

인간 난관 상피세포와의 공동배양이 생쥐와 인간수정란의 체외발달에 미치는 영향에 관한 연구

차병원 여성의학연구소

고정재 · 정미경 · 도병록 · 엄기봉 · 윤태기 · 차광열

Early Mouse and Human Embryonic Development *in vitro* by Co-culture with Human Oviduct Epithelial Cells

J.J. Ko, M.K. Chung, B.R. Do, K.B. Oum, T.K. Yoon and K.Y. Cha

*Department of Obstetrics and Gynecology, Infertility Medical Center of
Cha Women's Hospital, Seoul, Korea*

= Abstract =

We examined effects of co-culture with human oviduct epithelial cells (HOEC) on the development of mouse and human embryos from early embryonic stage to late morula or blastocyst stage (LM or B). In human, embryos were transferred and pregnancy rate was investigated. The HOEC, collected from surgically removed fallopian tube, were cultured in medium-199 supplemented with 20 % fetal cord serum (FCS). The HOEC were characterized by using immunocytochemical staining with anticytokeratin antibody and then used for cultures of mouse and human embryos. Results obtained from co-culture system were as follows. Development rate of mouse embryos was improved by co-culture system at late developmental stage ($p < 0.025$). Human supernumerary embryos remained after transfer, unsuitable for freezing because of their poor quality, were co-cultured for 72hrs. Co-culture (78.79 %) or conditioned medium (78.26 %) system improved the development rate, significantly, in comparison with control (11.11 %) ($p < 0.001$). Co-cultured (85.71 %) human zygotes for 24hrs showed the better development rate in comparison with control (50.00 %) ($p < 0.01$). When we transferred embryos cultured with the HOEC to patients, we obtained one pregnancy. Co-cultured human zygotes for 24hrs showed the better quality and viability for the replacement in comparison with control ($p < 0.01$). In addition, improved pregnancy rate was obtained. Our results suggest that the co-culture system can rescue early degenerating embryos by improving early development and yield a reasonable number of blastocyst for the appropriate replacement. The effect provided by cultured HOEC is not species specific for the development of embryos and it can be used to overcome *in vitro* blocks for the development. And also the co-culture system offers the possibility to freeze embryos at blastocyst stage which is more successful stage for the freezing. The HOEC monolayer may provide some stimulus via specific factor, which is unknown, to the development of embryos. Our results showed that the co-culture system with HOEC can be an alternative to conventional culture system.

본 논문의 요지는 1991년 10월 미국 플로리다주에서 열린 제47차 미국불임학회(American Fertility Society)에서 발표되었음.

서 론

현재까지 체외 수정을 통한 임신 성공률의 향상에는 큰 진전을 보고하지 못하는 실정이며, 이것은 체외에서의 배양의 부적절함이 큰 요인으로 작용하는 것으로 보고되어져 왔다. 체외 배양시 적합한 조건, 즉 초기배 발달을 좌우하는 요소들에 대한 다양한 연구가 이루어져 오고 있으나 아직까지 체내와 유사한 배양 조건의 확립에 관해서는 미비한 실정이다.

이러한 배양조건에 관한 연구중 최근에와서 생식기관(reproductive organ)으로 부터 얻은 세포와 공동배양(co-culture)하여 배발달을 증진시키는 연구가 진행중이다. 공동 배양에는 자궁(Goodeaux et al., 1989)이나 난관 또는 trophoblastic (Camous et al., 1984) 세포등이 사용되어 왔으나, 특히 난관 상피세포(oviduct epithelial cell)가 인간을 포함하여 돼지, 소, 양 등의 배발달에 좋은 효과를 미치고 있는 것으로 보고 되고 있다(Bongso et al., 1989; White et al., 1989; Eyestone and First, 1989; Gandolfi and Moor, 1987). 이들의 보고들에 따라 현재 실시되고 있는 사람의 체외에서 난관내와 유사한 환경조건을 유도해줌으로써, 질적으로 좋은 상태의 수정란을 생산할 수 있으며 더 많은 상실배(morula)나 배반포(blastocyst)와 같은 uterine stage의 수정란을 획득할 수 있을 것이다. 덧붙여 지금 실시하고 있는 2-4세 포기의 이식보다 더욱 적당한 시기인 상실배나 배반포에서 이식을 실시함으로써 높은 임신율을 얻을 수 있을것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 먼저 생쥐 수정란에 미치는 HOEC의 효과를 확인한 후 이를 인간에 적용하여 수정란의 생존 및 발달에 미치는 영향을 조사하며, 체외에서 수정된 수정란의 배양을 위한 최적조건을 확립하고, 인간 체외수정 프로그램에 있어서 임신성공율을 높이기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. HOEC의 준비

