체외수정시술의 결과를 예측할 수 있는 인자로서 난구세포의 활용에 관한 연구

부산대학교 의과대학 산부인과학교실
김광대 · 김기형 · 나용진 · 이규섭

Application of Cumulus Cells as Factors to Predict the Outcome of IVF-ET

Kwang Dae Kim, Ki Hyung Kim, Yong Jin Na, Kyu Sup Lee
Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine
Pusan National University, Pusan, Korea

= Abstract =

Since in vitro fertilization and embryo transfer(IVF-ET) was firstly applied to humans by Edwards et al. at 1965, it has been discussed that many factors such as ovarian stimulation protocol, quality of spermatozoa and oocyte, culture condition, status of embryo, embryo replacement method and uterine receptivity might influence to its success rate. Among them, the following two factors have been suggested as being the most important in IVF-ET. One is to obtain and evaluate good quality oocytes/embryos, the other is to enhance the implantation ability of embryos. At present the most convenient system to evaluate oocytes/embryos is based on their morphological analysis and the status of oocytes-cumulus cell complexes. However, this evaluation method may be unreasonable because morphological analyses largely depend on an individual basis and there is no complete correlation between quality of oocytes/embryos and the outcomes of IVF-ET.

It has been well known that apoptosis is programmed cell death for homeostasis and is closely involved in most reproductive processes including follicular atresia. Seifer et al. reported that apoptosis can be used as a means of estimating ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. On the other hand, co-culture has been applied to improve the culture conditions and implantation ability of the embryo.

Therefore, this study was performed to establish the evaluation methods of oocytes on the basis of the incidence of apoptosis in cumulus cells and to understand the relationships between the status of cumulus cell and the outcome of co-culture.

The results were as follows :

1. The incidence of apoptosis in cumulus cells markedly increased in patients aged 40 or over, while the fertilization rate was greatly decreased in those age group.
2. Apoptosis in cumulus cells was found in both the fertilized oocytes and unfertilized oocytes, but the incidence of apoptosis was higher in unfertilized oocytes.
3. There is no clear correlation between apoptosis in cumulus cells and the number of oocytes retrieved. However, the incidence of apoptosis was increased when the number of oocytes retrieved was 5 and fewer in comparison with 6-10.
4. Embryo grade was significantly affected by the incidence of apoptosis in cumulus cells.
5. Pregnancy rate of IVF-ET per cycle was 29.4%, and the pregnant group had the higher fertilization rate and a significantly lower incidence of apoptosis in cumulus cells compared with the nonpregnant group.
6. When cumulus cells were used as helper cells in the co-culture of the embryo, in vitro activity of cumulus cells based on morphological change and proliferation did not influence the quality of embryo, but was closely associated with the implantation rate and pregnancy rate, which was enhanced when morphological changes and proliferation of cumulus cells was more active.
7. This difference in the outcome of IVF-ET according to in vitro activity of cumulus cells used for co-cultue was not associated with the incidence of apoptosis in cumulus cells, but rather had likely relations with the different secretion pattern of protein, which may be an embryotrophic factor by cumulus cells.

These results suggest that the incidence of apoptosis in cumulus cells can be used in predicting oocyte qualities and the outcomes of IVF-ET. And the effect of co-culture largely depends on the in vitro activity of cumulus cells as well.

Key Words: IVF-ET, Cumulus cell, Apoptosis, Co-culture

서 론

체외수정시술(in vitro fertilization and embryo transfer:IVF-ET)이 Edwards(1965)에 의해 인간에서 처음으로 시도되고1 인류 최초의 시험관아기가 탄생된 이후2 불임증 치료에 중요한 수단으로 널리 이용되고 있으나 그 임신성공률은 대체로 20-30% 수준이다. 체외수정시술시 임신성공률에 영향을 미치는 요인들로는 과배란유도방법, 난자와 정자의 질, 배양조건, 배아의 상태, 이식방법 및 자궁내막의 착상력 등이 거론되어 왔으나, 이중 가장 큰 문제점으로 다음과 같은 두 가지 요인이 제기되고 있다. 즉 하나는 양질의 난자와 배아를 얻고 평가하는 방법이고, 또 하나는 배아의 착상력을 증가시키는 것이다. 난자의 질은 수정여부와 착상을 위한 배아의 질을 결정하는 중요한 요인이 될 수 있다. 실제로 체외수정시술시 과배란유도로 얻어지는 난자중에는 과배란유도 방법이나 시술대상자의 나이에 따라 난자의 성숙도, 수정률 및 염색체이상 발생 등에 많은 영향을 미치며3 5, 또한 상당수의 난자는 체내에서는 물론 체외에서도 정상적으로 감수분열을 못하는 성숙능력 결핍난자(meiotic competence failure oocyte)로 밝혀졌고,6 동일 과배란주기로부터 얻어진 배아 역시 동일한 착상능력을 갖지 않는 것으로 알려져 있다.7 이러한 일련의 보고들은 과배란유도로부터 발생되는 많은 난자들이 질적으로 매우 다양하며, 연령의 증가에 따른 난자 질의 저하가 수정능력을 감소시키는 원인이 될 수 있으며 성공적인 체외수정시술을 위해서는 난자 및 배아의 질이 매우 중요함을 시사하고 있으나 이러한 요인들을 정확히 평가할 수 있는 기준이 미흡한 실정이다.8,9 지금까지 일반적으로 이용되고 있는 난자 및 배아 질의 평가방법은 난자의 모양, 난자-난구 복합체의 상태, 할구크기의 균일성, 배아의 모양 및 단편조각(fragments)의 유무 등 난자 및 배아의 형태적인 분석을 근거로 하고 있어 몇 가지 측면에서 부적절하다. 첫째, 형태적인 분석이 개인의 주관으로 오판될 우려가 있으며, 둘째 형태적으로 양질(good quality)의 배아를 이식하였으나 임신이 되지 않는 반면 저질(poor quality)의 배아를 이식하여 비록 임신율이 다소 낮다 하더라도 임신에 성공하는 사례가 빈번하므로 수정률, 발생률 및 착상률과 배아의 형태적인 분석사이에 명확한 상관관계가 부족하다.10,11 그러므로 체외수정시술의 임신율을 높이기 위하여 난자와 배아의 질과 매우 밀접한 상관관계가 있는 인자를 동정해 냄으로써 양질의 난자와 배아를 선발할 수 있는 체계를 확립하는 것이 시급한 과제이다.

