

Extracellular Matrix 배지에서 생쥐 배아의 발생 및 아폽토시스

¹울산대학교 의과대학 산부인과, ²경기대학교 자연과학부 생물학과, ³바이오테드 연구소

강병문¹ · 손인표² · 정병목² · 최규완³ · 계명찬^{2*}

Preimplantation Development and Apoptosis of Mouse Embryos in the Medium Containing Extracellular Matrix

Byung Moon Kang¹, In Pyo Sohn², Byung Mok Chung²,
Kyoo Wan Choi³, Myung Chan Gye^{2*}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ulsan University,

²Department of Biology, Natural Sciences, Kyonggi University, ³Biomed Institute

Objective: To verify the effect of Matrigel, a ECM complex from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma on the preimplantation development and apoptosis of mouse fertilized eggs.

Method: Late pronucleus stage eggs were cultured through the blastocyst stage in the presence of Matrigel (0.5%, v/v). Characteristics of apoptosis and cell number assessed by Hoechst staining and TUNEL labeling at the blastocyst stage, respectively.

Results: Morphological development, number of cells per embryo was significantly increased but rate and number of TUNEL positive nuclei of the embryo were decreased in the presence of Matrigel.

Conclusion: This result suggested that at low concentration of Matrigel improves both viability and morphological development in the preimplantation mouse embryos.

Key Words: Matrigel, Mouse embryos, Development, Apoptosis

포유동물의 수정란은 자성생식수관내에서 3~4일 이내에 난할과 분화를 통해 포배로 발생한다. 이 시기의 배아 주위에는 다양한 성장인자와 사이토카인들이 존재하며 이들은 배아의 발생 프로그램의 발현에 영향을 미쳐 배아 발생을 정교히 조절하는 역할을 한다.¹ 최근 배아 발생에 영향을 미치는 인자로 배아세포 주변에 존재하는 extracellular matrix (ECM)에 대한 관심이 높아지고 있다. ECM 분자들은 세포표면에 존재하는 integrin 신호전달을 통해 세포의 생존과 사멸, 분열과 분화를 조절하며,^{2,3} 세포 주변에 존재하는 다양한 종류의 peptide 및 이들과 결합하는 IGF

binding protein, interferon gamma 등의 단백질들과 세포간의 결합을 촉진하며 그 결과로 이들 호르몬의 효과를 상승시킨다.^{4,5} ECM과 세포의 결합은 α 와 β subunit heterodimer로 구성된 integrin에 의해 매개되며 integrin은 세포질골격 및 다양한 신호전달 분자들과 연결된다.⁶ 12개의 α 와 9개의 β subunit의 조합의 결과로 적어도 20종의 integrin이 존재한다. ECM 단백질별로 독특한 integrin이 결합하며 ECM의 생물학적 효과를 매개한다. 초기 배아는 다양한 integrin을 발현하며,⁷ 따라서 초기 배아에서 발현되는 integrin의 종류는 잠정적으로 배발생에 영향을 미칠 수 있는 특정 ECM 분

* 교신저자: 계명찬, 수원시 팔달구 이의동 산 94-6, 경기대학교 자연과학부 생물학과
전화: (031) 249-9646, Fax: (031) 253-1165, e-mail: mcgye@kuic.kyonggi.ac.kr
본 연구는 보건복지부 (HMP-97-M-1-0006) 지원으로 수행되었음.

자와 그들의 생리적인 기능을 짐작케 한다.

ECM 분자들은 세포표면 또는 분비된 단백질 분해효소들에 의해 절단되며⁸ 절단된 ECM 절편들은 세포표면의 수용체에 결합하여 세포의 증식과 분화 조절에 관여한다.⁹ 초기 배아는 투명대라는 거대한 ECM의 코트에 의해 덮인 상태로 포배까지 발생하며 투명대가 제거된 배아의 발생 속도는 지연된다.¹⁰ 배란된 난자 및 발생중인 배아세포 주변,¹¹⁻¹³ 수란관 및 자궁내에는 다량의 ECM들이 존재하며^{5,14-16} 이들은 배아 또는 자궁조직에서 주기적으로 발견되는 다양한 matrix metalloproteinase (MMP)에 의해 절단된다.¹⁷⁻²⁰ 따라서 발생중인 배아의 주변에는 다량의 ECM 절편들이 존재하며 초기 발생중인 배아세포와 ECM 분자와의 접촉은 필연적이다. 실제로 특정 ECM 분자 또는 복합 ECM을 첨가한 배양액에서 배아 발생의 속도가 향상된다.^{13, 21, 22} 이러한 증거들로부터 배아의 난탈과 형태 분화에 있어서 ECM 분자가 중요한 조절인자로 작용할 것으로 추측되며 이를 보조생식술 분야에서 이용하여 배아 발생을 촉진하려는 시도는 중요한 것으로 사료된다. 본 연구에서는 Sarcoma에서 추출한 ECM 복합체인 Matrigel을 희석한 배양액내에서 생쥐의 초기 배아를 배양하고 발생률과 포배시기 배아의 할구수, 할구세포의 아포토시스 등의 변화를 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 배아의 획득 및 배양