본원에서 외과적으로 제거된(surgically removed) 난관을 제공받아 상피세포를 회수하였다. 난관 상피세포는 세질한 난관표면을 scrap하고, 0.25% collagenase (Type 1: SIGMA, USA)

로 처리한 뒤 ficoll (Histopaque 1077, SIGMA)로 분리하였다. 분리된 세포는 Phosphate buffered saline (PBS)으로 2-3회 세척 (300×G, 5min)한뒤, 4 well-multidish (Nunc)에 20% FCS가 함유된 TCM 199 배양액을 이용하여 2×10^5 의 농도로 배양하였으며, 배양액은 2-3일 간격으로 교환하여 주었다.

2. Immunocytochemistry에 의한 HOEC의 검정

Ouhibi등(1990)의 방법을 수정하여 monolayer가 형성된 상피세포를 확인하였다. 4-well multidish에 cover-slip을 넣고 cover-slip 표면에 monolayer가 형성되도록 위의 방법과 같이 유도한 뒤에, PBS로 세척하고 37°C에서 5분동안 고정액(fixation buffer)(0.25% Glutar aldehyde)에 침지하여 고정한 후, PBS로 세척했다. 이어서 0.25% Triton X-100으로 20분간 처리하고 PBS로 다시 세척후 고정액으로 한번 더 고정하고, 37°C에서 1시간동안 mouse monoclonal anti-cytokeratin antibody (clone K 8.13, SIGMA, USA)를 처리하였다. PBS에 1st antibody를 충분히 세척한 뒤 goat anti mouse IgG biotin conjugate (B 6649, Sigma, USA)를 1시간동안 처리하였다. 그뒤, PBS로 다시 세척하고 FITC-conjugate extravidin (E 2761, Sigma)처리를 30분동안 실시하였다. PBS로 반복해서 세척한뒤 cover-slip을 깨끗한 slide glass에 올려놓고 epi-fluorescence microscope (Zeiss)에서 관찰하였다.

3. 생쥐 수정란의 공동배양

생쥐 수정란은 그림 1에 나타낸 바와 같이 통상적인 방법에 준하여 2세포기 수정란을 회

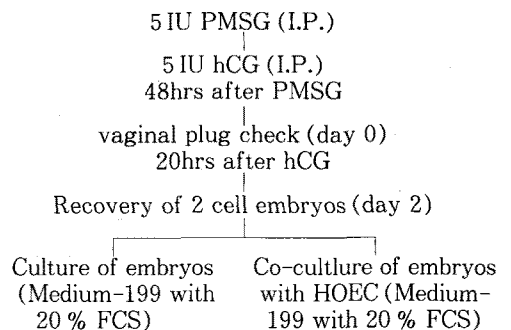


Fig. 1. Outline of experimental procedure in mouse.

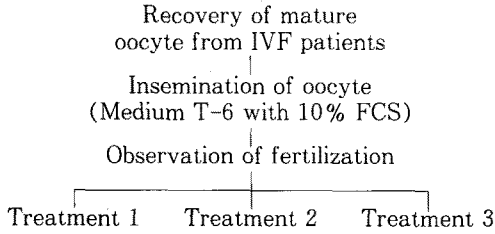


Fig. 2. Outline of experimental procedure in human.

Treatment 1: Human supernumerary embryos after transfer, judged unsuitable for freezing because of their poor quality were co-cultured on HOEC for 72hrs and all embryos cleaved normally to LM or B were frozen.

Treatment 2: Human zygotes were co-cultured for 96hrs on HOEC monolayer or medium alone (Medium-199 with 20% FCS), and then transferred to IVF patients.

Treatment 3: Human zygotes were co-cultured for 24hrs on HOEC monolayer or medium alone (Medium-199 with 20% FCS), and then transferred to IVF patients.

수하여 공동배양을 실시하였다. 즉, 5IU의 PMSG를 자성 생쥐의 복강에 주사하고 (I.P.), 48시간 후에 hCG를 다시 5IU 주사함으로써 과배란 (superovulation)을 유도하였으며, hCG를 주사한날 저녁에 웅성 생쥐와 1:1로 합사시켜 교미 (mating)시키고 익일 아침에 질전 (vaginal plug)를 확인하고, 다음날 난관을 관류하고 2세포기의 수정란을 회수하여 HOEC와 공동배양을 실시하였다.