세포고사(apoptosis)는 생명의 homeostasis 유지를 위해 생리적 자극의 변화에 반응하는 정상적인 생리 현상으로 프로그램된 세포 사망과정으로 정의되고 있으며, 난소에서 난포발달의 조절기전과 비슷하게 성선자극호르몬, 스테로이드 호르몬, 난소내 저분자 단백질, 성장인자, 성장호르몬 및 cytokines 등에 의해 조절되며,12 16 관찰되는 세포생물학적 변화로는 세포내 소기관의 밀집화, pyknosis, 세포 부피의 감소 및 세포내 chromosomal DNA의 단편화(fragmentation) 등이 있다.

이러한 세포고사는 난포의 퇴화(atresia)를 비롯한 생식현상 전반에도 밀접하게 관여하여17 20 체외수정시술을 받는 환자의 난소 기능을 평가하는 척도로 이용될 수 있는 것으로 보고되고 있다.21 난구세포는 난포발달 동안 난자와의 상호 신호전달에 의해 과립세포로부터 분화되어 난자를 둘러싼 채 배란되어 초기 배아 단계까지 난자와 운명을 같이하고 있어 배란전후로 난자와의 지속적인 상호작용을 통하여 수정과 배발생을 위한 난관내 미세환경과 난자의 질에 많은 영향을 미친다.22

따라서 난구세포의 세포고사 발생빈도가 난자 각각의 질을 평가하는데 있어 매우 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료되는 바 본 연구는 체외수정시술시 얻어지는 각 난자로부터 채취한 난구세포의 세포고사 발생빈도를 apoptosis detection kit를 이용하여 조사하고, 이러한 난구세포의 세포고사 발생빈도와 난자 질과의 상관관계를 규명하여 난자 질에 대한 평가체계를 마련하고자 하며, 또한 난구세포를 이용한 공배양(co-culture)시 난구세포의 세포고사 발생빈도와 체외활성도가 공배양의 결과에 미치는 효과에 대해서도 조사하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1997년 8월부터 1998년 7월까지 1년동안 부산대학교병원 불임크리닉에서 체외수정시술을 받은 환자 중 수정이나 배아 발달에 영향을 미칠 수 있는 남성인자, 배란인자 등의 요인에 기인된 불임증이 아닌 난관인자23주기와 원인불명인자11주기를 대상으로 하여 본 연구를 시행하였다. 난자 성숙도가 난구세포의 세포고사 발생빈도에 영향을 미칠 수 있으므로 과배란유도 후 채취된 모든 난자를 대상으로 하지 않고 채취된 난자가운데 2-4개의 성숙난자만을 선택하여 실험에

사용하였다. 따라서 본 연구에서는 총 34주기로부터 회수된 총 330개의 난자가운데 91개의 성숙난자만을 난구세포의 세포고사 측정에 이용하였다.

2. 연구방법

1) 과배란유도와 난자 채취

과배란유도는 gonadotropin releasing hormone agonist(buserelin acetate; Frankfrut, Germany)/follicle-stimulating hormone(FSH, metrodin ; Serono, Norwell, MA)/human menopausal gonadotropin(hMG, humegon; Organon, Holland)를 이용한 장기 투여법(long protocol)에 따라 시행하였다. 뇌하수체의 탈감작을 위해 buserelin acetate를 월경 제 21일째부터 매일 0.5mg 씩 피하주사하여 다음 월경주기 제 3일째 혈청 estradiol(E2)이 50pg/ml (consversion factor to SI unit, 3.671) 미만일 때 뇌하수체의 탈감작이 충분히 된 것으로 간주하고 과배란유도를 시작하였다. 과배란유도는 월경주기 제 3일째 hMG150IU와 FSH150IU를 병용하여 투여하였으며, 그 후 난소의 반응상태 및 혈중 E2 농도에 따라 과배란유도제 용량을 증감하였다. Human chorionic gonadotropin(hCG) 주사 시기를 결정하기 위해 혈청 E2와 경질초음파를 월경주기 제 7일째부터 실시하여 우성난포의 평균직경이 18mm 이상이거나 혹은 16mm 이상인 난포가 2개 이상 관찰되고 혈중 E2의 농도가 계속 상승하면 난포 성숙을 완성시키기 위해 hCG(pregnyl; Organon, Holland) 10,000IU를 근육 주사하였다.

성숙난포의 흡인은 hCG 주사 34-36시간 후에 질식 초음파(7.0 MHz vaginal sector scanner, B&K, Denmark) 유도하에서 질벽을 통하여 난포의 흡인 천자를 시행하였다. 배양접시(Falcon 1001, Becton Dicknson and Company, Lincolin Park, NJ, USA)에서 난포 흡입액으로부터 난자-난구세포 복합체를 얻어 해부현미경하에서 난자의 성숙도, 형태, 색깔 및 난구세포의 특징 등을 기준으로 난자의 성숙여부를 평가한 다음 0.9 ml의 IVF-M(Medicult Inc., Copenhagen O, Denmark) 배양액이 있는 배양접시(Falcon 3037, Becton Dicknson and Company)로 4-5개씩 옮겨 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하였다.

2) 정자의 준비와 수정

30분동안 상온에서 액화시킨 정액을 100%-90%-50% 3층의 percoll 농도층 위에 올려 놓고 400xg 에서 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 100% percoll 용액속에 있는 침전물만을 Pasteur pipette으로 흡인하여 10% 제대혈청이 함유된 Ham's F-10(Gibco, 81200-032, Grand island, N.Y., USA) 배양액 5ml로 희석한 다음 200xg에서 10분간 원심분리하여 2회 세척한 후, 1-2시간 동안 swim-up시키면서 고활력 정자를 얻었다. 성숙 난자에 대해서는 난자 채취 후 4-6시간 사이에, 미성숙 난자에 대해서는 10-12시간 사이에 회수된 고활력 정자를 1-2×106/ml 농도로 난자가 있는 수정용 배양접시에 첨가하여 수정을 유도하였다.

3) 수정 확인 및 수정란의 배양

수정 실시 16-20시간 후 2개의 전핵(pronuclei)이 관찰되면 정상적으로 수정이 이루어진 배아로 간주하였다. 수정을 확인하기 위해 내경 150-200㎛의 micropipette으로 2-3회 흡인, 배출하여 난자 주위의 난구세포를 제거한 후 자성전핵, 웅성전핵 및 제 2극체를 관찰하였다. 정상적인 수정란은 공배양에 이용될 때까지 신선한 IVF-M 배양액 1ml가 있는 새로운 배양접시로 옮겨 공배양 전까지 37℃, 5% CO2 배양기에서 계속 배양하였다.