본 실험에서는 광주기를 명 14시간, 암 10시간으로 조절되는 사육실에서 사육된 생쥐 (ICR

strain)로 암컷은 생후 7~8주 된 것을, 수컷은 생후 12주 이상 된 것을 사용하였다. 초기 배아를 획득하기 위하여 5 IU의 PMSG와 human chorionic gonadotrophin (hCG, Sigma)을 46~48시간 간격으로 암컷 생쥐의 복강내에 주사하여 과배란을 유도한 뒤, 수컷 생쥐와 교미시키고 다음날 질전을 확인된 암컷을 분리하여 배아를 획득하였다. 후기 전핵시기 배아는 hCG 주사 후 24시간에 생쥐를 경추파괴로 도살한 후, 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA)을 함유한 mHTF²³ 배양액에서 수란관을 적출하여 배양액을 관류 (flushing)하는 방법으로 수획하였다. mHTF에 0.4% BSA를 함유한 배양액을 기본배양액에 Matrigel을 0.5% (v/v) 농도로 희석하여 배양에 이용하였다. 배양액을 배양접시 (plastic dishes, Corning; 60×15 mm) 위에 20 µl씩 위치하고 paraffin oil을 덮어 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기에서 배양한 후 전핵시기의 배아를 배양하였다.

2. 발생률 및 할구수의 측정

전핵시기 수정란으로부터 발생한 배아의 경우 hCG 주사 후 48, 72, 96, 120, 144시간에 배아의 발생 상태를 확인하였다. 할구수 계수를 위해 0.7% sodium citrate 용액으로 5분간 처리하여 배아를 팽윤시킨 후 슬라이드에 올리고 Carnoy 용액으로 고정하였다. 24시간 후 saline으로 세척하였다. Hoechst 33258 (Sigma)를 0.1 µg/ml 농도로 함유한 mHTF 배양액 (0.4% BSA)내에서 5~6분간 배양하고 PBS로 1회 세척하고 형광현미경 시야에서 관찰하고 사진 기록하였다.

Table 1. Effect of ECM on the development of pronuclear stage mouse embryos

ECM	72h Post-hCG		96h Post-hCG				120h Post-hCG				144h Post-hCG		
	D	M	D	M	B	H	D	M	B	H	D	B	H
-	0	30	2	57	47	2	22	1	77	21	23	26	72
(%)	(0.0)	(24.8)	(1.7)	(47.1)	(38.8)	(1.65)	(18.2)	(0.8)	(63.6)	(17.4)	(19.0)	(21.48)	(59.5)
+	1	38	0	51	60	4	14	4	44	66	23	9	96
(%)	(0.8)	(29.7)	(0.0)	(39.8)	(46.9)	(3.1)	(10.9)	(3.1)	(34.4)	(51.6)*	(18.0)	(7.0)	(75.0)*

PN stage eggs were cultured through blastocysts and morphological development was assessed 72h post hCG with 24h interval. 121 and 128 eggs were cultured in ECM (-) or ECM (+) media, respectively. *, significantly different from ECM (-) at p<0.05. D, degenerated; M, morula, B, blastocysts, H, hatched.

