

## NCSU 23 배양액에 첨가된 Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1)이 돼지 수정란의 체외발육에 미치는 영향

김 수 · 남동현 · 정연우 · 김혜수 · 이소현 · 이갑상 · 현상환 · 김대영 ·  
강성근 · 이병천 · 황우석<sup>†</sup>  
서울대학교 수의과대학

### Effect of Insulin-Like Growth Factor-1(IGF-1) Supplemented to NCSU 23 Medium on Preimplantation Development of Porcine Embryos

S. Kim, D. H. Nam, Y. W. Jung, H. S. Kim, S. H. Lee, G. S. Lee, S. H. Hyun,  
D. Y. Kim, S. K. Kang, B. C. Lee and W. S. Hwang

Department of Veterinary Medicine, Seoul National University,  
Seoul 151-740, Republic of Korea

#### SUMMARY

This experiments were conducted to examine the effect of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) on preimplantation development of porcine IVF embryos. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured and fertilized *in vitro*, and their development was monitored for 168h pi(post-insemination). In Experiment 1, embryos were cultured in NCSU23 supplemented with various concentration of IGF-1(0, 1, 10, 100 ng/ml). At 168h, blastocysts' cell number of inner cell mass and trophectoderm were counted. More( $P<0.05$ ) blastocysts were cultured in the medium supplemented with 10ng/ml of IGF-1 and total cell number was the highest when embryos were cultured( $P<0.05$ ) in the same IGF-1 concentration. In Experiment 2, one-cell embryos were cultured in medium supplemented as follows: 1) no supplementation; 2) without IGF-1 for 48 h pi(post-insemination) and with IGF-1 for subsequent 120 h; 3) IGF-1 for 168 h; 4) with IGF-1 for 48 h and without IGF-1 for 120 h. Compared with other treatment groups, a significant increase in the proportion 2-cell embryos( $P<0.05$ ) and blastocyst( $P<0.05$ ) were obtained when cultured in medium supplemented with IGF-1 throughout *in vitro* culture for 168 h. As results, blastocysts' cell number was the highest when oocytes were cultured in medium supplemented with 10 ng/ml IGF-I throughout culture period. However, no significant difference was found on developmental competence when IGF-I was added at 4-cell stage embryos.

In conclusion, 10 ng/ml of IGF-1 supplemented in NCSU-23 medium enhances porcine IVP embryo development to the blastocyst stage, but does not significantly increase cell number of blastocysts.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail: hwangws@snu.ac.kr

· 본 연구는 서울대학교 수의과대학 수의과학연구소의 일부지원에 의해 수행되었음.  
· The Advanced Backbone IT Technology Development(IMT 2000-C1-1)

## 서 론

체외수정은 수정란이식에 의한 우수형질 보유 개체 생산, 생식세포 미세조작술의 개발 그리고 줄기세포 연구 등 수의축산 분야와 생명공학에 광범위하게 이용되어지고 있다. 돼지는 Iritani 등(1978)에 의해 체외수정에 성공하였으며, Mattioli 등(1989)은 체외수정란이식에 의한 산자 생산에 성공하였다. 포유동물 수정란의 체외배양에 영향을 미치는 요인으로는 미성숙 난자의 체외성숙도, 체외수정과정 그리고 수정란의 배양 등이 있다. 특히 수정란 배양에 관련되는 인자로는 체세포와의 공배양(Coculture) 유무(Xu 등, 1992), 정적/동적 배양시스템(Static / Perifusion culture system)(Lim 등, 1996), 배양액 성분의 최적화(Kim 등, 1990) 등이 있으며 각 인자에 대한 최적의 실험조건의 수립에 관한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다.