4) 수정란의 공동배양 체계

수정 확인후 수정란을 새로운 배양접시로 옮기고 나면, 수정시 이용되었던 배양접시의 바닥에는 난자-난구세포 복합체로부터 분리되어 나온 많은 난구세포가 단일층으로 잘 부착되어 있다. 본 연구에서는 이러한 난구세포를 10% 제대혈청이 함유된 Ham's F-10 배양액으로 다음과 같이 처리하여 공배양에 이용하였다. 즉 수정 확인 즉시 수정용 배양접시의 바닥에 부착되어 있는 난구세포를 정자 등의 기타 세포 잔해물을 제거하기 위해 배양액으로 2-3회 세척한 후, 1ml의 배양액으로 20시간 배양하였다. 다음날 아침 부착되지 않은 세포 등을 완전히 제거하기 위해 신선한 배양액으로 다시 1회 세척하고 1ml의 신선한 배양액으로 2시간 동안 37℃, 5% CO2 배양기에서 더 배양한 다음 난자 채취후 48시간째 수정란을 난구세포가 단일층으로 잘 부착된 배양접시로 옮겨 공배양하였다.

5) 배아의 자궁내 이식

난구세포와 공배양한 배아의 상태는 Bolton 등(1989)의 분류방법을 이용하여 배아의 등급을 분류하였다(Table 1).23 난할이 확인된 배아는 Wallace catheter를 이용하여 grade A의 8세포기 배아가 5개 이하일 경우는 난자 채취 제 3일째 8세포기 배아를 자궁내로 이식하였고, grade A의 8세포기 배아가 6개 이상일 경우 포배기까지 배발달을 유도한 다음 난자 채취 제 5일째 3개 이하의 배아만을 이식하였다.

Table 1. Criteria used for the morphological grade of the embryo

Grade A(good quality): equal blastomeres and no fragmentation
Grade B(fair quality) : unequal blastomeres and no fragmentation
Grade C(poor quality):partial equal blastomeres, small(<30%) fragmentation
Grade D(bad quality) : unequal blastomeres, large(>30%) fragmentation

6) 공배양에 이용된 난구세포의 체외 활성도 측정

난구세포의 활성도는 난자채취 후 제 2일째 난구세포의 형태적인 변화와 증식력(proliferative capacity)에 따라 2개의 group으로 분류하였는데, 형태적 변화와 증식이 활발하게 진행되는 난구세포를 group I로, 형태적 변화가 있으나 증식이 거의 없거나, 심한 경우 세포 군집을 형성하는 세포를 group II로 정의하였다(Fig. 1).

7) 난구세포의 세포고사 발생빈도 측정

난포흡입액을 배양접시(Falcon 3002, Becton Dicknson and Company)로 옮겨 해부현미경하에서 난자-난구세포 복합체를 찾아 난자의 성숙여부를 평가한 직후 각 주기마다 2-5개의 성숙 난자-난구세포 복합체로부터 일부분의 난구세포를 Pasteur pipette으로 제거하여 10% 제대혈청이 함유된 Ham's F-10 배양액이 있는 배양접시(Falcon 3037, Becton Dicknson and Company)로 옮긴다. 0.1% hyaluronidase가 함유된 serum-free Ham's F-10 배양액을 난구세포가 있는 배양접시에 첨가하여 최종농도가 0.01%되게 하였다. 내경 100㎛ 미만의 micropipette으로 난구세포를 모아 반복적으로 흡인, 배출함으로써 난구세포를 단일세포 부유액으로 분리한 다음 원심분리하여 세포 침전물만을 모았다. 아래쪽 상층액 20㎕ 정도만 남겨 두고 나머지 위쪽 상층액을 모두 버린 다음, 남은 20㎕ 상층액으로 난구세포 침전물을 동일 micropipette으로 1분 동안 반복적으로 흡인, 배출하여 세포를 완전히 단일화시켰다. 2개의 slide glass 위에 10㎕씩 도말한 후 자연 건조시킨 다음 ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kit Fluorescein (Oncor Inc., Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 난구세포를 염색하였다. 1% (w/v) paraformaldehyde가 함유된 50mM PBS(pH 7.4)로 15분 동안 세포를 고정시킨 후 바로 실험에 이용하지 않을 경우 고정된 세포를 70% 알코올이 있는 coplin jar로 옮겨 사용전까지 4℃에서 보관하였으며, 이 과정은 세포의 변성을 막기 위해 난자채취 후 2시간 이내에 진행하였다. 세포고정후 바로 실험에 이용할 경우 고정된 세포를 PBS로 3회 세척한 후 digoxigenin-dUTP와 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT), anti-digoxigenin fluorescence antibody를 차례로 첨가하여 세포고사에 의한 DNA 단편화로 생기는 3′-OH 말단을 형광으로 표지시킨 후 1,000배의 형광현미경하에서 난구세포 200개를 무작위로 관찰하여 세포고사의 발생빈도를 측정하였다(Fig. 2).

8) 공배양에 이용된 난구세포의 metabolite labeling과 전기영동

Metabolite labeling에 앞서 난구세포를 난자-난구세포 복합체로부터 micropipette으로 제거하여 0.1% hyaluronidase 용액이 함유된 serum-free human tubal fluid(HTF) 배양액에서 단일화시킨 후 원심분리하였다. 상층액은 버리고 세포 침전물을 10% 제대혈청이 첨가된 HTF 배양액으로 재현탁시켜 1×105 난구세포를 seeding하였으며, metabolite labeling 실험을 위해서는 methionine이 첨가되지 않은 배양액이 요구되므로 단순 배지인 HTF를 기본 배양액으로 다음과 같이 이용하였다. 공배양에 이용한 조건과 동일하게 48시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 10% 제대혈청이 첨가된 HTF 배양액으로 2회 세척하였으며, 배양된 난구세포는 methionine free, serum free-HTF 배양액으로 다시 2회 세척하고 단백질은 [35S]-methionine(50μCi/ml, Amersham)인 첨가된 methionine free, serum free-HTF 배양액으로 2시간 metabolite labeling시켰다. Labeling 후 10% 제대혈청이 첨가된 HTF 배양액으로 2회 세척한 다음 24시간 배양하였다. 배양후 상층액을

회수하여 5X laemini sample buffer(LSB)를 4:1의 비율로 첨가하고 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 방법으로 단백질 전기영동하였다. 전기영동을 위한 시료를 준비하기 위해 LSB가 첨가된 시료를 100℃에서 3분간 열처리한 후 표지된 단백질을 liquid scintilation counter(LKB)로 정량한 다음 loading하였다. 전기영동은 앞서 설명된 Laemini 방법(Laemini, 1970)에 따라 제조된 10% polyacryamide gel 위에서 10시간 시행하였다.24 전기영동후 gel은 commassie brillant blue로 염색하고 dimethylsulfoxide(DMSO)(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 탈수시킨 후 15% diphenyloxazol(PPO) (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 함유된 DMSO로 증폭시켰으며, gel을 X-ray film과 cassette에 넣어 -80℃에서 감광하였고, 분자량은 단백질 marker(Prestained Marker, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 계산하였다.