4. 인간 수정란과 접합자 (Zygote) 공동배양

Monolayer가 형성된 HOEC에 그림 2에 설명한 방법으로 공동배양을 실시하였다. treatment 1에서는 이식하고 남은 수정란 중 상태가 좋지 않아 냉동하기에 부적당하다고 판단된 경우의 난자를 72시간 배양하여 배반포까지의 발달률을 보고 냉동보관하였으며, treatment 2에서는 체외수정 프로그램에서 얻어진 접합자를 96시간 공동배양하여 역시 배반포까지 발달률을 보고 이식하였다. Treatment 3에서는 역시 체외수정 프로그램에서 얻어진 접합자를 24시간 공동배양한 뒤 발달 상태를 보고 이식하여 임신률을 보았다.

결 과

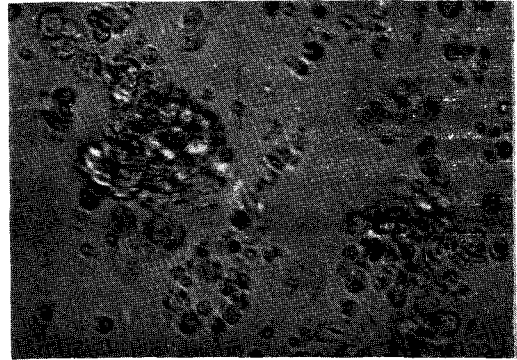


Fig. 3. Photograph of epithelial cell obtained from human oviduct. Most of the cells show microvilli ($\times 200$).

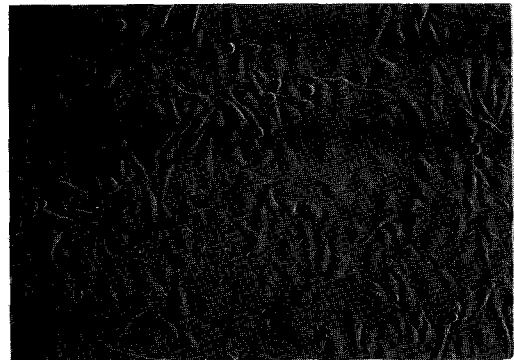


Fig. 4. Photograph of monolayered epithelial cell obtained from human oviduct ($\times 200$).

1. HOEC의 배양 및 확인

회수된 세포는 그림 3에서 보는 바와 같이 microvilli를 나타내어 monolayer 형성에 어려움이 있었으나, 일단 monolayer가 형성된 세포는 계대 배양하며 계속 사용할 수 있었다 (그림 4). 또한 간접 면역형광법 (indirect immunofluorescence method)을 이용한 세포의 관찰에서 keratin filament를 확인함으로써 우리의 실험에 사용한 세포가 상피세포임을 확인하였다 (그림 5).

2. HOEC와의 공동배양이 생쥐 수정란의 발달에 미치는 영향

생쥐 수정란의 발달에 미치는 HOEC의 영향을, 대조군으로 110개의 수정란을, 공동배양군으로는 85개의 수정란을 공시하여 조사하였다 (표 1). 상실배 (control: 96.36%; 공동배양: 98.82%와 배반포 (control: 89.09%; 공동배양: 94.12%)까지의 발달률에서는 커다란 차