수정란의 배양액은 일반적으로 단순무기염류, 에너지원, 아미노산, pH 완충제, 미량원소, 항생제로 구성되어 있으며, 최근에는 기본 배양배지에 첨가된 성장인자(Growth Factor), 항산화제(Antioxidants), 금속킬레이트제(Chelator) 등이 배 발달에 미치는 영향에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 특히 성장인자는 포유동물의 배 발달 단계 중 세포의 증식, 분화, 형태형성을 조절하며(Hill 등, 1992), 임신기에는 난소와 자궁의 기능을 조절하여 자궁내막과 배아의 발달을 촉진하는 기능을 지닌 것으로 알려져 있다(Adashi EY 등, 1985; Echtenkamp SE 등, 1994). 그 중 IGF-1은 자궁내막과 배아의 상호작용을 하는데 일차적인 역할을 담당한다(Simmen 등, 1993). 마우스(Harvey 등, 1992), 돼지(Xia 등, 1994), 소(Matsui 등, 1995; Palma 등, 1997), 토끼(Andreas 등, 1998) 등에서 배양 배지에 첨가된 IGF의 영향을 알아보기 위한 연구를 수행한 결과, 동물의 종류마다 특정 농도 단계에서 배반포기 수정란으로의 발달이 증가하는 것으로 밝혀졌다.

대부분의 포유동물 수정란은 체외수정 이후 초기 분할이 진행된 이후 배아 유전자 활성화 단계(Embryogenomic Activation)를 전후하여 유사분열

이 정지하는 것으로 알려져 있으며(cell block), 돼지는 4~8 세포기에 일어난다. 이러한 Cell block 현상의 원인은 아직 규명되어 있지 않으며, 이를 극복하기 위하여 킬레이트제(Lim 등), 항산화제(Lim 등)의 첨가에 대한 연구가 수행되어 왔다.

따라서 본 연구는 NCSU 배양배지 내에 첨가된 IGF-1 돼지 체외수정란의 배양에 미치는 영향과 돼지 수정란의 배아 유전자 활성화단계인 4세포기를 전후하여 첨가된 IGF-1이 수정란 발달에 미치는 영향을 알아보고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 난포란의 채취

도축 직후(체중 120kg 내외) 난소를 채취하여 75 µg/ml penicillin G(Sigma, USA)와 50 µg/ml streptomycin sulfate(Sigma)를 첨가한 38°C의 멸균생리식염수(0.9% NaCl)로 세척한 후 멸균생리식염수가 들어있는 보온병에 보관하여 실험실로 운반하였다. 그리고 다시 신선한 멸균생리식염수로 2~3회 세척한 후, 38°C로 조정되어 있는 온수조에 넣어서 실험에 공시하였다. 공시난포란의 채취는 18-gauge 주사침이 장착된 5ml 주사기로 직경이 3~5mm의 포상난포로부터 난포액과 함께 난포란을 흡입하여 50ml 원심관에 옮겨 38°C로 조정된 온수조에서 침전시키고, 상층액을 제거하여 pellet만을 취하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 페트리접시에 넣고 HEPES가 들어간 NCSU 23 세정 배지로 2~3회 세정하고, 희석하여 실체 현미경(Olympus, Japan) 하에서 난구세포가 3층 이상 부착되어 있고 세포질이 균일한 난포란을 선별하여 체외성숙 실험에 공시하였다.

### 2. 난포란의 체외성숙배양

본 실험에서 사용되는 대부분의 시약은 Sigma에서 구입하였다. 체외성숙용 배양액은 TCM199를 기본 배양액으로 하여 10% 돼지난포액, 0.57 mM cysteine, 10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG, 10 ng/ml의 EGF를 첨가하여 사용하였다. 돼지 난포액은 6mm 이상 직경의 난포에서 난포액을 채취하여 3000rpm, -4°C의 저온에서 30분간 원심분리하고,

1.2  $\mu\text{m}$  필터로 여과한 후 0.45  $\mu\text{m}$ 의 필터로 다시 여과하여  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하여 사용 전에 용해하여 사용하였다. 체외성숙 배양에는 4-well dish (Nunc, Denmark)를 사용하여 각 well 당 500  $\mu\text{l}$ 의 TCM199 배양액을 넣어 배양을 실시하였다. 회수한 미성숙난자는 Hepes가 첨가된 NCSU23 배지로 3회 세정하고 TCM199 배양액으로 1회 세정하였다. 세정된 미성숙 난자는 각 well 당 50개씩 넣어 ( $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )의 배양기로 호르몬이 첨가된 배양액에서 22시간 배양하고 이후에는 호르몬이 첨가되지 않은 배양액으로 1회 세정하고 22시간동안 배양하여 총 44시간 동안 체외에서 성숙 배양하였다.