9) 통계적 분석

난구세포의 세포고사 빈도에 대한 통계적 처리와 난구세포의 활성도를 기준으로 한 공배양의 결과에 대한 유의적 차이는 일원배치 분산분석(ANOVA), 임신군과 비임신군간의 체외수정시술의 결과는 unpaired-Student's *t*-test, 공배양의 임신율 비교는 chi-square를 이용하여 분석하였으며, $p<0.05$일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Fig 1. Phase contrast microscopic morphological changes and proliferation in cumulus cells used for co-culture 2 days after oocyte recovery. A: Extensive morphological changes and proliferations (Group I), B: no or minimal morphological changes(Group II). Magnification ×200.

Fig. 2. Immunofluorescent microscopic detection of apoptosis in cumulus cells stained with apoptosis detection kit(Oncor). Magnification ×1,000. Apoptotic cumulus cells show intense yellow fluorescence(arrowhead), whereas normal cells show red color stained with propidium iodide(arrow).

결 과

1. 연령과 채취된 난자 수에 따른 난구세포의 세포고사 발생빈도 비교

연령은 난자의 질을 비롯한 체외수정시술의 결과에 상당한 영향을 미치는 요인이므로 연령에 따른 난구세포의 세포고사 발생빈도는 30세 이하에서 0.61±0.10%, 31-35세에서 0.75±0.13%, 36-40세에서는 0.75±0.20%, 40세 이후는 1.59±0.23%로 연령에 따라 유의한 차이가 있었다($p<0.005$). 수정률은 40세 이하까지는 70% 내외로 차이가 없었으나, 40세 이후에서는 40%로 현저하게 감소하였다($p<0.05$)(Table 2).

Table 2. Comparison of the incidence of apoptosis according to age of patients

Age (years)	No. of cycles	No. of oocytes retrieved	No. of oocytes used for assay	Fertilization rate (%) Mean±SEM	Incidence of apoptosis (%) Mean±SEM
≤30	13	151	36	88.4± 4.4a*	**0.61**±0.10†
31 - 35	13	105	32	63.4±11.4a*	0.75±0.13†
36 - 40	4	43	12	**72.8**±14.1a*	**0.75**±0.20†
≥41	4	31	11	40.0±24.5b*	1.59±0.23†

* : $p<0.05$ (a vs b)
† : $p<0.005$ (vs each group)

시술대상자의 연령은 채취된 난자 수가 5개 이하인 군에서 6개 이상인 군에 비해 유의하게 높았으며($p<0.05$), 난구세포의 세포고사 발생빈도는 채취된 난자수가 5개 이하인 군에서 1.13±0.19%, 6-10개인 군에서는 0.63±0.12%, 11개 이상인 군에서는 0.77±0.11%로 채취한 난자 수와 난구세포의 세포고사 발생빈도 간에는 유의한 상관관계가 발견되지 않았으나($p=0.07$), 난자 수가 5개 이하인 군과 6-10개인 군사이에는 유의한 차이가 있었다($p<0.05$). 수정률은 난자 수가 5개 이하에서 64.3±13.2%, 6-10개인 군에서 70.4±11.5%, 11개 이상군에서 72.9±8.5%로 채취한 난자 수에 따른 유의한 차이는 없었다($p= 0.84$)(Table 3).

Table 3. Comparison of the incidence of apoptosis according to the number of oocytes retrieved

No. of oocytes retrieved	No. of cycles	Age (mean)	No. of oocytes used for assay	Fertilization rate (%) Mean±SEM	Incidence of apoptosis (%) Mean±SEM
≤5	10	35.3	23	64.3±13.2	1.13±0.19*
6-10	9	30.2	23	70.4±11.5	0.63±0.12*
>10	15	31.8	45	72.9± 8.5	**0.77**±0.11

p-value	<0.05	0.84	0.07

* p <0.05 (vs both group)

2. 수정과 난구세포의 세포고사 발생빈도와의 관계

난구세포의 세포고사 측정에 이용한 91**개의 난자 가운데** 28**개 난자가 미수정되었다**. **수정된 난자로부터 유래된 난구세포의 세포고사 발생빈도는** 0.43±0.07%**로서 미수정난자로부터 유래된 난구세포의 발생빈도** 1.80±0.35%**보다 유의하게 낮았다**(p<0.001) (Fig. 3).

3. 난구세포의 세포고사가 배아등급에 미치는 영향

체외수정과 체외배양을 거쳐 얻어진 배아의 87.3%(55/63)**는** grade A **및** B**의 양질의 배아였으며**, grade D**의 배아는 전혀 발견되지 않은 만큼 본 연구에서 이용된 배양조건이 체외수정시술을 수행하기에 적합하였다는 것을 시사하고 있다**. **난구세포의 세포고사 발생빈도는** grade A**에서** 0.24±0.06%, grade B**에서** 0.42±0.12%, grade C**에서** 1.18±0.23%**로 각 군간에 유의한 차이가 있었다**(p<0.001)(Table 4).

Fig. 3. Comparison of the incidence of apoptosis between fertilized and unfertilized oocytes.
A : Fertilized oocytes group (n=63), B : Unfertilized oocytes group (n=28).
n ; the number of oocytes used for apoptosis assay.
*Mean±SEM
* p<0.001

Table 4. Incidence of apoptosis according to grades of embryo

Embryo grades	No. of oocytes used for assay	Incidence of apoptosis(%) Mean±SEM
A	40	0.24±0.06*
B	15	0.42±0.12*
C	8	1.18±0.23*
D	-	-

* p<0.001 (vs each group)

4. 체외수정시술 결과와 세포고사 발생빈도와의 관계

수정률과 세포고사 발생빈도는 임신군과 비임신군간에 유의한 차이를 보였는데, 수정률은 임신군에서 93.3±2.9%로 비임신군의 62.2±7.8%에 비해 훨씬 높았으며(p<0.05), 난구세포의 세포고사 빈도는 임신군에서 0.44±0.11%로 비임신군의 0.81±0.10%보다 유의하게 낮았다(p<0.05). 그러나 연령, 회수된 난자 수 및 시술 주기당 이식된 배아 수에 있어서는 양 군간에 유의한 차이가 없었으며 체외수정시술 주기 당 임상적 임신율은 29.4%(10/34)였다(Table 5).

