

## 생쥐 초기배아와 사람의 수정란의 발생에 미치는 생식수관 상피세포의 영향에 관한 연구

제일병원 체외수정연구실, 불임클리닉<sup>1</sup>, 한양대학교 자연과학대학 생물학과<sup>2</sup>

이호준 · 변혜경 · 김정욱 · 황정혜<sup>1</sup> · 전종영<sup>1</sup> · 김문규<sup>2</sup>

### The Effects of the Epithelial Cells of Genital Tract on the Development of Mouse Early Embryos and Human Fertilized Oocytes

H.J. Lee, H.K. Byun, J.W. Kim, J.H. Hwang<sup>1</sup>, J.Y. Jun<sup>1</sup> and M.K. Kim<sup>2</sup>

IVF Research Laboratory, Infertility Clinic<sup>1</sup>, Cheil General Hospital Seoul 100-380, Department of  
Biology<sup>2</sup>, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

#### = Abstract =

Mammalian oviductal epithelial cells have been known to improve in vitro fertilization and embryonic development. Recently, co-cultured human embryos with the epithelial cells in human genital tract has been reported to improve the pregnancy rate. The purpose of the study was to investigate the effects of the epithelial cells of human genital tract on the development of mouse early embryos and human fertilized oocytes.

The epithelial cells of human genital tract were collected from the fallopian tubes which were obtained during hysterectomy in fertile women and from the endometrium during endometrium biopsy. Collected human ampullary cells(HACs) and endometrial cells(HECs) were cultured for 10 days to establish primary monolayer. Second passaged HACs and HECs were obtained by trypsinization were cryopreserved in PBS with 1.5 M DMSO for later use. To investigate the effect when co-cultured with HACs and HECs, we tried to apply strict quality control on mouse embryo, from two cell to blastocyst prior to human trial.

The results of quality control were as follows;

In Group I (Ham's F10 with 10% FCS), Group II (co-cultured with HACs) and Group III (co-cultured with HECs), developmental rates to blastocyst were 63.3% (253/400), 76.0% (304/400), 74.0% (296/400), respectively. Hatching rates were 36.8% (147/400), 41.8% (167/400), 38.0% (152/400), respectively ( $p < 0.05$ ).

To perform the human IVF, cryopreserved HACs were thawed at 37°C waterbath, seeded on the well dish and cultured for 48 hrs. The pronuclear stage embryos were transferred to the seeded well dish. After 24 hrs, co-cultured embryos were examined and transferred to patient's uterus.

The results of human IVF when co-cultured with HACs were that fertilization and developmental rates were 61.8% (256/414), 95.3% (244/256) as compared with 57.2% (279/488) and 94.6% (264/279) in Ham's F10 supplemented with 10% FCS(control). However, 62.9% (161/256) of co-cultured human embryos showed good embryos(no or slight fragmentation) as compared with 53.8% (150/279) in control( $p < 0.05$ ). Pregnancy rate was 40.0% (12/30) when co-cultured with HACs whereas 30.6% (11/36) in control.

\* 본 논문의 요지는 93년 제 8차 세계 IVF & ET 학회에서 발표되었음.

In conclusions, co-culture system using HACs and HECs improved the developmental and hatching rates of mouse embryo. Also, in human IVF system when co-cultured with HACs, it improved both the quality of human embryos and the pregnancy rate.

## 서 론

수란관에서 분비되는 물질 중 배아의 발생과 분화를 돕는 물질들이 존재한다고 보고되었으나, 이들 물질이 배아에 어떻게 작용하여 영향을 미치는지는 알려져 있지 않다 (Bavister, 1988; Leese, 1988; Heyner et al., 1989a, 1989b; Sparks et al., 1992). 수란관 상피세포와 정자, 난자 및 배아의 공동배양은 상피세포로부터 분비되는 물질들에 의해 수정률과 발생률이 향상되기 때문에 여러 종의 포유류 실험에서 사용(Sakkas and Trounson, 1990; Wiemer et al., 1991; Takeuchi et al., 1992)되고 있으며, 최근에는 사람에서도 체외수정술시 사용되고 있다(Menezo et al., 1990; Bongso et al., 1991a, 1991b).