3. *In situ* visualization of apoptotic nuclei

배양이 끝난 배아를 0.7% sodium citrate 용액에 15분간 정치하여 팽윤시키고 슬라이드 위에 한 개의 배아를 올려놓고 정확한 위치를 표시한 후, Carnoy 용액 (acetic acid : ethanol = 1 : 3)을 배아 위에 떨구어 고정하였다. PBS에 5분간 정치하여 수화시킨 후, endogenous peroxidase를 억제하기 위해 3% H₂O₂에 5분간 정치시킨 후 PBS로 5분간 2회 세척하였다. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)을 위해 세척한 slide는 Apoptag kit (Intergen)의 equilibration buffer에 5분간 정치시킨 후 TdT enzyme solution을 도포하여 humidity chamber에 넣어 37℃, 1시간 30분간 배양하였다. TdT enzyme 반응의 종료는 슬라이드를 Stop/Wash buffer에 넣어 10분간 세척 후, PBS로 1분간 4회 세척하였다. 세척 후 슬라이드 위에 Anti-digoxigenin peroxidase conjugate 용액을 도포한 후 cover glass를 덮고 상온에서 humidity chamber에 넣어 1시간 배양하였다. 반응 후 PBS에서 2분간 3회 세척하고, peroxidase substrate인 DAB (3,3' diaminobenzidine) 용액으로 1분간 반응시켜 발색하였다. PBS로 수회 세척 후 hematoxylin으로 counter staining 하였다. PBS로 세척 후 70~100%로 ethanol series를 거쳐 xylene에 10분 정치

Table 2. Effect of ECM on the mean cell number per blastocyst

ECM	Total No. of Embryos Counted	Mean Cell No. per Blastocyst
-	12	84.08 + 7.82
+	13	120.38 + 13.09*

Blastocysts developed from PN stage eggs were fixed post hCG 120h and subjected to Hoechst labeling. *, significantly different from ECM (-) at p<0.05

Table 3. Effect of ECM on the apoptotic nuclei per blastocyst

ECM	Total No. of Embryos Counted	Mean No. of Blastomere	Mean Apoptotic Nuclei No. per Blastocyst (%)
-	4	86.75 + 9.22	27.0 + 15.03 (30.3)
+	4	118.80 + 17.02*	14.3 + 4.57* (12.3)*

Blastocysts developed from PN stage eggs were fixed post hCG 120h and subjected to Hoechst labeling. *, significantly different from ECM (-) at p<0.05

후 Canada balsam으로 permanent mounting 하였다. 할구의 핵 가운데 갈색으로 발색된 것만을 apoptotic nucleus로 판정하고 전체 할구수에 대한 apoptotic nuclei의 비율을 계산하였다.

4. 통계처리

배발생률은 χ^2 -test로, 포배내 할구수는 Student-t test로 결과의 통계처리하며 p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. ECM은 초기 배아의 형태 발생을 촉진한다

hCG 주사 후 72시간에 ECM이 첨가된 배양액에서 상실배가 관찰되었으며 ECM 비처리군에서 보다 유의하게 높은 발생률을 기록하였다. hCG 주사 후 96시간에 ECM이 첨가된 배양액에서 포배가 관찰되었으며 ECM 비처리군 보다 유의하게 높은 발생률을 기록하였다. hCG 주사 후 120시간에 ECM이 첨가된 배양액에서 부화를 진행 중이거나 부화된 배아가 ECM 비처리군 보다 유의하게 증가하였다 (Table 1).

2. ECM은 배아의 할구수를 증가시킨다

후기 전핵시기 배아를 배양하여 포배가 되었을 때 배아를 고정하여 핵을 염색한 후 계수한 결과 ECM이 첨가된 배양액에서 ECM 비처리군 보다 유의하게 할구수가 증가되어 있음을 확인하였다 (Table 2 and Figure 1).

3. ECM은 포배내 apoptosis를 억제한다

후기 전핵시기 배아를 배양하여 포배가 되었을 때 배아를 고정하여 TUNEL을 시행한 결과 ECM이 첨가된 배양액에서 전체 할구 가운데 TUNEL positive 핵의 수 및 비율이 유의하게 적음을 확인하였다 (Table 3 and Figure 2).

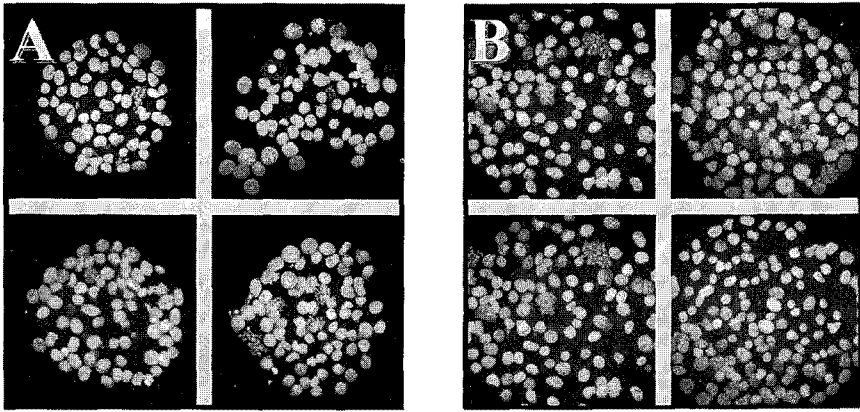


Figure 1. Hoechst staining of blastocysts. Blastocysts developed from pronucleus stage were fixed 120h post hCG 120h and subjected to Hoechst staining. Arrows A, mHTF only; B, mHTF + Matrigel 0.5%.