Table 5. Comparison of parameters between pregnant and nonpregnant group following IVF-ET

	Pregnant	Nonpregnant	*p*-value	
No. of cycles	10	24		
Age(mean)	30.5	33.2	0.115	
No. of oocytes retrieved/cycle	10.2	10.5	0.114	
No. of oocytes used for assay	27	64		
Fertilization rate(%)*	93.3±2.9	62.2±7.8	<0.05	
Incidence of apoptosis(%)*	0.44±0.11	0.81±0.10		<0.05
No. of embryos transferred/cycle*	4.7±0.6	5.2±0.5		0.561

* Values are mean±SEM

5. 공배양에 이용된 난구세포의 상태와 체외수정시술 결과의 비교

공배양에 이용된 난구세포의 상태, 즉 증식력이나 형태적 변화 등의 세포의 체외활성도는 착상률 및 임신율에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 난구세포의 체외활성도가 높은 group I에서는 착상률이 12.1%, 임신율이 40.0%로 체외활성도가 낮은 group II의 6.8% 및 21.1%에 비해 유의하게 높았다(p<0.05). 그러나 연령, 채취된 난자 수, 수정률, 배아등급 및 이식된 배아 수는 난구세포의 체외활성도에 영향을 미치지 않았다(Table 6).

6. 난구세포의 체외활성도에 따른 난구세포의 세포고사 발생빈도와 단백질분비 양상

체외수정시술시 난구세포의 체외활성도와 세포고사 발생빈도와의 상관관계를 조사하였다. 난구세포의 세포고사 발생빈도는 group I에서 0.56±0.13%이며, group II에서 0.86±0.10%로 양 군간에는 유의한 상관관계가 발견되지 않았다(p=0.063)(Fig. 4).

공배양의 보조세포가 분비하는 배아영양조절 인자(embryotrophic factor)에 의해 공배양의 효과가 영향을 받으므로 난구세포의 상태에 따른 단백질 분비 양상의 차이를 35S-methionine을 이용하여 metabolite labeling시켰다. Fig. 5에서 감광 전의 gel(panel B)과 감광 후의 X-ray 사진(panel A)을 비교할 때 난구세포는 metabolite labeling후 24시간 배양되면서 여러 종류의 단백질을 생성, 분비하였으며, 분비된 단백질의 양상은 난구세포의 체외활성도에 따라 다르게 나타났다. 체외활성도가 높은 난구세포(lane 1, 3)의 경우 주로 200Kd, 130Kd, 및 100Kd의 근처 위치에서 활성도가 낮은 난구세포(lane 2, 4)에 비해 단백질 생성이 현저하게 증가하였으나 38Kd과 30Kd 이하의 세 부분(a,b,c)에서 lane 3의 난구세포가 가장 많은 양의 단백질을 생성하였으며, lane 4의 난구세포에서는 단백질 생성이 거의 없었다.

Table 6. The relationships between the status of cumulus cells and the outcome of IVF-ET

Status of cumulus cells	Group I	Group II	*p*-value
Age(mean)	31.3	32.3	0.502
No. of cycles	15	19	
No. of oocytes retrieved/cycle	9.0	10.5	0.426
Fertilization rate(%)*	74.2±9.5	72.8±7.6	0.905
Quality of embryo			
A	44/63(68.2%)	60/91(65.9%)	
B	10/63(15.8%)	14/91(15.3%)	0.766
C	7/63(11.1%)	13/91(14.2%)	
D	2/63(0.03%)	4/91(0.04%)	
No. of embryos transferred/cycle*	4.7±0.6	5.2±0.5	0.487
Implantation rate(%)a	12.1	6.8	<0.05
Pregnancy rate/cycle(%)b	40.0	21.1	<0.05

* Values are mean±SEM

a: Defined as the total number of visualized gestational sacs with fetal cardiac activity divided by the total number of embryos transferred in each treatment group.

b: Included in clinical pregnancy defined as visualization of an intrauterine sac with ultrasonography.

Fig. 4. The relationship between status and apoptotic incidence of cumulus cells.
n ; the number of oocytes used for apoptosis assay.
* Mean±SEM
* p=0.063

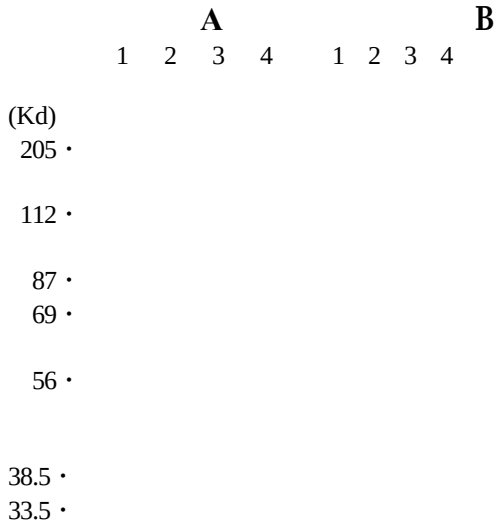

Fig. 5. Secretion pattern of cumulus cells used for co-culture. Group I cumulus cells(lane 1,3) and group II cells(lane 2,4) were labeled in [35S]-methionine. After 2 hours chase and 24 hours pulse, the supernatant was collected and analyzed by SDS-PAGE and fluorography(panelA).Justbeforefluorography,SDS-PAGE gel stained with commassie blue and dehydrated and amplified(panelB). On left side, values represent molecular weight of prestained markers. Arrows indicate different proteins in secretion pattern according to cumulus cells.

고 찰

성공적인 체외수정시술을 위하여 우수한 난자를 얻는 것도 중요한 요인이나 배란유도로 얻어진 난자의 질이 우수한 것인지를 정확히 평가하는 것 또한 중요하다. 최근 세포고사가 난소의 기능과 밀접한 관계를 가진 것으로 보고되면서,25 Nakahara 등(1997a)은 과립세포의 세포고사 발생빈도를 난자 질의 평가에 이용하였다.26 그러나 이들 실험에 이용한 과립세포는 한 개의 난포로부터 독립적으로 분리한 것이 아니라 많은 난포로부터 유래된 것이므로 과립세포의 세포고사를 난자 각각의 질과 직접적으로 연관시키기가 부적절하며, 난자 역시 여성의 연령에 따라 세포고사의 발생빈도가 달라지는데,21,27 Nakahara 등(1997a)은 이를 고려하지 않았다.28 그러므로 본 연구에서 각 난자로부터 제거한 난구세포의 세포고사 발생빈도를 기초로 한 난자 질 평가체계는 난자 각각의 질을 평가하는데 더 효과적이라 할 수 있을 것이다.