공동배양에 의한 배아의 발생과 분화에 대한 연구는 여러 연구자에 의해 보고되었다. Sakkas와 Trounson(1990)은 생쥐 1세포기 배아를 소의 생식수관 상피세포와 공동배양하는 것이 배아의 발생률을 높인다고 보고하였

으며, Gandolfi와 Moor(1987)는 양에서도 수란관 상피세포를 이용한 공동배양이 섬유아세포(fibroblast)나 배양액을 단독으로 사용한 것에 비해 높은 발생률을 나타낸다고 보고하였고, Lai 등(1992)은 Vero cell을 이용한 공동배양이 생쥐 배아의 부화율을 높인다고 보고하였다. 또한 사람의 생식수관 상피세포와 생쥐 배아의 공동배양이 배아의 발생을 향상시킨다고 보고되었다(Takeuchi et al., 1992).

사람의 체외수정술에서 생식수관 상피세포와 배아를 공동배양하는 이유로는 첫째, 난자의 성숙을 유도하고 둘째, 정자의 활성을 향상시키며 셋째, 수정률을 향상시키고 넷째, 발생률을 향상시킨다고 보고하였다(Thibodeaux and Godke, 1992). 체외수정술시 생식수관을 이용한 공동배양법은 체내와 유사한 환경을 조성하여 배아의 체외 발생을 진전시킴으로써 배아가 자궁내 환경과 일치하는 시기인 상실기, 포배기에서 배아이식을 수행해 임신률을 향상시키는 방법의 하나로서 보고되었다(Bongso et al., 1989b, 1991a).

본 실험은 생식수관 상피세포와 생쥐 배아

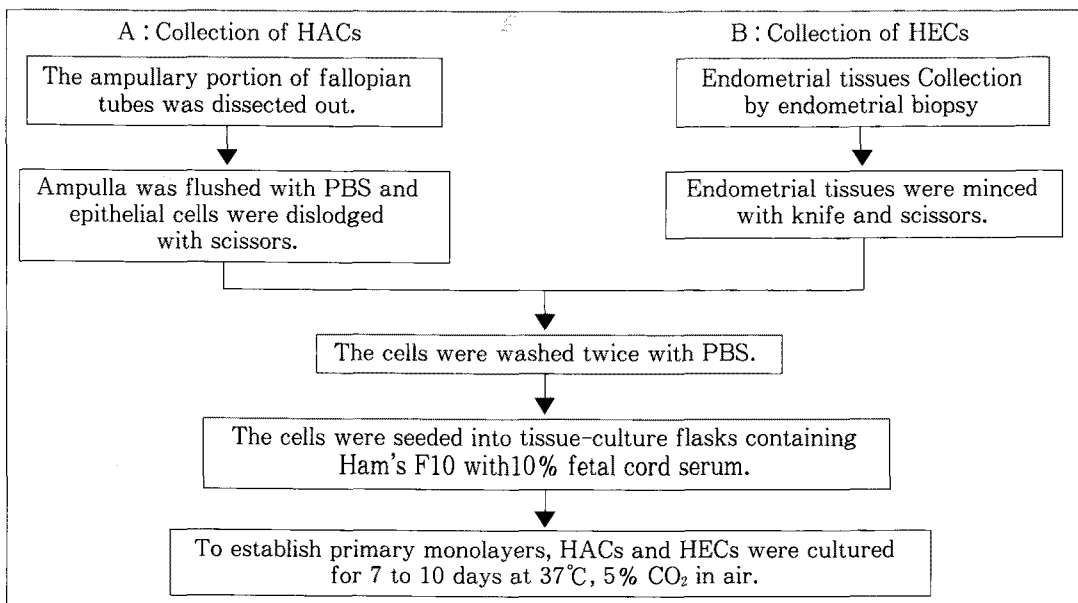


Fig. 1. Diagram of procedures for collection of human oviductal ampullary cells(HACs) and human endometrial cells(HECs).