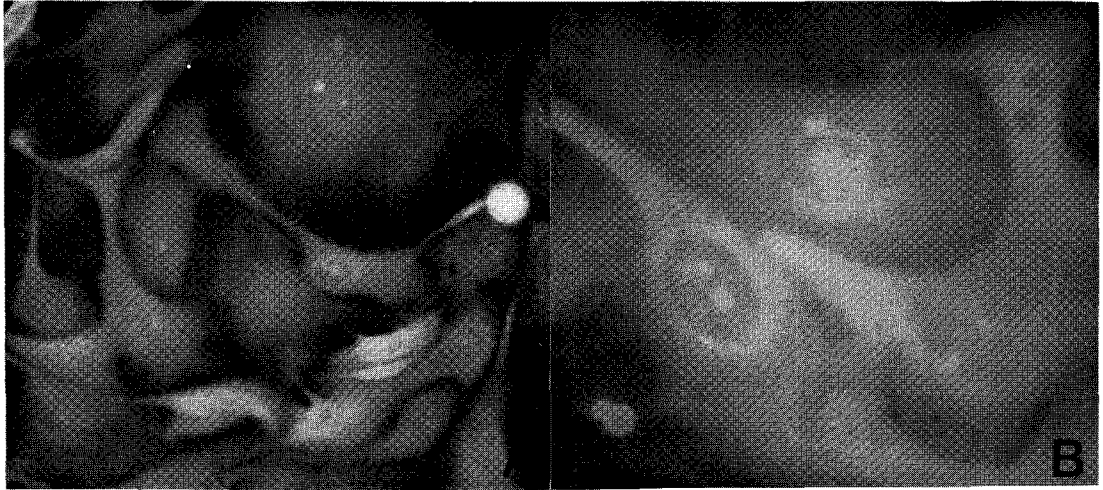


Fig. 5. Immunofluorescence staining of cultured HOEC for epithelial antigen (A; $\times 400$, B; $\times 1000$).

Table 1. Development of mouse embryos on epithelial cell monolayer

Treatment	No of embryos	Initial culture stage	No of embryos developed at each stage(%)			
			M.	B.	H.B.	A.
Control	110	2 cell	106 (96.36)	98 (89.09)	86 (78.18)	70 (63.64)
Co-culture	85	2 cell	84 (98.82)	80 (94.12)	77 (90.59)*	74 (87.06)**

*and **indicate significant differences at $p < 0.05$ and $p < 0.025$, respectively, compared to control.

M : Morula B : Blastocyst H : Hatched blastocyst A : Attachment

이를 보이지 않았으나 시간이 경과될수록 약간씩 차이를 나타내서 hatched blastocyst까지의 발달은 대조군 86개(78.18%), 공동배양군 77개(90.59%)로 약간의 차이를 보였으며($p < 0.05$), hatching후 attach되는 비율은 대조군 70개(63.64%) 및 공동배양군 74개(87.06%)로 커다란 차이를 보였다($p < 0.025$). 따라서, 비록 다른 종이지는 하나 HOEC로 공동배양 할 경우 생쥐 수정란의 발달에 좋은 영향을 주는 것을 확인할 수 있었으며, 배발달의 초기보다는후기로 갈수록 그 효과는 더 커짐을 알 수 있었다.

3. HOEC와의 공동배양이 인간 수정란의 발달에 미치는 영향

체외수정 프로그램에서 이식하고 남은 수정란 중 상태가 좋지않아 동결하기에 부적당하다고 판단된 경우의 난자들을 배양하여 나타난 결과는 표 2와 같다. 2-4 세포기의 수정란을 배양했던 결과 무처리 대조군에서는 총 27개의 난자중 24개가 발달이 정지되거나 퇴행(dege-

neration)되었으며, 단지 3개(11.11%)만이 상실배까지 발달하였다. 그러나 HOEC와 공동 배양하거나 배양된 세포의 상등액(conditioned medium)에서 배양했을 경우에는 각각 33개, 23개의 수정란 중 상실배나 배반포까지 각각 26개(78.79%)와 18개(78.26%)가 발달하여 대조군과 현격한 차이를 나타냈다($p < 0.001$). 그러나 직접 공동배양했던 경우와 conditioned medium에서 배양했을 때의 결과는 유의한 차이는 없었다. 이렇게 여분의 수정란으로부터 얻은 결과를 토대로 정상적인 체외수정 프로그램에 의해 얻어진 수정란을 2-4 세포기로 부터 공동배양하면서 그 발달율을 보았다. 배양 결과는 표 3에서 보는 바와같이 대조군에서는 단지 36개의 수정란 중 18개(50.00%)만이 상실배나 배반포까지 발달한 반면에, 공동배양군에서는 총42개의 수정란 중 6개(14.29%)만이 발달이 정지되거나 퇴행되었고 36개(85.71%)가 상실배나 배반포로 발달하였으며($p < 0.01$) 이를 5명에게 이식하여 1명의 임신을 확인하

Table 2. Development of human supernumary embryos on epithelial cell monolayer or cell conditioned medium

Treatment	No of embryos	Culture stage	Blocked or degenerated(%)	Mor.	Bla	Total (%)
Control	27	2-4 cell	24 (88.89)	3	0	3 (11.11)
Co-culture	33	2-4 cell	7 (21.21)	15	11	26* (78.79)
Conditioned	23	2-4 cell	5 (21.74)	11	7	18* (78.26)

*Indicates significant differences compared to control ($p < 0.001$)

