나고 있는

Table 1. Effect of coculturing spermatozoa with oviductal fluid(OVF) on polyspermy in porcine oocytes matured *in vitro*

OVF concentration (%)	Number of oocytes examined	Number of oocytes penetrated(%)	Number of polyspermic oocytes(%)	Mean number of spermatozoa in penetrated oocytes	Number of oocytes that formed male pronucleus(%)
Control	65	60(92.3) ^a	43(71.7) ^a	5.8a	23(38.3)
1	68	52(76.5) ^b	30(57.7) ^b	2.7b	23(44.2)
10	72	38(52.8) ^c	15(39.5) ^c	1.8c	14(36.8)

^{abc} Different superscripts within columns denote significant difference($P < 0.05$).

Table 2. Effect of coculturing spermatozoa with on oviductal conditioned medium(OVCM) on polyspermy in porcine oocytes matured *in vitro*

Treatment	Number of oocytes examined	Number of oocytes penetrated(%)	Number of polyspermic oocytes(%)	Mean number of spermatozoa in penetrated oocytes	Number of oocytes that formed male pronucleus(%)
Control	75	72(96.0) ^a	55(76.4) ^a	6.4 ^a	24(33.3)
OVCM	84	70(83.3) ^b	37(52.9) ^b	2.3 ^b	26(37.1)

^{ab} Different superscripts within columns denote significant difference($P < 0.05$).

며 체외수정시 돼지에서 10%~29% 정도의 발생율을 보이고 있다(Hancock, 1959; Hunter, 1991). 다정자침입은 난자내 정자침입후 불완전한 표층과립반응과 난자 표면에 비정상적으로 많은 수의 정자가 부착되는데 기인(Day와 Polge, 1968; Hunter, 1990; Kim 등, 1996)하는 것으로 알려져 있는데 난관상피세포와 난관 유래물질이 비정상적으로 많은 수의 정자가 난자내에 침입하는 것은 조절하는 것으로 생각되어지고 있다(Hunter, 1991; Kim 등, 1996). Nagai와 Moor(1990)는 돼지 난관상피세포를 정자와 공배양한 후, 체외수정을 실시한 결과 다정자침입율이 유의적으로 낮았다($P < 0.05$)고 보고하고 있으며 Kano 등(1994)도 이와 유사한 결과를 보고하고 있다. 또한 Dubuc와 Sirard(1995)는 난관상피세포와 정자를 30분간 공배양시킨 결과 정자가 난관상피세포에 부착하는 현상이 관찰되었고, 이러한 현상이 많은 수의 정자가 난자내로 침입하는 것을 조절하여 다정자침입율을 낮추는 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서도 난관액과 OVCM을 정자와 공배양했을 때 다정자침입율이 유의적으로 낮았고 정자부착현상이 관찰되어 상기 연구자들의 결과와 일치하고 있다.

난관액과 OVCM의 정자침체반응에 대한 효과를 CTC염색방법으로 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 정자와 난관액 그리고 OVCM과 1.5시간 공배양후 침체반

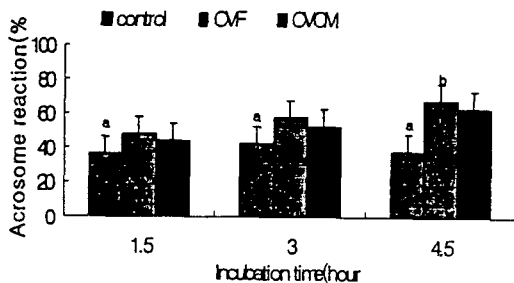


Fig. 1. Acrosome reaction of boar spermatozoa. Sperm were incubated in medium(TCM-199) alone, supplemented with oviductal fluid (OV, 10% v/v), and oviductal conditioned medium(OVCM). The bars are given as mean \pm SE from three replicates. Different letters denote significant differences ($P < 0.05$)

응은 대조구에서 36%, 난관액처리구에서 48%, OVCM처리구에서 44%를 보였지만, 공배양 4.5시간후의 침체반응은 처리구에서 63%~68%, 대조구에서 38%를 보여 공배양시간이 경과함에 따라 처리구와 대조구 사이의 침체반응 정도가 유의적으로 크게 나타났다 ($P < 0.05$). 침체반응에 대한 다른 연구자들의 결과를 보면 Parrish 등(1989)이 소 정자를 난관액과 공배양 후 침체반응에 대한 난관액의 효과를 조사한 결과 공배양 4시간후 대조구에서 20% 처리구에서 80%로 공배양시간이 경과함에 따라 처리구에서 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다고 한 보고와 비교해 볼 때 본 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 또한 Anderson과 Killian(1994)이 소 OVCM과 정자와 4시간동안 공배양후 침체반응 조사결과 대조구에서 약 50% 처리구에서 약 20%로 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다는 결과와 본 연구결과 또한 유사한 결과를 보였다. 이와 같이 난관액과 OVCM이 정자의 침체반응에 영향을 주는 것은 이들에 다량 함유되어 있는 glycosaminoglycan(GAG)에 기인하는 것으로 알려져 있다(Lenz 등, 1982; Parrish 등, 1989; Nagai와 Moor, 1990; Hunter, 1991; Anderson과 Killian, 1994).