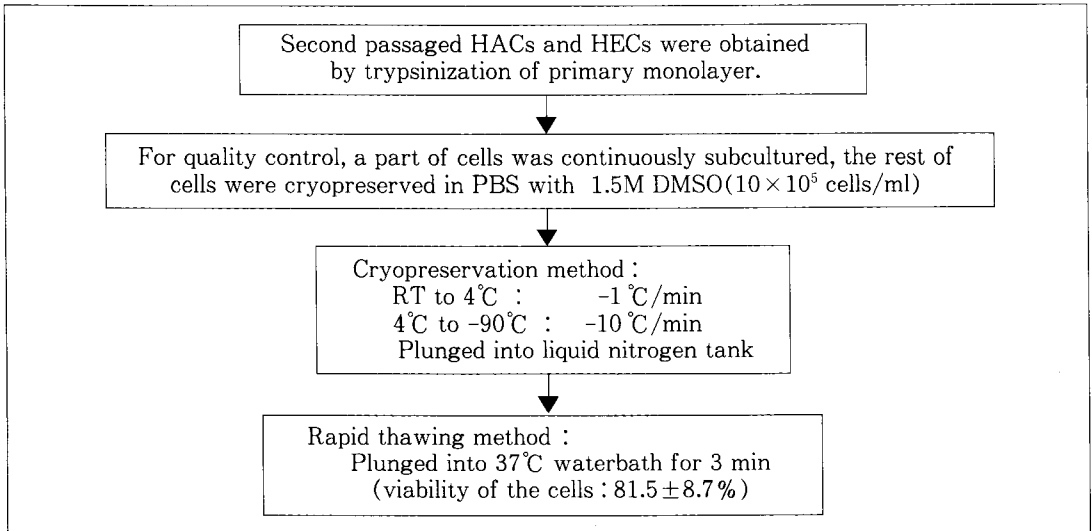


Fig. 2. Diagram of cryopreservation for subcultured human oviductal ampullary cells(HACs) and endometrial cells(HECs).

의 공동배양이 배아의 발생에 미치는 영향을 알아보고, 사람의 체외수정시술시 이들 상피세포와 사람 배아의 공동배양이 배아의 발생과 임신률에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 생식수관 상피세포의 획득과 동결보존

수란관 상피세포는 제일병원 산부인과에서 자궁적출술을 시행한 가임여성의 수란관으로부터 획득하여 초기배양하였고, 자궁내막상피세포는 자궁내막증 검사를 시행한 환자의 자궁내막 조직으로부터 획득하여 초기배양하였다. 이렇게 초기배양된 상피세포는 계대배양(subculture)을 시행하여 세포를 증식하였고 증식된 세포는 사용하기 전까지 동결보존하였다(그림 1, 그림 2).

수획된 세포들은 면역세포화학법(immunocytochemistry)을 통해 상피세포 여부를 검증하였다(Plate I).

### 2. 배아의 획득

본 실험에는 생후 6-8주된 생쥐(ICR strain)를 사용하였다.

암컷의 복강에 pregnant mares' serum gonadotropin(PMSG, Sigma) 5 iu를 주사하고 48시간 후 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma) 5 iu를 주사하여 과배란을 유도

한 후 수컷과 교배시켰다. hCG 주사 44-48시간 경과 후, 교배된 암컷을 경추파괴로 도살하고 수란관을 적출하여 2-세포기 배아를 획득하였다.

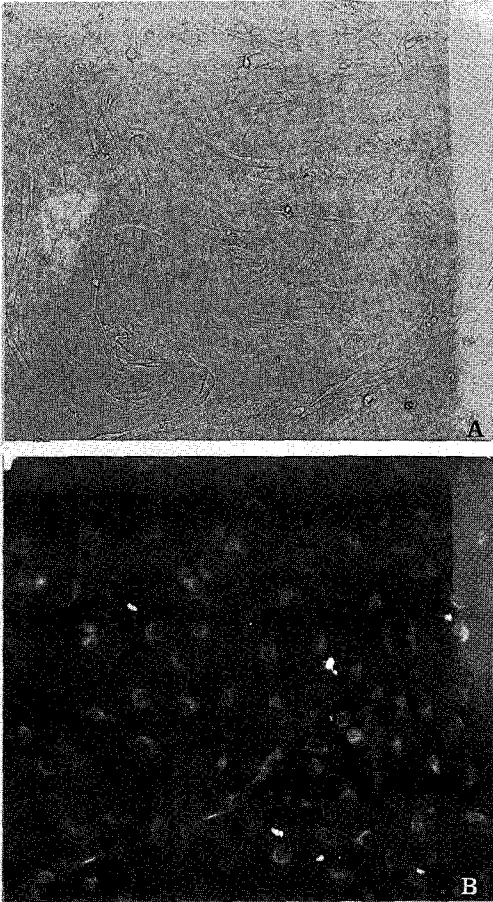
### 3. 생쥐 초기배아와 생식수관 상피세포의 공동배양

계대배양한 수란관 및 자궁내막 상피세포를 10% FCS-Ham's F10 배양액으로  $10^5$  cells/ml 개의 세포수로 희석하여 4-well dish에 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기 내에서 48시간 동안 배양하여 공동배양을 준비하였다. 과배란 유도로 얻은 생쥐 후기 2-세포기 배아를 공동배양하여 각 군간의 배아의 발생률을 조사하였다. 10% FCS-Ham's F10 배양액만으로 배아를 배양한 군을 대조군으로 이용하였다.