보조생식술을 받는 여성의 연령은 임신의 성공을 결정하는 중요한 인자중의 하나로서 연령이 35세 이상일 경우 인공수정에 의한 임신성공율은 35세 이하에 비해 2.5배 정도 낮았으며,29 난자공여 프로그램을 이용한 체외수정시술에 있어서도 40세 이상 여성으로부터 난자를 공여받았을 경우 임신율이 현저하게 감소하였다.30 이와 같은 나이에 따른 임신율의 감소 원인으로 다음과 같은 몇 가지의 학설로 설명되고 있다. 첫째로는 난소기능의 저하로 난자의 질이 저하되어 수정률이 감소하고 배발생률이 감소한다는 것이며,31,32 둘째로는 자궁의 기능 퇴화로 착상력이 감소한다는 것이다.33 이러한 두 가지 학설 모두 충분한 설득력이 있으나 아직도 많은 논란의 대상이 되고 있다.34 그러나 노화된 생쥐는 난포내 환경의 변화로 핵성숙이 억제된 비정상적인 난자와 DNA의 단편화된 고사 난자를 생성하며,27,35 저하된 난소기능(월경주기 제 3일째 FSH>10mIU/ml)을 지닌 여성이 체외수정술을 받는 경우 정상적인 난소기능(월경주기 제 3일째 FSH<6mIU/ml)이 있는 여성에 비해 난소내 세포의 세포고사 발생빈도가 증가한다는 것이 최근 보고되면서,21 여성의 연령에 따른 난소기능의 저하가 수태능력을 감소시킬 것이라는 이론에 설득력이 더해지고 있다. 본 연구에서도 41세 이상의 연령에서는 난구세포의 세포고사의 발생빈도가 40세 이하에 비해 유의하게 높았고, 수정률은 현저하게 감소하였다. 세포고사 발생빈도에 따른 수정률 및 수태능력의 감소효과는 본 연구에서도 더욱 분명하게 나타나고 있는데, 미수정난자로부터 유래된 난구세포의 세포고사 발생빈도가 수정난자의 경우보다 현저하게 증가하였으며, 배아의 등급 역시 난구세포의 세포고사가 증가함에 따라 저하되었다. 또한 임신군은 비임신군에 비해 높은 수정률을 보인 반면, 세포고사 발생빈도는 오히려 2배 정도 낮았다. 이러한 결과들은 연령에 따른 난구세포의 세포고사의 증가로 인해 난포성장과 수정에 부적합한 미세환경이 조성되고 그로 인해 난자 질이 악화되어 수정능력과 배발생능력이 감소되었음을 의미하며, 한편으로는 여성 연령의 고령화에 따른 수태능력의 감소가 난구세포의 세포고사의 증가와 관련이 있음을 시사하고 있다.

Nakahara 등(1997a)은 난구세포의 세포고사가 과립세포보다 난자의 질을 평가하는데 부적절하다고 발표하였으나26 본 연구에서는 그것이 난자의 수정과 배발생능력 등 체외수정시술 결과와 유의한 상관관계가 있었으며, 이러한 차이는 세포고사 검색방법에 기인한 것으로 생각된다. Nakahara 등(1997a)은 H33258 형광염색법으로 응축된 핵을 관찰한 반면26 본 연구에서 단편화된 kit를 이용한 DNA의 3'-OH 말단을 인지하는 방법을 이용하였기 때문에 H33258 방법보다 민감도가 높으며, 실제로 본 연구에서도 H33258을 이용하여 난구세포의 apoptotic body를 검색하였으나 정상세포와 고사세포의 구별이 용이하지 않았다.

또한 Nakahara 등(1997a)은 과립세포의 세포고사 발생빈도가 높을 경우 채취된 난자 수가 감소하였으며,26 이러한 난자 수의 감소가 난포발달 동안 발생한 과립세포의 세포고사로 인해 난자가 소실되어 빈 난포만 남기 때문이라고 지적하였다(1997b).36 그러나 본 연구에서는 난구세포의 세포고사 발생빈도가 난자 수 5개 이하인 군에서 높았을 뿐 채취된 난자 수와는 유의한 상관관계가 발견되지 않았다. 난구세포는 난자와 지속적으로 상호작용을 하면서 과립세포로부터 분화하고 난자와 함께 배란되는 세포로서 과립세포처럼 퇴화되는 난포로부터 유래되지 않는다. 따라서 난구세포의 세포고사 빈도는 난포의 퇴화 때문에 생기는 난자 수의 소실과는 관계가 없으므로 난구세포를 이용한 본 연구에서는 회수된 난자 수에 따른 유의한 차이가 나타나지 않았다.

지난 10여년 동안 배양조건을 개선함으로써 배아 질과 착상력을 향상시키려는 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 그러한 연구들 가운데 하나가 배아의 공배양이다.37 Weimer 등(1989 ; 1993)에 의해 난관에서 자궁속으로 배아가 흘러 들어가는 in vivo의 생리적 환경을 모방하기 위해 자궁

또는 난관상피 세포를 인간 배아의 공배양에 처음으로 이용한 이후,38,39 현재는 자궁, 난관, 난소 등의 생식계 유래의 세포는 물론 콩팥,40 비장,41 간42 및 암세포43 등의 비생식계통의 세포에 이르기까지 다양한 세포가 공배양의 보조세포로 사용되고 있다. 그러나 이들 대부분의 세포들을 이용하는데는 다음과 같은 많은 문제점들이 있다. 첫째는 조작에 많은 시간이 요구되며, 둘째는 세포주 유지를 위한 계대배양 과정이 간단하지 않고, 셋째는 동물세포에서 유래되는 보조세포를 이용할 경우 미생물 오염이나 바이러스 감염 등의 윤리적 문제가 야기될 가능성이 있으며, 넷째는 계대배양을 계속할 경우 대부분 세포들이 세포 자신의 특성을 일정하게 유지하기 어렵고 성장양상이 변화되어 배발생에 적합한 자연적 in vivo 환경을 조성하기에 다소 부적합하다. 그러므로 본 연구에서의 난구세포를 이용한 공배양술은 간단하면서도 체외수정시술 대상자 자신의 난구세포를 이용할 수 있어 윤리적 문제를 쉽게 해결할 수 있고, 난구세포가 배란전후에도 난자와 지속적으로 상호작용을 하여 수정과 초기 배발생에 필요한 생리적 환경이 충분히 반영될 수 있다는 점에서 매우 효과적이라 판단된다. 이미 몇몇 연구자들은 이러한 난구세포의 장점을 인식하여 공배양의 보조세포로 난구세포를 활용하여 좋은 결과를 얻었으나, 이들은 공배양에 이용되는 보조세포의 상태에 대해서는 언급하지 않았다.44,45

Palchot 등(1993)은 공배양이 이로운 효과를 내기 위해서는 최소한의 건강한 보조세포가 필요하다고 주장했으며,46 Watson 등(1994)은 보조세포의 미세한 특성이 공배양의 효과에 영향을 미칠 수 있다고 보고하였고,47 본 연구에서도 공배양에 이용된 난구세포의 체외활성도에 따라 체외수정시술의 결과에 차이가 있었다. 이러한 원인으로 우리는 먼저 난구세포의 세포고사 발생빈도와 세포상태를 비교하였는데 난구세포의 세포고사와 세포상태간에는 뚜렷한 상관관계를 발견할 수 없었다. 이는 공배양에 이용된 난구세포의 세포고사 발현빈도가 대부분 세포 전체의 1% 미만이어서 세포고사가 공배양의 결과에 직접적으로 영향을 미치지 못하는 것 같다.