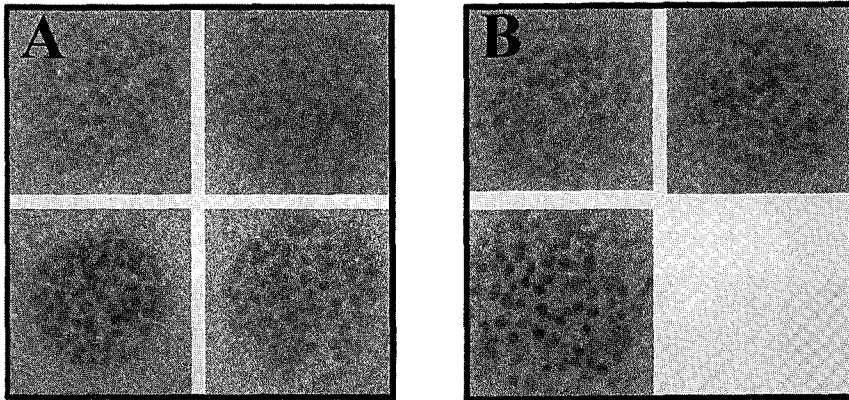


Figure 2. In situ TUNEL labeling of blastocysts. Blastocysts developed from PN stage eggs were fixed 120h post hCG and subjected to TUNEL procedure. Brown-color indicate TUNEL-positive signal. A, mHTF only; B, mHTF + Matrigel 0.5%.

고 찰

본 연구 결과 용해된 상태의 ECM 복합체인 Matrigel이 첨가된 배양액에서 배아의 형태적 발생과 세포수가 증가하는 반면 apoptosis의 빈도는 유의하게 감소하였다. 이러한 효과는 Matrigel이 배아내 할구세포 활동의 3가지 측면, 즉 세포분열 촉진, 사멸억제, 할구분화 촉진 모두에 긍정적인 영향을 미치는 것을 의미한다. Matrigel 내에는 laminin, collagen IV, heparansulfate proteoglycan, entactin, nidogen 등의 ECM protein이 존재하며²⁴ TGF- β , FGF, tPA 등의 성장인자가 소량 존재한다.²⁵ 이들 성장인자 및 단백질분해효소들은 초기

배아 발생을 촉진한다.¹ 따라서 Matrigel의 초기 배아 발생 촉진효과가 단순히 ECM에 의한 것인지 아니면 이들 부가적인 요인들에 의한 것인지는 분명치 않다. 다만 이들이 상승적으로 작용하였을 가능성은 충분하다.

Matrigel이 첨가된 배양액내에서 포배형성과 부화 등 배아의 형태적 분화가 유의하게 향상되었다. 이와 유사한 결과로 생쥐 초기 배아에서 Matrigel에 의한 부화 촉진,^{26,27} laminin, fibronectin 등과 같은 특정 ECM이 첨가된 배양액에서 배발생의 속도의 향상이 보고되어^{13,21,22} 일치하는 결과를 보인다. 한편 이와는 반대로 Matrigel이 outbred 생쥐 초기 배아 발생에 치명적이라는 보고도 있다.²⁷ 연구자들간에 상이한 결과가 얻어진 이유

로는 생쥐 배아의 유전적 배경, 배양액에 첨가된 ECM의 조성 및 적절한 준비 등의 차이가 있을 수 있다. 배아의 형태 발생적 측면은 주로 배아 자체에 존재하는 발생 시간표에 의존적으로 진행되며 난할과 할구의 분화가 독립적으로 일어난다.^{28,29} 이러한 주장은 주로 체외에서 초기 배아를 세포분열 억제약물 등을 투여하면서 얻은 결과이며 체내 발생의 조건과는 달리 세포외적 배아 발생 촉진인자들의 효과를 배제한 후 얻은 결과이다. 따라서 Matrigel이 첨가된 배양액에서 배아의 형태 발생이 빠르게 진행된 것은 배아 자체에 내재하는 형태 발생 프로그램의 진행이 Matrigel 내에 존재하는 ECM 및 성장인자와 단백질분해효소 등에 의해 촉진될 수 있음을 의미한다.