### 4. 사람 정자와 난자의 수획 및 수정

많은 양질의 난자를 획득하기 위하여 과배란유도를 시행하였다. 호르몬 제제를 사용한 long/short acting protocol을 이용하여 hCG 주사 34시간 후에 난자를 채취하였다(Lopata and Hay, 1989). 난자의 채취는 질식초음파를 이용하였다. 채취된 난자는 성숙도에 따라 구분하여 배양접시에 옮겨 배양기에서 배양하였고 10% FCS를 첨가한 Ham's F10 배양액을 사용하였다.

정자는 수음으로 얻은 정액을 30분 정도 액



**Plate I.** Microphotographs of examination of human oviductal epithelial cells by immunocytochemistry. Human oviductal epithelial cells forming confluent monolayer(primary culture)(Normarski's optics,  $\times 400$ )(A). Fluorescence reveals epithelial cells stained with monoclonal anti-cytokeratin antibodies( $\times 400$ ). The antiserum stains a filamentous network that surrounds the cell nucleus and is involved in intercellular junctions(B).

화시킨 후 discontinuous Percoll method에 의해 활동성 있는 정자만을 추출하여 수정능력을 유도하기 위하여 배양기에서 1시간 이상 배양하였다.

정자의 수정(insemination)시간은 난자의 성숙도에 따라 3-18시간 사이에 결정하였다. 수정시키는 정자의 수는  $10^5$ 개로 난자에 넣어주고 수정(ferilization)은 16-20시간이 지난 후 전핵(pronucleus)의 형성으로 확인하였다.

## 5. 사람 수정란과 수란관 상피세포의 공동 배양

공동배양에 사용된 수란관 상피세포는 동결 보존 후 임상적인 검사를 거쳐 이상이 없다고 여겨지는 환자의 수란관 상피세포만을 해빙하여 사용하였다. 동결된 세포를  $37^{\circ}\text{C}$  항온 수조에서 3분 동안 해빙하여 4-well dish에 분주하고 48시간동안 배양한 후 10% FCS-Ham's F10 배양액을 교체해주었다. 수정이 확인된 수정란을 옮겨 24시간 공동배양한 후, 배아를 도립 현미경하에서 관찰하고 자궁에 이식하였다. 배아의 질은 세편의 정도와 할구의 모양에 따라 5개의 군으로 나누어 비교분석하였다.

배아 이식 후 12일째에 RIA를 통하여  $\beta$ -hCG를 검사함으로써 임신유무를 확인하였다. 두 군간의 화학적 임신(chemical pregnancy)을 제외한 임상적 임신(clinical pregnancy)만을 임신으로 간주하였다.

## 6. 통계학적 분석

실험을 통하여 얻은 결과들은 유의성 검사를 위하여  $X^2$ -test와 Student t-test를 시행하여 P값이 0.05 이하일 때 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 생쥐 초기배아의 발생률에 미치는 상피세포의 영향

대조군(10% FCS-Ham's F10: Group I), 수란관상피세포와의 공동배양군(Group II)과 자궁내막상피세포와의 공동배양군(Group III)의 생쥐배아의 발생률을 살펴보면 Group I 63.3% (253/400), Group II 76.0% (304/400), Group III 74.0% (296/400)로 나타나 공동배양군에서 유의하게( $p < 0.05$ ) 높게 나타났다. 부화율은 각각 36.8% (147/400), 41.8% (167/400), 38.0% (152/400)로 나타나 Group I에 비해 유의하게( $p < 0.05$ ) 높게 나타남을 알 수 있었다(표 1).