Table 3. Development of human zygotes on epithelial cell monolayer for 96hrs

Treatment	No of embryos	Culture stage	Blocked or degenerated(%)	Mor.	Bla	Total (%)
Control	36	2PN	18 (50.00)	12	6	18 (50.00%)
Co-culture	42	2PN	6 (14.29)	9	27	36 (85.71%)

*Indicates the significant difference compared to control ($p < 0.01$)

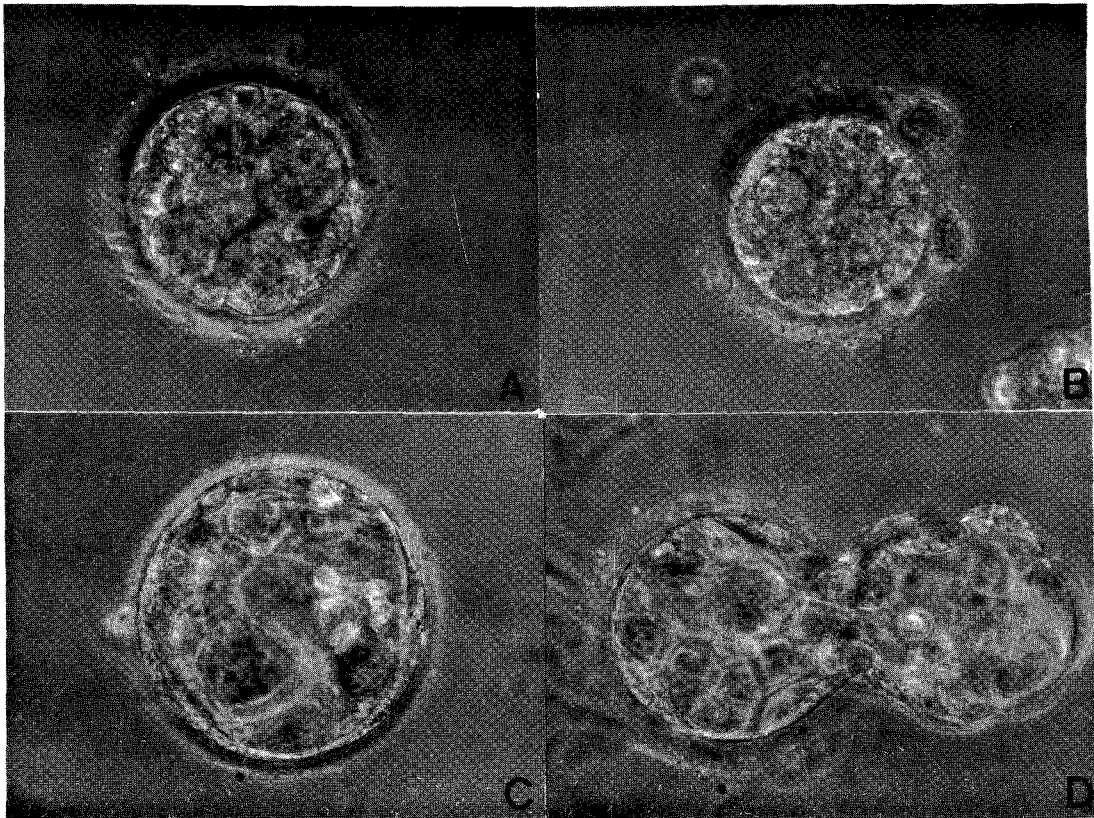


Fig. 6. Photographs of human embryos cultured on HIOEC (A; Morula, B; Cavitated blastocyst, C; Expanded blastocyst, D; Hatched blastocyst).

Table 4. Development of human zygote on epithelial cell monolayer for 24hrs

Treatment	No of embryos	Culture stage	2-4 cell embryos		Transferred patients	Pregnancy (%)
			Non-frag.(%)	Frag.(%)		
Control	59	2PN	39 (66.10)	20 (33.90)	14	3 (21.43)
Co-culture	47	2PN	42* (89.36)	5 (10.64)	10	5 (50.00)

*Indicates the significant difference compared to control (p<0.01)

였다(그림 6).