Matrigel에 의해 포배시기의 할구수가 유의하게 증가한 결과는 ECM의 mitogenic effect로 사료된다. ECM은 integrin 하부의 신호전달을 통해 하부의 다양한 인산화효소체계를 활성화시키고 이 신호들은 세포증식효과를 발휘한다.^{30~32} 따라서 ECM에 의해 매개되는 전형적인 세포증식 신호 전달 과정이 초기 배아의 할구세포내에도 존재하는 것을 추측할 수 있으며 이를 확인하기 위한 연구가 요망된다. 본 실험 결과 Matrigel이 첨가된 배양액에서 할구수의 증가 뿐 아니라 전체 할구 가운데 apoptosis의 신호를 나타내는 할구가 유의하게 감소하였다. 이는 배양액내 첨가된 Matrigel 내에 존재하는 ECM이 세포증식효과 뿐 아니라 세포사멸의 억제효과를 발휘한 것으로 사료된다. 다양한 세포에서 ECM 및 ECM 절편은 세포의 생존을 보장하며 apoptosis를 억제하며^{30,33} 대부분의 세포들이 기저막과 같은 ECM으로부터 이탈되면 사멸의 과정을 진행한다.³⁴ 초기 배아는 포배시기에 주로 내세포괴를 구성하는 세포들에서 apoptosis가 일어나며 이는 착상 후에 정상적인 배아 발생을 보장하는 장치이다.^{35~37} 체내와 체외발생한 배아를 비교하면 체외배양된 배아에서 할구세포의 apoptosis의 빈도가 더 높게 나타나며 이는 체외발생 배아의 발생 잠재능이 체내 발생 배아 보다 저조한 원인으로 추측되고 있다.³⁵ 난할중인 초기 배아는 생식수관 조직의 ECM에 부착하지는 않지만 배아 자체 및 배아 주변에는 다양한 ECM들이 존재하며^{11~13} 외부에서 첨가한 ECM은 투명대를 통과해 배아와 접촉할 수 있다.³⁸ Neuroblastoma는 비부착 상태에서 apoptosis를 진행하지만 용해된 상태의 integrin ligand 즉

ECM 분자에 의해 apoptosis가 억제된다.³³ 이와 유사한 방법으로 배아 주위에 존재하는 용해된 상태의 ECM에 의해 배아내 할구세포로 apoptosis 억제신호가 전달될 가능성이 있으나 현재까지 용해된 상태의 ECM과 할구세포표면의 integrin 등의 ECM 수용체와 상호작용을 통한 신호전달에 대한 실험적 증거가 제시되지 않았으므로 이에 대한 연구가 진행된다면 본 연구 결과를 뒷받침할 수 있을 것으로 사료된다.

ECM이 생쥐 초기 배아의 형태적인 발생을 향상시킬 뿐 아니라 포배시기까지 배양하였을 때 할구수의 유의한 증가와 함께 세포사멸을 억제한 결과는 성체의 다양한 조직에서 나타나는 ECM의 생리활성 조절 특성과 유사하며 따라서 초기 배아 발생 과정에서 ECM에 의해 야기되는 세포증식과 사멸의 조절기작이 보존되어 있음을 암시한다. 차후 ECM이 초기 배아 발생을 촉진하는 기작에 대한 연구가 요망되며 보조생식술 분야에서 이를 활용한 체외수정 프로그램을 통해 임신의 성공률을 향상할 수 있을 것으로 기대한다.

Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma의 세포외기질로부터 추출한 ECM 복합체인 Matrigel이 생쥐 초기 배아의 발생과 apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다. Matrigel을 0.5% (v/v) 첨가한 배양액에서 생쥐 초기 배아의 형태적 발생이 유의하게 향상되었다. Matrigel이 첨가된 배양액에서 후기 전핵시기부터 배양된 포배의 핵의 수가 유의하게 많은 반면 TUNEL positive 핵의 수 및 비율이 유의하게 적었다. 저농도의 Matrigel은 생쥐 초기 배아의 형태적 발생 및 할구세포의 생존을 촉진하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kaye PL, Harvey MB. The role of growth factors in preimplantation development. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 1-24.
2. Beattie GM, Rubin JS, Mally MI, Otonkoski T, Hayek A. Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells by extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell contact. *Diabetes* 1996; 45: 1223-8.
3. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-32.
4. Camejo EH, Rosengren B, Camejo G, Sartipy P,