### 2. 사람 수정란의 발생률과 임신률에 미치는 상피세포의 영향

대조군과 공동배양군간 수정률은 57.2% (279/488), 61.8% (256/414)이고 발생률은 94.6% (264/279), 95.3% (244/256)로 나타났다(그림

**Table 1.** Development of mouse embryos in the conditioned media *in vitro*

Group	No. of Examined embryos	Embryonic Stage						Develop. Rate (Hatching Rate) (%)	
		2-cell	4-cell	8-cell	Compact	Morular	Blastocyst Hatched		
I	400	45	40	4	4	54	253	147	63.3 (36.8)
II	400	31	21	5	1	38	304	167	76.0*(41.8)*
III	400	24	29	17	2	32	296	152	74.0*(38.0)*

Group I; 10% fetal cord serum, II; co-cultured with human oviductal epithelial cells, III; co-cultured with human uterine endometrial cells. \* $p < 0.05$ , Values are mean.  $n = 20$ .

**Table 2.** Effect of co-culture with human oviductal epithelial cells on development of embryos in human IVF

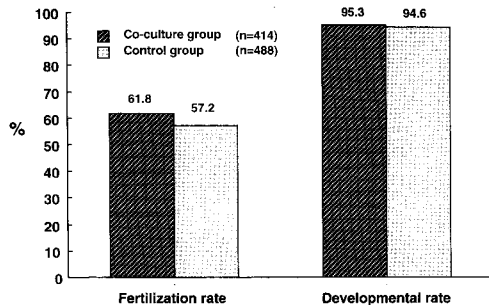
Group	No. of oocyte	No. of fertilized oocyte	No. of developed embryo	No. of good embryo †
Control group (n=36)	13.6±0.2	7.6±0.1	7.2±0.1	4.2±0.1*
Co-cultured group (n=30)	13.8±0.2	8.5±0.2	8.1±0.2	5.4±0.1*

Control group; Ham's F10 supplemented with 10% fetal cord serum. † good embryos; embryos with no or slightly fragmentation, \* $p < 0.05$ , Values are mean±SE.

**Table 3.** Effect of co-culture with human oviductal epithelial cells on pregnancy outcome in Human IVF

Group	No. of embryo transfer	No. of pregnancy (%)	No. of on-going pregnancy (%)
Control Group (n=36)	3.7±0.1	11(30.6)	7(19.6)
Co-cultured Group (n=30)	3.9±0.1	12(40.0)	9(30.0)

Control group; Ham's F10 supplemented with 10% fetal cord serum. Values are mean±SE.



**Fig. 3.** Fertilization and developmental rates between control group and co-culture group with HACs in human IVF.

3). 배양된 난자의 수는  $13.6 \pm 0.2$  (Mean±SE 개),  $13.8 \pm 0.2$ , 수정된 난자의 수는  $7.6 \pm 0.1$ ,  $8.5 \pm 0.2$ , 발생된 배아의 수는  $7.2 \pm 0.1$ ,  $8.1 \pm 0.2$ 로 나타나 유의한 차이가 없었다. 그러나

양질의 배아의 수는  $4.2 \pm 0.1$ ,  $5.4 \pm 0.1$ 로 나타나 공동배양군이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 높게 나타났다(표 2).

두 군간의 임신률을 살펴보면 대조군이 30.6% (11/36), 공동배양군이 40.0% (12/40)로 나타났다으며, 임신지속률(on-going pregnancy rate)을 살펴보면 각각 19.4%, 30.0%로 나타나 통계적으로 유의하지는 않았다(표 3).

## 논 의

수란관은 난자와 정자의 수정과 배아의 발생이 진행되는 장소로서 이러한 과정을 지지해주는 생리적인 기작이 있다고 알려져 왔다 (Leese, 1988). 체외배양시 수란관 내부와 유사한 환경을 조성하여 줌으로써 배아의 발생

에 도움을 줄 수 있다는 것은 여러 보고자들에 의해 이미 알려져 왔으며, 호르몬과 성장인자들에 의해서 배아발생시 유전자 활성화, 세포의 증식 및 분화의 활성화, 새로운 효소의 생성 등이 이루어진다고 보고되었다(Heyner et al., 1989a; Fukui et al., 1991).