4. HOEC와의 공동배양이 인간 수정란의 발달상태 및 임신율에 미치는 효과

체외수정 프로그램에서 접합자의 발달 상태 및 임신에 미치는 영향을 조사하였던 바(표 4), 2-4 cell까지 약 24시간 배양한뒤에 수정란의 상태는 공동배양군에서 fragmentation이 없는 것이 총 47개중 42개(89.36%)로 나타나 상당히 좋았으나, 대조군으로 TCM 199-medium을 사용했을때의 결과는 총 59개중 39개(66.1%)가 fragmentation이 없는 것으로 나타나, 공동배양했을때 보다 좋은 상태의 수정란을 더 많이 얻을 수 있었다(p<0.01).

또한 공동배양군 42개와 대조군의 39개의 수정란을 각각10명과 14명의환자에게 이식했던 결과 공동배양군에서는 5명(50.00%)이 대조군에서는 3명(21.43%)이 임신을 하여 공동배양군이 대조군에 비해 높은 결과를 보여주었다.

고 찰

Assisted Reproductive Technology (ART) 프로그램의 많은 발전에도 불구하고, 체외수정의 임신 성공율은 매우 저조하며, 체외수정보다 나은 성공율을 나타내고 있는 gamete intra fallopian transfer (GIFT)나 zygote intra fallopian transfer (ZIFT)(Yovich et al., 1988)에서도 가축들에서 보고된 임신 성공율(≥60%)보다 현저히 낮다(Iritani, 1988). 이는 male factor나 염색체 이상(chromosome abnormality)에 의한 낮은 수정률과도 관련이 있지만 대부분 부적절한 배양 조건과 관련지어진다. 세계적으로 대부분의 체외수정 센터들에서 expanded blastocyst stage (EBS)까지의 발달률은 매우 낮아 좋은 조건이 확립된 많은 체외수정 센터들에서조차도 단지 25-30%만이 EBS까지 도달하고 있는 실정이다(Fehilly et al., 1985). 이런 이유로 후기 발달

에 의한 수정란의 fragmentation 발생과, 발달 정지(block)와 퇴행(degeneration) 방지를 위해 대부분 2-4 세포기의 수정란을 자궁내에 이식하고 있다. 수정란은 상실배나 초기 배반포로의 발달까지 약70-75시간을 난관내에서 보내며 착상개시 전 단지 약 20-24시간만을 자궁내에서 보내고 있으나, 현재의 체외수정 프로그램에서는 부적절한 시기인 2-4 세포기의 수정란을 자궁내에 이식함으로써 배반포기의 수정란 이식에 의한 가축의 보고들에 미치지 못하고 있다. 이런 이유로 난관내의 세포를 이용한 배양으로 체내 환경에 보다 접근된 수정란을 획득하고자 한 본 실험은 매우 의의가 있다고 본다.

본 실험에서 HOEC를 이용한 생쥐와 인간 수정란의 배발달률은 공통적으로 매우 효과가 높게 나타났다. 인간 수정란의 배양의 전단계로 HOEC를 이용한 생쥐 수정란의 배발달률 증진은 초기보다는 후기로 갈수록 대조군에 비해 높은 효과를 나타냄으로써, 공동배양에 의한 효과가 중간에 특이성이 존재하지 않는다는 Boland(1984)의 보고와 같이 HOEC를 이용한 효과도 중간에 특이적이지 않게 작용하였다. 또한 후기 배달률에 대한 효과는 투명대 경화(zona hardening) 현상과 더불어 생각할 수 있다. 최근 Bolton등(1991)의 보고에 의하면 혈청만을 넣어 배양해 형성된 배반포를 이식한 결과 2-4세포기의 수정란을 넣어 이식한 것보다 임신율에 있어서 유의한 차이가 없어 체외에서 장시간 배양했을 경우 투명대가 경화되어 hatching에 문제가 생기는 것으로 생각된다고 하였다. 본 실험에서 공동배양한 생쥐 수정란의 경우 hatching 이후의 결과가 의의있게 높은 것은 공동배양에 의해 투명대 경화현상을 방지할 수 있음을 알 수 있었다. 인간의 경우 비록 우리의 결과에서는 시도된 환자의 수가 적어 정확히 확인할 수는 없었지만, Bongso등(1992)의 보고에 의하면 공동배양한 배반포를 이식하여

높은 임신율을 보고한 것으로 보아 인간에 있어서도 투명대 경화 현상에 관련이 있으리라 생각한다.