### 3. 체외수정

#### 1) 성숙란 준비

체외수정용 배양액은 modified Tris-Buffered Medium(mTBM)을 기본 배양액으로 하여 1mM caffeine과 0.8 % BSA(A 6003, Sigma)가 함유된 mTBM 용액을 사용하였고 정액의 세정액으로는 5.6mM fructose가 함유된 PBS를 사용하였다. 44 시간 동안 체외성숙시킨 돼지 성숙란은 0.1% hyaluronidase가 함유된 Hepes가 첨가된 NCSU23 세정 배지에 넣어 연속적으로 피펫팅을 하여 난구 세포를 제거하고, mTBM 배양액으로 3회 세정하였다. 세정 후에 50  $\mu\text{l}$ 의 수정용 배양액 소적에 15~20개의 성숙난자를 넣고 배양기 내에서 배양하였다.

#### 2) 정자의 준비 및 수정능 획득

정액은 0.25ml straw에 동결 보존되어 있는 정액을 사용하였다. 이 straw 를  $39^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 용해하고 8ml의 PBS로 희석하여 1500rpm 에서 2분간 2번 원심분리한다.

하단에 남은 정자 침전물을 mTBM 배양액을 넣고,  $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  그리고 포화습도를 유지하는 배양기에 넣어 10분간 정치시킨다. 이 정치시킨 정자를 최종농도가  $1.8 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 희석하고 각각의 수정용 배양액 소적에 5  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후  $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  그리고 포화습도가 유지되는 배양기에서

6시간 동안 체외수정을 실시하였다.

### 4. 체외배양

체외배양에 사용한 배양액은 0.4%(w/v) BSA (A6003, Sigma)를 첨가한 NCSU23 배양액을 사용하였다. 체외수정 6시간 후 Hepes가 포함된 세정용 NCSU23 배지로 수정란을 pipetting하고 3회 세정하고, 배발달 배양액으로 1회 세정한 후 0.4% BSA가 첨가된 NCSU23 배양액으로 각각의 처리군으로 만들어진 30  $\mu\text{l}$  소적에 각 소적당 10개씩 넣어  $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  그리고 포화습도가 유지되는 배양기 내에서 배양하여 체외 발달을 유도하였다. 체외배양 48시간 후 분할율을 조사하였고, 168시간 후 배반포 발달률을 조사하였다.

### 5. 실험설계

#### 실험 1

IGF-1의 농도(1, 10, 100 ng/ml)에 따른 난분할, 수정란의 체외발육, 배반포의 내부세포 및 영양의 배엽세포의 개수와 비율에 미치는 영향을 검토하여 최적의 IGF-1농도를 설정하였다.

#### 실험 2

실험 1에서 도출된 IGF-1의 농도로 수정 후 48 시간 되는 수정란을 Table 2와 같이 4개의 군으로 나누어서 배발달율을 검토하였으며, 수정 후 168 시간째에 배반포기 수정란만을 선별하여 Differential Staining을 하였다.

#### 실험 3

실험 2의 결과로 얻어진 배반포를 형광염색을 통하여 총 세포수, ICM 세포수, 총세포수 대비 ICM 수 등을 조사하였다.

### 6. 통계학적 검증

본 실험 설계의 model effect를 검증하기 위하여, SAS program(Anon, 1992)에 포함된 log linear model을 이용하였다. 우선 Analysis of Variance (ANOVA) 법을 이용하여, 각 판정지표에서 model effect를 검증하였으며 유의적 효과가 발견되는 경

우 least square mean을 이용하여 각 처리군의 효과를 보았다. 유의적 검증의 기준은  $p = 0.05$  이하로 하였다.