배양된 수란관과 자궁내막 상피세포는 분비세포로서 체내에서와 같은 물질의 분비 기능을 수행하는 것으로 사료된다. Eyestone과 First(1989)는 수란관 조직을 배양한 조절배양액이 소의 발생률을 향상시킨다고 보고하였으며, 양의 수란관 상피세포와 공동배양하였을 때 양의 초기배아의 발생을 증진시킨다고 보고하였다(Gandolfi and Moor, 1987; Rexroad and Powell, 1988a, 1988b). 한편 Takeuchi 등(1992)은 사람의 수란관 상피세포를 이용하여 생쥐 배아를 공동배양하였을 때 배아의 발생이 향상되었다고 보고하였는데, 생쥐 배아를 이용한 본 실험에서도 수란관 및 자궁내막 상피세포의 공동배양군이 일반적인 에너지원으로서 FCS를 첨가한 군에 비해 높은 발생률과 부화율을 나타냄을 알 수 있었다(표 1). 이것은 상피세포에서 분비된 물질들이 후기배아에 작용하여 세포의 증식을 빠르게 진행시키고(Heyner et al., 1989a) 배아의 발생 증식을 억제하는 이온과 중금속 등의 유해 물질들을 제거시키기 때문에(Bavister, 1988; Bongso et al., 1989b), 발생률과 부화율이 높게 나타난다고 사료된다.

공동배양에 의한 체외수정기술은 여러가지 세포를 이용하여 널리 사용되고 있다. 특히, 포유류의 수란관을 이용한 배양방법이 많이 이용(Wiemer et al., 1989a)되고 있으며, 또한 Vero cell과 같은 세포주를 이용한 배양방법도 널리 사용되고 있다(Menezo et al., 1990).

사람의 수란관을 획득하여 상피세포를 배양하는 기술은 최근 들어 정착되어 사용되고 있으며, 여러가지 측면에서 많은 연구결과를 가져왔다. 특히, 체외수정법에 널리 사용됨으로써 수란관 상피세포의 생리적인 기작과 분비 기작 등을 밝히는데 많은 도움을 주고 있다(Verhage et al., 1988a, 1988b).

상피세포를 이용한 공동배양법은 체내의 환경과 가장 유사한 환경을 제공해준다는 이론에서 합리적인 방법이다. 특히, 초기배아의 발생장소인 수란관의 상피세포에서는 배아의 발생에 도움을 주는 요소들이 분비될 것으로 사

료된다(Bavister, 1988).

사람의 체외수정기술에 상피세포를 이용하기 위하여 사용 전에 철저한 검사가 이루어져야 한다. 또한 상피세포를 30일 정도 계속 계대배양하면 수명을 다해 폐기해야 하므로 이들 세포를 동결보존해두었다가 필요할 때 해빙하여 사용하는 동결방법이 연구되었다(Yeung et al., 1992). 본 실험에서는 동결해빙된 상피세포와 생쥐배아의 공동배양시 해빙된 상피세포의 영향을 조사하였다. 해빙 후 상피세포의 생존률이 81.5%로 높게 나타났으며, 이들 세포와 생쥐 초기배아를 공동배양하였을 때 발생률과 부화율은 계대배양된 상피세포와 비교하여 차이가 나지 않는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 동결보존이 세포에 큰 상해를 주지 않으며 세포의 분비기능과 대사작용에도 아무런 영향을 주지 않음을 나타낸다. 세포주로 확립되지 않은 이들 세포를 필요할 때 사용할 수 있고, 감염될 수 있는 질환을 사전에 검사하여 감염을 예방할 수 있다는 측면에서 상피세포의 동결보존은 널리 보급되어야 할 것으로 사료된다.

사람 배아의 체외배양시 양질의 배아가 되는 율은 25%를 넘지 못하며, 세편화현상(fragmentation)이 일어나 25% 이상의 세편(fragment)을 가지면 착상이 억제된다고 보고되었다. Gandolfi와 Moor(1987)는 양의 초기배아 발생에서 양의 수란관 상피세포 또는 섬유아세포 등을 이용한 공동배양이 배양액에서만 배양된 것과 비교할 때 세편화가 감소된다고 보고하였다. 한편, 이러한 세편화현상이 일어날 경우에는 할구등이 퇴화되어 나간다고 보고하였다(Wiemer et al., 1989c). 동결해빙된 상피세포와 사람 배아의 공동배양법 Yeung 등(1992)에 의해 보고되었는데 이들은 배아의 발생을 증진시키며 세편화를 감소시킴으로써 양질의 배아를 획득하여 높은 포배율을 나타내 임신률을 향상시킨다고 보고하였다. 공동배양된 배아의 모양은 분할 후에도 할구의 모양이 균등하며, 발생속도도 체내와 비슷하게 빠르게 발생된다(Bongso et al., 1989, 1992). 본 실험의 결과처럼 배아의 상태가 좋아지며 세편이 적은 양질의 배아를 획득할 수 있었고 임신률도 증가되는 경향을 나타냄을 알 수 있었다(표 2, 3). 이러한 결과는 세포의 발생에 도움을 줄 뿐 아니라 착상에도 영향을 주는 요소들이 수란관 또는 자궁내막

상피세포에서 분비되기 때문에 사료된다.