인간 수정란의 HOEC에 의한 배양은 동결하기에 부적합하다고 판단된 수정란에서 조차도 후기배 발달률이 높게 나타났으며, 이 결과는 vero cell을 이용해 보고한 Menezo 등(1990)의 보고 보다는 높은 것으로 보아 HOEC가 수정란의 viability 증진에 매우 효과가 높다고 생각한다. 또한 이러한 효과를 토대로 직접 체외 수정 프로그램에 이용한 결과 대조군에 비해 월동이 높은 배발달률을 보여 Bongso 등(1992)의 결과와 유의함을 알 수 있었으며, 현재 이식한 환자의 수가 적어 1명의 임신만이 보고되었지만 임신에 보다 적절한 uterine stage로의 이식으로 가축에서와 같이 보다 높은 임신율을 나타내리라 본다. 공동배양에 의한 발달률 증진은, 배반포까지 발달되는 수정란을 많이 획득하게 됨으로, 후기까지 배양하여 수정란의 viability를 확인하여 적은 수의 수정란을 이식함으로써 기존의 체외수정에서 발생하는 다태 임신의 위험성을 줄일 수 있는 잇점이 생길 수 있으며, 보다 안정된 시기의 동결 상태인 배반포기의 동결 보존으로 융해후 생존률을 증진시켜 동결보존에 의한 임신 성공율을 높여주리라 생각된다.

한편 우리는 24시간 동안 공동배양하여 대조군에 비해 fragmentation이 적은 2-4 세포기의 수정란을 획득한 후 이식하여 높은 임신율을 나타내었다. 이 결과는 fetal bovine uterine cell을 이용하여 33.3%의 임신율을 보고 했던 Menezo 등(1991)의 보고보다 높은 결과를 나타냄을 알 수 있었으며, fragmentation 감소에 의해 높은 임신율을 보고한 것은 낮은 fragmentation과 규칙적인 형태의 blastomere가 높은 임신율을 나타낸다는 Plachot 등(1990)의 견해를 뒷받침 할 수 있었다.

일반적으로 공동배양에 의한 효과는 크게 2가지로 생각되고 있다(Menezo et al., 1991). 첫째는 단백질이나 지질(Waterman/Wall, 1988)과 같은 embryotropic factor의 분비에 의한 효과이고 또다른 하나는 금속이온과 같은 독성요소의 제거(detoxification)에 의한 배양액의 안정화를 들 수 있다. 우리의 결과에서 conditioned medium에 의한 발달률 증진으로 보아 embryotropic factor에 의한 효과를 입증할 수 있었으며 이는 Eyestone 등(1991)이 bovine에서 보고

한 바와 일치하는 견해이다. 독성 요소의 제거와 관련된 결과를 나타낼 수는 없었지만 conditioned medium에서보다 공동배양군에서 약간 높은 것으로 보아 세포간의 접촉에 의한 또 다른 효과가 있으리라 본다. 많은 가축들에서 공동배양의 효과를 갖는 oviduct specific glycoprotein(OSGP)에 관한 연구를 보고하고 있으며(Gandolfi et al., 1989), 최근 들어 Insulin-like growth factor와 같은 growth factor에 의한 효과가 초록으로 보고(Lee et al., 1992)되고 있으나, HOEC에서는 단지 분비되는 OSGP의 분석에 관한 보고(Premanand and Jack Lippes, 1989)만이 있으며 그것이 직접적으로 embryotropic factor로 작용하는지에 관해서는 알려지지 않다.

결론적으로 HOEC에 의한 공동배양 system은 기존의 배양방법에 대한 대체 효과 가능성을 보여주었고, HOEC monolayer 형성은 앞으로 분자수준에서의 난관내의 세포의 분석으로 어떠한 물질이 embryotropic factor로 작용하는지에 관한 연구와 더불어 수정란 발달에 미치는 난관의 작용에 관한 연구에 매우 중요하리라 본다.

결 론

본 연구는 HOEC와의 공동배양이 생쥐와 인간 수정란의 발달 및 임신에 미치는 효과를 알아보고자 실시하였다.

인간의 난관으로부터 회수된 난관 상피세포는 anticytokeratin antibody를 이용한 간접면역형광법으로 실험에 사용한 세포가 상피세포임을 확인한 후 계대배양하며 생쥐와 인간수정란의 공동배양에 사용하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐 수정란을 HOEC와 공동배양 하였을 때 초기 발달률에서는 거의 차이를 나타내지 않았으나 후기로 갈수록 대조군에 비해 높은 발달률을 나타내었다($p < 0.025$).