- Fager G, Bondjers G. Interferon gamma binds to extracellular matrix chondroitin-sulfate proteoglycans, thus enhancing its cellular response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1456-65.
5. Yoshimura Y. Integrins: expression, modulation, and signaling in fertilization, embryogenesis and implantation. *Keio J Med* 1997; 46: 16-24.
 6. Jones JL, Walker RA. Integrins: a role as cell signalling molecules. *Mol Pathol* 1999; 52: 208-13.
 7. Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 1993; 119: 1175-86.
 8. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
 9. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 634-40.
 10. Saito S, Niemann H. Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol Reprod* 1991; 44: 927-36.
 11. Kapur RP, Johnson LV. Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. *Anat Rec* 1988; 221: 720-9.
 12. O'Shea KS, Liu LH, Kinnunen LH, Dixit VM. Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1990; 111: 2713-23.
 13. Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg RF, Kaupila A, Puistola U. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 1995; 64: 132-8.
 14. Yanagishita M. Proteoglycans and hyaluronan in female reproductive organs. *EXS* 1994; 70: 179-90.
 15. Burghardt RC, Bowen JA, Newton GR, Bazer FW. Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 52: 151-64.
 16. Guillomot M. Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. *Placenta* 1999; 20: 339-45.
 17. Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA, Pedersen RA, Werb Z. Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP are expressed during early mammalian development. *Genes Dev* 1989; 3: 848-59.
 18. Behrendtsen O, Alexander CM, Werb Z. Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* 1992; 114: 447-56.
 19. Werb Z, Alexander CM, Adler RR. Expression and function of matrix metalloproteinases in development. *Matrix Suppl* 1992; 1: 337-43.
 20. Schatz F, Krikun G, Runic R, Wang EY, Hausknecht V, Lockwood CJ. Implications of decidualization-associated protease expression in implantation and menstruation. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 3-12.
 21. Desai N, Scarrow M, Lawson J, Kinzer D, Goldfarb J. Evaluation of the effect of interleukin-6 and human extracellular matrix on embryonic development. *Hum Reprod* 1999; 14: 1588-92.
 22. Lazzaroni L, Fusi FM, Doldi N, Ferrari A. The use of Matrigel at low concentration enhances in vitro blastocyst formation and hatching in a mouse embryo model. *Fertil Steril* 1999; 71: 1133-7.
 23. Quinn P. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 97-105.
 24. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982; 21: 6188-93.
 25. McGuire PG, Seeds NW. The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem* 1989; 40: 215-27.
 26. Carnegie J, Claman P, Lawrence C, Cabaca O.

- Can Matrigel substitute for Vero cells in promoting the in-vitro development of mouse embryos? *Hum Reprod* 1995; 10: 636-41.
27. Dawson KM, Baltz JM, Claman P. Culture with Matrigel inhibits development of mouse zygotes. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14: 543-8.
 28. Wiekowski M, Miranda M, DePamphilis ML. Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos: effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities. *Dev Biol* 1991; 147: 403-14.
 29. Dean WL, Rossant J. Effect of delaying DNA replication on blastocyst formation in the mouse. *Differentiation* 1984; 26: 134-7.
 30. Yang C, Chang J, Gorospe M, Passaniti A. Protein tyrosine phosphatase regulation of endothelial cell apoptosis and differentiation. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 161-71.
 31. Yeh CH, Peng HC, Huang TF. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin alphavbeta3 antagonist and inducing apoptosis. *Blood* 1998; 92: 3268-76.
 32. Cary LA, Han DC, Guan JL. Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1001-9.
 33. Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F. Soluble integrin ligands and growth factors independently rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions. *Exp Cell Res* 1997; 237: 326-37.
 34. Rytomaa M, Martins LM, Downward J. Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. *Curr Biol* 1999; 9: 1043-6.
 35. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997; 56: 1088-96.
 36. Warner CM, Cao W, Exley GE, McElhinny AS, Alikani M, Cohen J, Scott RT, Brenner CA. Genetic regulation of egg and embryo survival. *Hum Reprod Suppl* 1998; 3: 178-90.
 37. Exley GE, Tang C, McElhinny AS, Warner CM. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* 1999; 61: 231-9.
 38. Larson RC, Ignatz GG, Currie WB. Effect of fibronectin on early embryo development in cows. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 289-97.