생식수관 상피세포와 배아의 공동배양이 유의하게 좋은 이유는 아직 확실히 밝혀지지 않았지만, 다음의 두가지 가능성을 제시하였다. 첫째, 배양액에 존재하는 방해물질의 제거 둘째, 배양액에 embryonic trophic factor(s)의 첨가를 들고 있다(Thibodeaux and Godke, 1992; Yeung et al., 1992). 돼지에서 배양액에 들어 있는 pyruvate는 배아의 발생을 저해(Davis and Day, 1978)하고, 생쥐 배아에서는 hypoxanthine과 glucose가 발생을 저해하고 낮은 농도의 산소압에서 발생이 잘된다고 보고되었다(Chatot et al., 1989). 그리고, Takeuchi 등(1991)에 의하면 낮은 농도의 산소압에서 생쥐배아의 발생이 향상된다고 보고하였다. 이것은 생쥐, 양, 소 등의 포유류에서 대기산소압이 배아의 발생과 관련한다는 것과 일치한다. 따라서, 공동배양을 시행하면 대사작용에 의해 상피세포로부터 이러한 물질을 감소시켜 저해하는 물질들이 억제되어 배아의 발생에 도움을 주게 된다(Wiemer et al., 1989a; Yeung et al., 1992).

Embryonic trophic factor(s)는 많은 포유류에서 발견(Sutton et al., 1984; Hyde and Black, 1986; Verhage et al., 1988a, 1988b)되었으나, 이러한 물질들이 배아의 발생에 직접적인 작용을 하여 발생률과 포배율, 임신률 등을 향상시키는 주원인인지는 알 수 없다(Wiemer et al., 1989a; Bongso et al., 1990; Yeung et al., 1992).

결론적으로, 생식수관 상피세포와 생쥐 초기배아의 공동배양은 배아의 발생률과 부화율을 향상시켰으며, 상피세포의 동결보존방법은 생존률이 높게 나타나 동결해빙 후 필요할 때 유용하게 사용할 수 있었다. 실험군의 숫자가 적어서 통계적 유의성은 없었으나, 수란관 상피세포와 사람 배아의 공동배양이 초기배아의 발생에 도움을 줌으로써 양질의 배아를 획득할 수 있고 따라서, 임신률을 증가시키는 경향을 볼 수 있었다.

## 결 론

포유류의 수란관 상피세포는 수정률과 배아의 발생률을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 최근 사람의 체외수정 기술시 생식수관 상피세포와의 공동배양은 임신률을 증진시킨다고

보고되었다. 본 연구의 목적은 생쥐 초기배아와 사람의 수정란의 발생에 미치는 생식수관 상피세포의 영향을 알아보기 위한 것이다.

사람의 생식수관 상피세포는 자궁적출술을 시행한 가임여성과 자궁내막증 검사를 받은 환자로부터 각각 획득한 수란관과 자궁내막 조직으로부터 수확하여 10일간 초기배양하였다. 2회 계대배양된 생식수관 상피세포는 필요시 사용하기 위하여 1.5M DMSO-PBS를 이용하여 동결보존시켰다. 생식수관 상피세포와의 공동배양을 사람의 체외수정 기술에 적용하기 이전에, 먼저 생쥐 2-세포기 배아를 이용한 정도관리를 시행하여 발생률을 조사하였다.

정도관리의 결과는 다음과 같다;

10% FCS-Ham's F10 배양액으로 배양한 제 1군, 수란관 상피세포와 공동배양한 제 2군, 자궁내막 상피세포와 공동배양한 제 3군의 실험군에서 포배로의 발생률은 각각 63.3% (253/400), 76.0% (304/400), 74.0% (296/400)로 나타났다. 부화율은 각각 36.8% (147/400), 41.8% (167/400), 38.0% (152/400)로 나타났다( $p < 0.05$ ).