2. 체외발달에 미치는 영향

체외수정후 체외발달배양액(TCM-199)에 난관액(1%, 10% v/v)을 첨가한 구와 OVCM에 수정란을 배양한 성적은 Table 3 및 Table 4와 같다. 48시간 배양후 난할율은 대조구에서 43.6% 난관액 첨가구에서 각각 45.8%와 45.0%로 유의적인 차이가 없었지만 배양 192시간째 조사된 상실배와 배반포 배발달율은 대조구에서 20.5%와 9.3%였지만 처리구에서 25.3%와 28.6% 그리고 13.0%와 19.3%로 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 또한 OVCM에서 48시간 배양후 난할율은 45.5% 대조구에서 40.1%로 유의적인 차이가 없었으며, 난관액 첨가구와 마찬가지로 192시간 배양후 상실배와 배반포배발달율이 OVCM에서 23.6%와 18.4%로 17.5%와 10.5%의 발달율이 보인 대조구에 비하여 유의적으로 높은 배발달율을 보였다($P < 0.05$). White 등(1989)은 인공수정 1~3일후 채란한 돼지수정란을 난관상피세포와 공배양했을 때 배반포배발달율이 70%로 DMEM단독배양시 16%보다 유의적으로

Table 3. Effect of oviductal fluid(OVF) on *in vitro* development of porcine oocytes

OVF concentration (%)	Number of oocytes examined	Number of embryos cleaved at 48h(%)	Number of embryos developed to the following stage				
			at 48h(%)			at 192h(%)	
			2 cell	4 cell	8 cell	Morula	Blastocyst
Control	346	151(43.6)	82(54.3)	59(39.3)	10(6.6)	31(20.5) ^a	15(9.9) ^a
1	306	140(45.8)	71(50.7)	58(41.4)	11(7.9)	40(28.6) ^b	27(19.3) ^b
10	342	154(45.0)	88(57.1)	57(37.0)	9(5.8)	39(25.3) ^b	20(13.0) ^{ab}

^{ab} Different superscripts within columns denote significant difference ($P < 0.05$).

Table 4. Effect of oviductal conditioned medium(OVCM) on *in vitro* development of porcine oocytes

Treatment	Number of oocytes examined	Number of embryos cleaved at 48h(%)	Number of embryos developed to the following stage				
			at 48h(%)			at 192h(%)	
			2 cell	4 cell	8 cell	Morula	Blastocyst
Control	142	57(40.1)	19(33.3)	26(45.6)	12(21.1)	10(17.5) ^a	6(10.5) ^a
OVCM	167	76(45.5)	28(36.8)	34(44.7)	14(18.4)	18(23.6) ^b	14(18.4) ^b

^{ab} Different superscripts within columns denote significant difference ($P < 0.05$).

높았다고 보고하였으며, Xu 등(1992)도 이와 유사한 결과를 보고하고 있다. Anthony 등(1989)의 체외발달배양액에 난관액첨가시험결과 난관액을 첨가했을 때 배발달율이 가장 높았고 Eyestone과 First(1989)는 소수정란을 OVCM에서 배양했을 때 상실배와 배반포배 발달율이 22%로 3%의 발달율을 보인 대조구에 비하여 높았다고 한 결과들과 본 연구결과와 비교하였을 때 매우 유사한 결과를 보였다. 이상의 결과를 종합해볼 때 난관액과 OVCM이 다정자 침입율과 정자의 침체반응 그리고 배발달에 효과적인 영향을 미치기 때문에 다정자 침입을 줄이고, 정자의 수정능획득과 체외발달율을 높히는등 효율적인 돼지 체외수정란 생산에 이바지할 수 있으리라 생각된다.