2. 체외수정 프로그램에서 이식하고 남은 잉여의 인간 수정란 중 상태가 좋지않아 냉동하기에 부적합하다고 판단된 것을 72시간 동안 배양한 결과 대조군(11.11%)에 비해 공동배양군(78.79%)과 conditioned medium을 이용한 군(78.26%)에서 월등히 높은 발달률을 보였다($p < 0.001$).

3. 인간 접합자를 96시간동안 배양한 결과

대조군 (50.00 %)에 비해 공동배양군 (85.71 %)이 월등히 높은 발달률을 보였으며 ($p < 0.01$), 이렇게 배양된 수정란을 5명의 환자에게 이식하여 한명의 임신을 확인하였다.

4. 인간 접합자를 24시간동안 공동배양한 후 이식한 결과 2-4 세포기에서의 fragmentation이 월등히 줄어 들었으며 ($p < 0.01$), 대조군 (21.43 %)에 비해 공동배양 (50.00 %)군이 높은 임신율을 나타내었다 ($p < 0.01$).

이상의 결과로 공동배양에 의한 효과를 종특이적인 현상이 아님을 알 수 있었으며, 발달에 미치는 효과로 보아 퇴행되어 가는 수정란을 구할 수 있고 상태가 좋은 수정란을 다량 얻어 좀더 적절한 단계의 자궁내 이식을 통한 임신율 향상에 진전을 볼 수 있으며, 좀더 안정된 시기에 냉동 할 수 있는 수정란을 얻을 수 있으리라 본다. 결론적으로 HOEC를 이용한 공동배양 system은 기존의 배양 system에 대한 대안으로 매우 적절하리라 본다.

인 용 문 헌

- Boland MP : Use of rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 1984, 21, 126-137.
- Bolton V, Wren ME, Parsons JH : Pregnancies after fertilization and cleavage in human coculture. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1991, 8, 116-118.
- Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS : Improved quality of human embryos with cocultured with human ampullary cells. *Hum Reprod*, 1989 4, 706-713.
- Bongso A, Ag SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, Ratnam S : Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 1992, 58, 569-574.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W, Menezo Y : Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fertil* 1984, 72, 479-485.
- Eyestone WH, Jones JM, First NL : Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1991, 92, 59-64.
- Eyestone WH, First NL : Co-culture of cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 715-720.
- Fehilly CB, Cohen J, Simons RF, Fishel, SB, Edwards RG : Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human : a comparative study. *Fertil Steril* 1985, 44, 638-644.
- Gandolfi F, Brevini TAL, Richardson L, Brown CR, Moor RM : Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 1989, 106, 303-312.
- Gandolfi F, Moor RM : Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 23-28.
- Goodeaux LL, Voelkel SA, Anzalone CA, Menezo Y, Craves KH : The effect of rhesus uterine epithelial cell monolayer on in vitro growth of rehesus embryos. *Theriogenology* 1989, 31, 197.
- Iritani A : Current status of biotechnological studies in mammalian reproduction. *Fertil Steril* 1988, 50, 543-551.
- Lee CT, Mitchell KR, Diehl JR DM : Secretion and expression of IGF-I in cultured porcine oviductal cells. *Society for The Study of Reprod* 1992, 46, 113.
- Menezo Y, Ouhibi N : Embryo culture. *ARTA* 1991, 1, 297-308.
- Menezo Yves, Guerin Francois, Czyba Jean-Claude : Improvement of human early embryo development in vitro by co culture on monolayers of vero cells. *Biol Reprod*, 1990, 42, 301-306.
- Ouhibi Nadia, Hamidi Jamal, Guillaud Jossete and Menezo Yves : Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports *Human Reprod*, 1990, 5, 737-743.
- Plachot M, Mndelbaum J, Salat-Baroux J, De Loge C : Morphologic and cytologic study of human embryos obtained by in vitro fertilization. In : Feichtinger W, Kemeter P,

- editors. Future aspects in human in vitro. *Heidelberg: Springer-Verlag* 1987, 265-267.
- Premahand V Wagh, Jack Lippes: Human oviductal fluid proteins. III. Identification and partial purification. *Fertil Steril* 1989, 51, 81-88.
- Waterman RA, Wall RJ: Lipid interactions with in vitro development of mammalian zygotes. *Gamete Res* 1988, 21, 243-254.
- White Kl, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL, Jr., Wood TC: Early embryonic development in vitro by co culture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol Reprod* 1989, 41, 425-420.
- Yovich JL, Yovich JM, Edirisinghe WR: The relative chance of pregnancy following tubal of uterine transfer procedures. *Fertil Steril* 1988, 49, 858-864.
-