난구세포의 활성도에 따른 공배양의 다른 결과가 나타나는 또 하나의 원인으로 난구세포가 분비하는 물질, 특히 단백질 수준에서의 차이를 고려할 수 있다. 본 연구에서 난구세포를 metabolite labeling한 결과 난구세포의 상태에 따라 단백질의 분비 양상과 분비된 단백질의 양에서 차이가 발견되었다. 이러한 결과는 세포 종류에 따라 서로 다른 종류의 인자들이 분비되거나 특정인자들의 생성정도가 다를 수 있기 때문에 공배양에 있어서 보조세포의 상태가 매우 중요하다는 Feng 등(1996)의 결과와 일치하는 것으로,48 활발한 세포분열을 하면서 높은 체외활성도를 지니는 난구세포는 배아영양조절 인자 등의 특정 인자를 다량 분비함으로써 배아 발달에 이로운 효과를 제공할 수 있음을 의미하고 있다.

초기 배아는 단순배지에서도 포배아까지 발생할 수도 있으나 체내에 비해 배발생 속도가 느릴 뿐 아니라 세포수가 부족한 포배아를 생성하기 때문에 정상적인 배발달을 위해서는 EGF(MW: 7Kd), IGF-1(MW: 7Kd) 및 fibroblast growth factor(MW: 13Kd) 등과 같은 부수적인 특정 paracrine 인자들이 요구되고 있으며,49 공배양은 이러한 부족한 배아영양조절 인자를 생성함으로써 적절한 배양조건을 유도하는 것으로 알려져 있다.37 난구세포는 과립세포에 비해 배아영양조절 인자의 하나인 IGF-1의 발현이 높은 것으로 알려져 있으며,50 배아영양조절 인자로 알려진 대부분의 성장인자의 분자량은 30Kd 이하의 저분자이다. 이에 반해 이러한 성장인자의 수용체는 130Kd 정도의 고분자로 초기 배아에는 성장인자 수용체가 존재하고 있어 특정 성장인자에 대해 효과적으로 반응하는 것으로 알려져 있다.51 본 연구에서도 난구세포의 metabolite labeling 결과 30Kd 근처와 130Kd 근처에서 서로 다른 단백질 분비 양상을 보이고 있으나 이러한 단백질들이 배아영양조절 인자로 알려진 성장인자나 성장인자 수용체 중의 하나인지, 또는 이러한 단백질 분비양상의 차이가 공배양의 결과와 어떤 관계가 있는지에 대해서는 밝히지 못했다. 그러나 전반적으로 체외활성도가 낮은 난구세포에서 체외활성도가 높은 난구세포에 비해 단백질 생성량이 적게 나타나고 있다는 것은 단백질 수준에서의 배아영양조절 인자의 생성량 차이 때문에 난구세포의 체외활성도에 따른 공배양의 효과가 다르게 유도될 것이라는 가능성을 시사하고 있다.

지금까지 공배양의 효과에 대해 거론되고 있는 기전으로는 1) 보조세포에 의해 생성되는 성장인자나 cytokines 및 그외 다른 단백질 등의 배아영양조절 인자 생성, 2) 불필요한 toxin이나 금속이온 등의 제거, 3) 세포내 배양액의 산소분압 감소, 4) 이러한 요인들의 상호작용 등이 있다. 따라서 본 연구에서 얻어진 공배양의 효과가 반드시 배아영양조절 인자에 의해서 나타난 것으로 단정하기는 어려우며, 어떤 요인에 의해 결정되는지에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

결론적으로 체외수정시술시 얻어지는 난구세포는 세포고사 발생빈도의 측정을 통해 난자 개개의 질을 평가할 수 있는 유용한 재료로 활용될 수 있으며, 또한 적합한 배양조건을 조성하기

위한 공배양의 보조세포로 활용할 수 있다는 근거를 마련했다는 점에서 본 연구의 의미가 있다고 생각한다.

결 론

저자들은 체외수정시술시 채취한 난구세포로부터 세포고사의 발생빈도를 ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kit Fluorescein(Oncor Inc.) 방법으로 측정하여 난자 질의 평가체계를 마련하고, 공배양시 난구세포의 상태가 공배양의 결과에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 41세 이후의 연령에서 난구세포의 세포고사 발생빈도는 현저하게 증가하였고, 수정률은 크게 감소하였다.
2. 수정난자와 미수정난자 모두에서 유래된 난구세포에서 세포고사가 관찰되었으나, 미수정난자로부터 유래된 난구세포에서 세포고사 발생빈도가 더욱 높았다.
3. 난구세포의 세포고사는 채취된 난자 수와는 뚜렷한 상관관계가 없었으나, 5개 이하군에서 6-10개인 군에 비해 높은 빈도로 발생하였다.
4. 체외수정후 배아의 등급은 난구의 세포고사 발생빈도에 영향을 받는 것으로 나타났다.
5. 체외수정시술의 주기당 임신율은 29.4%였으며, 임신군은 비임신군에 비해 수정률은 높았고, 난구세포의 세포고사 발생빈도는 현저하게 감소하였다.
6. 난구세포를 이용한 공배양에서 난구세포의 증식력이나 모양변화에 따른 체외활성도는 배아의 질에는 영향을 미치지 않았으나 착상률 및 임신율과 밀접한 상관관계가 있어 난구세포의 체외활성도가 높은 군에서 착상률과 임신율이 유의하게 높았다.
7. 공배양시 난구세포의 체외활성도에 따른 체외수정시술 결과의 차이는 세포고사 발생빈도와 관련이 없었으며, 오히려 난구세포의 단백질합성의 양적 차이에 기인하는 것으로 사료되었다.

이러한 결과는 난구세포의 세포고사 빈도가 난자 질을 간접적으로 평가할 수 있는 좋은 재료로서 수정률을 포함한 체외수정의 결과를 예측할 수 있는 인자로 활용될 수 있으며, 체외활성도가 높은 난구세포를 공배양에 이용할 경우 공배양의 효과가 더욱 증대될 수 있음을 시사하고 있다. 따라서 본 연구는 개개의 난자 질을 평가하고, 적합한 배양조건을 조성하기 위한 공배양의 보조세포로서 난구세포를 활용할 수 있다는 근거를 마련했다는 점에서 매우 의미있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Edwards RG: Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 1965, 2, 926-9.