### 결과 및 고찰

IGF-1이 각각 0, 1, 10, 100 ng/ml씩 첨가된 NCSU-23 배양액에서의 돼지 체외수정란을 배발달을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 대조군(0 ng/ml)을 제외하고는 모두 배반포 발달율이 증가하였으나 ( $P < 0.05$ ), 분할율(65.5~69.5)은 유의적( $P < 0.05$ )인 차이를 나타내지 않았다. 0, 1, 10 ng/ml의 IGF-1이 첨가된 배양액에서의 배반포 발달율은 100 ng/ml이 첨가된 배양액에서의 발달율보다 높았으며 ( $P < 0.05$ ), hatched 배반포 발달율은 10 ng/ml의 IGF-1이 첨가된 배양액에서 가장 높았다 ( $P < 0.05$ , 5.2% vs. 1.4~3.1%). 배양액에 첨가된 IGF-1이 수정란의 발달에 미치는 영향은 소(Makarevich, 2002)와 사람(Lighten, 1998)에서 보고되었으며, 분할율은 유의적인 차이가 보이지 않았으나 두 경우 모두 상실 배/배반포기 발달율이 모두 증가하였다 ( $P = 0.03$ ,  $P < 0.05$ ). 이는 돼지 수정란을 이용한 본 실험 결과와 일치하는 것으로서, IGF-1은 후기배의 발육을 촉진시키는 기능을 지닌 것으로 추론할 수 있다.

수정 후 48시간을 기준으로 NCSU23에 10 ng/ml의 IGF-1을 첨가하거나 첨가하지 않을 경우로 군을 나누어 돼지 수정란을 배양한 결과는 Table 2와 같다. 첫 48시간동안 IGF-1이 첨가된 배양액에서 배양하였을 경우 IGF-1을 전혀 첨가하지 않은

대조군보다 분할율이 유의적으로 높았다 ( $P < 0.05$ , 75.5~78.6% vs. 61.5~61.8%). 체외수정란을 배양시작일부터 종료일까지 계속하여 10ng/ml의 IGF-1이 첨가된 배양액에서 배양했을 경우 유의적인 차이는 보이지 않았으나 배반포 발달율이 높은 경향을 보였으며(22.5% vs. 16.9~18.8%), 부화배반포기 발달을 또한 배양 7일간 IGF-1이 첨가된 배양액에서 배양하였을 경우 대조군보다 그 발달율이 유의적으로 높았다 ( $P < 0.05$ , 6.4% vs. 2.4~3.6%). 이와 같은 결과는 10 ng/ml의 IGF-1은 초기 돼지 체외수정란뿐만 아니라 후기배 발육을 촉진하는 것을 보여주고 있다. 또한 4세포기에 첨가된 IGF-1은 배반포 발달을 촉진시키지 않은 것으로 보아(16.7% vs. 16.9%), IGF-1은 배아 유전자 활성화 단계 이전에 배발육을 촉진시키는 기능을 지닌 것으로 생각할 수 있다.

수정 후 168시간째에 각 실험군에서 배반포기 수정란만을 선별하여 Differential Staining을 한 결과, 총 세포수, ICM 세포 수, 총 세포수 대비 ICM 세포수의 비율에 대한 model effect는 0.81, 0.39, 0.81로서 각 처리군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 7일간 계속하여 10 ng/ml의 IGF-1이 첨가된 배양액에서 배양하였을 경우 유의적인 차이는 없었으나 배반포의 총 세포수는 높은 경향을 보였으며(106.5 개 vs. 86.5~90.4), 이것은 마우스(Harvey, 1992; Parkin, 1996)와 소( $P < 0.01$ , Narula, 1996)에서 IGF-1이 배반포의 ICM 수, 총 세포수 대비 ICM 세포수의 증가를 가져온다는 결과와 상치하는 것으로서 그 이유로는 우선 동물의 종에