IV. 적 요

본 연구는 난관액과 oviductal conditioned medium이 다정자 침입과 체외배발달에 미치는 효과를 규명하기 위하여 수행하였다. 배양액내 난관액과 oviductal conditioned medium의 첨가는 다정자침입율과 난자내 침입한 평균정자수를 감소시켰다($P < 0.05$). 정자와 난관액 그리고 oviductal conditioned

medium과 1.5, 3, 4.5시간 공배양후 침체반응의 성적은 대조구에 비하여 증가하였다. 체외수정후 체외발달배양액에 난관액이나 oviductal conditioned medium을 첨가하여 192시간동안 배양했을 때, 상실배와 배반포배발달율이 난관액과 oviductal conditioned medium첨가구에서 유의적으로 높았다($P < 0.05$). 이러한 연구결과는 난관액과 OVCM등 난관 유래물질은 다정자침입율과 난자내 침입한 평균정자수를 감소시키며 체외발달율을 높인다고 사료된다.

V. 인용문헌

1. Anderson, S. H. and G. J. Killian. 1994. Effect of macromolecules from oviductal conditioned medium on bovine sperm motion and capacitation. *Biology of Reproduction*. 51:795-799.
2. Antony, E. A., R. M. Petters and B. H. Johnson. 1989. Development of porcine embryos from one and two cells stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biology of Reproduction*

- 41: 1076-1083.
3. Beckman, L. S., T. C. Cantley, A. R. Reike and B. N. Day. 1990. Development and viability of one-and two-cell porcine embryos cultured through the 'four-cell block'. *Theriogenology* 33:1983(Abstract).
 4. Day, B. N. and C. Polge. 1968. Effects of progesterone on fertilization and egg transport in the pig. *J. Reprod. Fertil.*, 17:227-230.
 5. Dubuc, A. and M. A. Sirard. 1995. Effect of coculturing spermatozoa with oviductal cells on the incidence of polyspermy in pig *in vitro* fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 41:360-367.
 6. Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85:715-720.
 7. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation pig oocytes. *Theriogenology* 39: 965-973.
 8. Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987 Stimulation of early embryonic development in sheep by co-culture with epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 81: 23-28.
 9. 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.
 10. Hamano, S., K. Naito, Y. Fukuda and Y. Toyoda. 1989. *In vitro* capacitation of ejaculated boar spermatozoa:Effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension. *Gamate Research*. 24: 483-489.
 11. Hancock, J. L. 1959. Polyspermy of pig ova. *Anim Prod.*, 1:103-106.
 12. Heyner, S., N. 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.
 13. Hunter, R. H. F. 1991. Oviductal function in pigs with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:385-391.
 14. 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 aspects of protein synthesis. *Biol. Reprod.*, 44:62-68.
 15. Kano, K., T. Miyano and S. Kato. 1994. Effect of oviductal epithelial cell on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 42:1061-1068.
 16. Kim, N. H., H. Funahashi, S. J. Moon, L. Abeydeera, R. S. Prather and B. N. Day. 1996. Effects of oviductal fluid on the cortical granule reaction and polyspermy in the porcine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, in press.
 17. Lenz, R. W., R. L. Ax, H. J. Grimek and N. L. First. 1982. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 106: 1092-1099.
 18. Meyen, B. A., C. F. Jr. Rosenkrans and D. L. Davis. 1989 Development of pig blastocyst *in vivo* is altered by serum, bovine serum albumin and amino acids and vitamins. *Theriogenology* 31:463-470.
 19. Nagai, T., K. Niwa and A. Iritani. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J. of Reproduction and Fertility*, 70:271-275.
 20. Nagai, T. and R. M. Moor. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 26:377-382.

21. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. L. Leifried-Rutledge, E. S. Crister, W. H. Eyestone and N. L. First. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. 25: 591-600.
 22. Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, R. R. Handrow, M.M. Sims and N. L. First. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviductal fluid. Biology of Reproduction. 40: 1020-1025.
 23. Parrish, J. J., Susko J. L. Plarrish., C. Uguz and N. L. First. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3', 5'-Monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. Biology of Reproduction. 51: 1099-1108.
 24. Reed, M. L., M. J. Illera and R. M. Pettres. 1992. *In vitro* culture of pig embryos. Theriogenology 37:95-109.
 25. Schoenback, 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 embryos. Biol. Reprod. 47: 1118-1125.
 26. 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.
 27. Wang, W. H., K. Niwa and K. Okuda. 1991. *In-vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. J. of Reproduction and Fertility. 93:491-496.
 28. White, K. L., K. Hehnke, L. F. Rickords, L. L. Southern, D. L. Jr. Thompson and T. C. Wood. 1989. Early embryonic development *in vitro* by co-culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biology of Reproduction 47: 126-132.
 29. Xu, K. P., B. R. Yadav, R. W. Rorie, L. Plante, K. J. Betteridge and W. A. King. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fertil. 94:22-43.
 30. Yoshida, M. 1989. Improved viability of two-cell stage pig embryos resolution from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Anim. Reprod., 35:34-37.
- (접수일자 : 1998. 12. 18. /채택일자 : 1998. 12. 27.)