2. Steptoe PC, Edwards RG : Birth after the reimplnatation of a human embryo. *Lancet* 1978, 2, 336-40.

3. Almedia P, Bolton V: Immaturity and chromosomal abnormalities in oocytes that fail to develop pronuclei following insemination in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8, 229-32.

4. Angell R, Xian J, Keith J: Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Hum Reprod* 1993, 8, 1047-54.

5. Almedia P, Bolton V: The relationship between chromosomal abnormalities in the human oocyte and fertilization in vitro. ***Hum Reprod*** 1994, 9, 343-6.

6. Bar-Ami S, Zlotlin E, Joseph MB, Joseph IE: Failure of meiotic competence in human oocytes. *Biol Reprod* 1994, 50, 1100-7.

7. Liu HC, Lai YM, Davis O, Berkely A, Graf M, Grifo J, *et al*: Improved pregnancy outcome with gonadotropin releasing hormone agonist(GnRHa) stimulation due to the improvement in oocyte quantity rather than quality. *J Assist Reprod Genet* 1992, 9, 338-44.

8. Acosta AA, Moon SY, Oehninger S, Muasher SJ, Rosenwaks Z, Matta JF: Implantation potential of each embryo in multiple pregnancies obtained by in vitro fertilization seem to be different. *Fertil Steril* 1988, 50, 906-11.

9. Tesarik J: Viability assessment of preimplantation conceptus: a challenge for human embryo research. ***Fertil Steril*** 1989, 54, 364-6.

10. Veeck L: Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci* 1988, 541, 259-74.

11. Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC: The relationship between embryo quality and multiple pregnancies. *Fertil Steril,* 1992, 57, 626-30.

12. Hughes FM, Gorospe WC: Biochemical identification of apoptosis(programmed cell death) in granulosa cell: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991, 129, 2415-22.

13. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJW: Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 1992, 6, 1942-50.

14. Eisenhaure KM, Chun SY, Billing H, Hsueh AJW: Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. ***Biol Reprod*** 1995, 53, 13-20.

15. Meikrantz W, Schlegel R: Apoptosis and the cell cycle. *J Cellular Biochem* 1995, 58, 160-74.

16. Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 1997, 88, 355-65.

17. Tilly JL, Kowalski KIN, Johnson AL, Hsuch AD: Involvement of apoptosis in ovarian follicle atresia and postovulatory regression.*Endocrinology*1991,129,2799-801.

18. Hurwitz A, Adashi EY: Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed

cell death in endocrine tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1992, 84, C19-C23.

19. Palumbo A, Yeh J: In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol Reprod* 1994, 51, 888-95.

20. Murdoch WJ: Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod* 1995, 53, 8-12.

21. Seifer DB, Gardiner AC, Ferreria KA, Pelsuso JJ: Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996, 66, 593-8.

22. Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien M, Pendola FJ, Watanabe S, *et al*: Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* 1997, 12(Suppl), 127-32.

23. Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parsons JH: Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rate, and development to blastocyst. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1989, 6, 30-36.

24. Laemini UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-5.

25. Tilly JL: Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1996, 1, 162-72.

26. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Sakai N, *et al*: Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of patients participating in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1997a, 67, 302-8.

27. Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, Ito F, Matsuoka I, Hayashi E, *et al*: DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum Reprod* 1996, 11, 180-3.

28. Tilly JL: Apoptosis and the ovary: a fashionable trend or food for thought? *Fertil Steril* 1997, 67, 226-8.

29. Agarwal SK, Buyalos RP: Clomiphene citrate with intrauterine insemination: is it effective therapy in women above the age of 35 years? *Fertil Steril* 1996, 65, 759-63.

30. Marcus SF, Brinsden PR: In vitro fertilization and embryo transfer in women aged 40 years and over. *Hum Reprod* 1996, 11, 459-68.

31. Lim AST, Tsakok MFH: Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertil Steril* 1997, 68, 265-71.

32. Keefe DL, Niven-Fairchild T, Buradagunta S: Mitochondrial deoxyribonucleotide acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril,* 1995, 64, 577-83.

33. Laven D, Ben-Shlomo I, Dor J, Ben-Rafaea Z, Novel L, Mashiach S: Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model. *Fertil Steril* 1991, 56, 1091-4.

34. Meldrum DR.: Female reproductive aging, ovarian and uterine factors. *Fertil Steril, 1*993, 59, 1-5.

35. Eppig JJ, O'Brien M: In vitro maturation and fertilization of oocytes isolated from aged mice : A strategy to rescue valuable genetic resources. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12, 269-73.

36. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T, *et al*: The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in an in

vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 1997b, 68, 312-7.

37. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S: The search for improved in-vitro systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Hum Reprod* 1993, 8, 1155-62.

38. Weimer KE, Cohen J, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, *et al*: In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum Reprod* 1989, 4, 595-600.

39. Wiemer KE, Hofman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, *et al*: Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* 1993, 8, 97-101.

40. Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC: Improvement of human early development in vitro co-culture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990, 42, 301-6.

41. Kim HK, Roussel JD, Amborski GF, Hu YX, Godke RA: Monolayers of bovine spleen cells and chick embryo fibroblasts for co-culture of bovine embryos. *Theriogenology* 1989, 31, 212-5.

42. Rehman N, AR. Collins TK, Suh RW. Wright Jr: Development of IVM-IVF produced 8cell embryos in simple, serum free media after conditioning or co-culture with buffalo rat liver cells. *Mol Reprod Dev* 1994, 38, 251-5.

43. Ben-Chetrit A, Jurisicova A, Casper RF: Co-culture with ovarian cancer cell enhances human blastocyst formation in vitro. *Fertil Steril* 1996, 65, 664-6.

44. Quinn P: Use of co-culture with cumulus cells insemination medium in human in vitro fertilization(IVF). *J Assist Reprod Genet* 1994, 5, 270-7.

45. Saito H, Hirayama T, Saito T, Nohara M, Hiroi M: Cumulus mass maintain embryo quality. *Fertil Steril* 1994, 62, 555-8.

46. Palchot M, Antonine JM, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J: Granulosa cells improve human embryo development in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8, 2133-40.

47. Watson AJ, Watson PH, Warner D: Pre-implantation development of in vitro matured and in vitro fertilized ovine zygotes comparison between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biol Reprod* 1994, 50, 715-24.

48. Feng HL, Wen XH, Amet T, Presser SC: Effect of different co-culture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 1996, 11, 1525-8.

49. Paria BC, Dey SK: Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad USA* 1990, 87, 4756-60.

50. Zhou J, Chin E, Bondy C: Cellular pattern of insulin-like growth factor-I(IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocinology* 1991, 129, 3281-8.

51. Chia CM, Winston RML, Handyside AH: EGF, TGF-α and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development*, 1995, 121, 299-307.