Table 1. Development of porcine *in vitro* produce embryos cultured in NCSU23 supplemented with different concentration of IGF-1

IGF-1 Conc. (ng)	No. of embryos cultured	No.(%) <sup>a</sup> of embryos developed to			Cell No. of blastocysts
		2-cell	BL	HBL	
0	381	261(68.5)	77(20.2) <sup>b</sup>	12(3.1) <sup>b,c</sup>	69.086 <sup>bc</sup>
1	357	234(66.5)	62(17.4) <sup>b</sup>	8(2.2) <sup>b</sup>	79.727 <sup>ab</sup>
10	348	242(69.5)	69(20.8) <sup>b</sup>	18(5.2) <sup>c</sup>	85.097 <sup>a</sup>
100	357	234(65.5)	41(11.5) <sup>c</sup>	5(1.4) <sup>b</sup>	61.286 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Percentage of the number of embryos cultured.

<sup>bc</sup> Different superscripts within the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Table 2. Effect of various combinational treatment of IGF-1(10ng) to culture media on the development of porcine embryos

Presence (+) or Absence (-) of IGF-1		No. of embryos cultured	No(%)a. of embryos developed to		
48 hrs pi	49~168 hrs pi		2-cell	BL	Hatched-BL
(-)	(-)	207	128 (61.8) <sup>b</sup>	35 (16.9)	6 (2.4) <sup>b</sup>
(-)	(+)	221	136 (61.5) <sup>b,d</sup>	37 (16.7)	8 (3.6) <sup>b,c</sup>
(+)	(-)	192	145 (75.5) <sup>c</sup>	36 (18.8)	7 (3.6) <sup>b,c</sup>
(+)	(+)	173	136 (78.6) <sup>c</sup>	39 (22.5)	11 (6.4) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Percentage of the number of embryos cultured.

<sup>bcd</sup> Different superscripts within the same column are significantly different, P<0.003 in the 2-cell, P<0.05 in the blastocyst stages.

Table 3. Effect of different combinational treatment of IGF-1(10 ng) to culture media on the quality of *in-vitro* produced porcine blastocysts

Presence (+) or Absence (-) of IGF-1		No. of blastocysts		Cell No. of blastocysts		ICM cell/total cell ratio
48 hrs pi	49~168 hrs pi	Examined	Successfully stained(%) <sup>a</sup>	Total blastomeres	ICM Cells	
(-)	(-)	25	22	86.5	15.1	17.6
(-)	(+)	19	14	77.1	14.7	19.2
(+)	(-)	15	12	90.4	16.3	19.0
(+)	(+)	20	16	106.5	17.4	18.4

Model effect(P value) in the cell numbers of total blastomeres and inner cell mass(ICM) cells, and the ratio of ICM cells to total blastomeres were 0.81, 0.39 and 0.81, respectively.

따른 IGF-1의 기능의 차이점을 들 수 있으며, 두 번째로는 화학적으로 그 성분이 규명된 배양액(Chemically defined medium)을 사용한 위 두 예와는 다르게 본 실험에서는 우혈청과 알부민 등의 단백질원을 첨가하여 IGF-1의 초기배에 미치는 영향이 미지의 인자에 의하여 상쇄되었기 때문으로 생각할 수 있다.

### 적 요

본 연구는 돼지 체외수정란의 배양시스템의 최적화를 위하여 수행되었다. 기본배양액으로는 NC-SU-23을 사용하였으며, 실험 1에서는 IGF-1이 각각 0, 1, 10, 100 ng/ml의 농도로 첨가된 배양액에

서 배양하여 분할율, 배반포 발달율과 총 세포수를 확인하였다. 농도 경사에 따른 분할율은 차이가 없었으나(65.5%~69.5%), 배반포 발달율에 있어서는 10 ng/ml의 농도로 첨가하였을 경우가 가장 높았다(P<0.05). 실험 2는 배아 유전자 활성화기인 4세포기에 첨가된 IGF-1이 이후의 배발달을 촉진시키는지 알아보기 위하여 수행되었다. 총 4가지 배양액으로서 각각 IGF-1 비첨가군, 48시간 이후 첨가한 군, 첫 48시간 첨가한 군, 7일간 계속하여 첨가한 군 등 4가지 배양액으로 배양하여 분할율, 배반포 발달율, 확장배반포기 발달율을 조사하였다. 그 결과 첫 48시간 동안 첨가한 경우와 7일간 IGF-1이 첨가된 배양액에서 배양하였을 경우 분할율(P<0.05)과 확장배반포기 형성을(P<0.05)에서 유의성

을 보였다. 실험 3은 체외 배양시 첨가된 IGF-I이 배반포의 세포수 형성이 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행하였다. 실험 2의 결과로 얻어진 배반포의 ICM 수, 총 세포수 대비 ICM 수를 조사한 결과 7일간 IGF-I이 첨가된 배양액하여 얻어진 배반포에서 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 총 세포수가 가장 높았다(106.5 vs. 77.1~90.4).

이상의 결과를 볼 때 10 ng/ml의 농도로 첨가된 IGF-I은 분할율과 배반포 발달율을 증가시켜 초기, 후기배에서 모두 배 발달을 촉진하는 인자로 사료된다.

### 참고문헌

- Byrne AT, Southgate J, Brison DR and Leese HF. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by Insulin and Insulin-Like growth factor(IGF) family. *Mol. Reprod. Dev.*, 62:489-495.
- Guler A, Poulin M, Mermillod P, Terqui M and Cognie Y. 2000. Effect of growth factors, EGF and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, 54:209-218.
- Harvey MB and Kaye PL. 1992. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31(3):195-199.
- Herrler A, Krusche CA and Beier HM. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-1 promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.*, 59:1302-1310.
- Hill DJ. 1992. Peptide growth factor interactions in embryonic and fetal growth. *Horm. Res.*, 38: 19-202.
- Illera MJ, Lorenzo PL, Illera JC and Petters RM. 1998. Development competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-1, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *Int. J. Dev. Biol.*, 42(8):1169-1172.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54:379-383.
- 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.
- Lim JM and Hansel W. 2000. Exogenous substances affecting development of *in vitro*-derived bovine embryos before and after embryonic genomic activation. *Theriogenology*, 53: 1081-1091.
- Makarevich AV and Markkula M. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with Insulin-Like growth factor-I during *in vitro* maturation and culture. *Biol. Reprod.*, 66:386-392.
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1995. Insulin and Insulin-like growth factor-1(IGF-1) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J. Vet. Med. Sci.*, 57:1109-1111.
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H. 1997. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-1(IGF-1) is mediated through the IGF-1 receptor. *Theriogenology*, 48:605-616.
- Mattioli M, Bacci ML, Geleati G and Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 31: 1201-1207.
- Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L and Thatcher WW. 2002. Effects of insulin growth factor-1 on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology*, 895-907.
- Narula A, Taneja M and Totey SM. 1996. Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophoctoderm and inner cell mass of *in vitro* fertilized and parthenogeneti-

- cally developed buffalo embryos: the effect of IGF-I. *Mol. Reprod. Dev.*, 44(3):343-351.
- Palma GA, Muller M and Brem G. 1997. Effect of insulin-like growth factor(IGF-1) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 110:347-353.
- Harvey MB and Kaye PL. 1992. Insulin-like growth factor-1 stimulated growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev.*, 31:195-199.
- Saito S and Niemann H. 1991. Effect of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.*, 44:927-936.
- Seidel GE Jr, Glass T and Olsen SE. 1991. Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. 1991. *Biol. Reprod.*, 44(Suppl 1):155 abtr.
- Simmen RCM, Ko Y and Simmen FA. 1993. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology*, 39:163-175.
- Zhang X, and Armstrong DT. 1994. Possible role of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Reprod. Fertil.*, 100: 375-380.
- 

(접수일: 2002. 10. 1/ 채택일: 2002. 12. 10)