사람의 체외수정시 사용하기 위하여 동결보존된 수란관 상피세포를 37°C 항온수조에서 해빙시켜 4-well dish에서 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 교체한 후 수정이 확인된 난자를 4-well dish 옮겨 24시간 동안 배양한 후 관찰하여 이식하였다.

사람의 체외수정에서 수란관상피세포와의 공동배양한 결과는 다음과 같다. 대조군과 공동배양군에서 수정률은 57.2% (279/488), 61.8% (256/414)이고 발생률은 각각 94.2% (264/279), 95.3% (244/256)였다. 양질의 배아의 획득수는  $4.2 \pm 0.1$ ,  $5.4 \pm 0.1$ 개로 나타났으며 ( $p < 0.05$ ), 임신률은 30.6% (11/36), 40.0% (12/30)로 나타났다.

결론적으로 생식수관 상피세포를 이용한 공동배양은 생쥐 배아의 발생률과 부화율을 증진시켰다. 또한, 사람의 체외수정시 수란관상피세포와의 공동배양은 배아의 질과 임신률을 향상시켰다.

## 인 용 문 헌

Bavister BD: Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo or in vitro.

- Theriogenology* 1988, 29, 143-154.
- Bongso A, Gajra B, Ng PL, Wong PC, Ng SC, Ratnam S : Establishment of human endometrial cell cultures. *Hum Reprod* 1988, 3, 705-713.
- Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS : Establishment of human ampullary cell cultures. *Hum Reprod* 1989a, 4, 486-494.
- Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS : Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1989b, 4, 700-713.
- Bongso A, Ng SC, Ratnam S : Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. *Hum Reprod* 1990, 5, 893-900.
- Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S : Improved fertilization rates of human oocytes in coculture. *J In Vitro Fert Em Trans* 1991a, 8, 216-221.
- Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratnam S : Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991b, 56, 179-191.
- Bongso A, Ng 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.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I : An improved culture medium supports development of randombred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fert* 1989, 86, 679-6880.
- Davis DL, Day BN : Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J Ani Sci* 1978, 46, 1043-1053.
- Eyestone WH, First NL : Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 1989, 85, 715-720.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR : Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* 1991, 92, 125-131.
- Gandolfi F, Moor RM : Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fert* 1987, 81, 23-28.
- Heyner S, Rao LV, Jarett L, Smith RM, Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: pattern of uptake and functional correlations. *Develop Biol* 1989a, 134, 48-58.
- Heyner S, Mattson BA, Smith RM, Rosenblum IY : Insulin and insulin-like growth factors in mammalian development. In: Growth factors in mammalian development. (Rosenblum, I.Y. and S. Heyner eds), CRC press, New York, pp. 1989b, 91-112.
- Hyde B, Black D : Synthesis and secretion of sulphated glycoproteins by rabbit oviduct explant *in vitro*. *J Reprod Fert* 1986, 78, 83-91.
- Lai YM, Stein DE, Soong YK, Tang YX, Grifo J, Malter HE, Talansky BE, Cohen J, Liu HC, Rosenwaks Z : Evaluation of vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. *Human Reprod* 1992, 7, 276-280.
- Leese HJ : The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fert* 1988, 82, 843-856.
- Lopata A, Hay DL : The surplus human embryo: its potential for growth, blastulation, hatching and human chorionic gonadotropin production in culture. *Fertil Steril* 1989, 51, 984-991.
- Menezo YJR, Guerin JF, Czyba JC : Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of vero cells. *Biol Reprod* 1990, 42, 301-306.
- Rexroad C, Powell A : Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1988a, 29, 387-397.
- Rexroad C, Powell A : Co-culture of ovine ova with oviductal cells in Medium-199. *J Anim Sci* 1988b, 66, 947-953.
- Sakkas D, Trounson AO : Co-culture of mouse



- embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J Reprod Fert* 1990, 90, 109-118.
- Sparks AET, Gwazdauskas FC, McGilliard ML : Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology* 1992, 37, 587-594.
- Sutton R, Nancarrow CD, Wallace ALC, Rigby NW : Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *J Reprod Fert* 1984, 72, 415-422.
- Takeuchi K, Maruyama I, Yamamoto S, Oki T, Nagata Y : Isolation and monolayer culture of human fallopian tube epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991, 274A, 720-724.
- Takeuchi K, Nagata Y, Sandow BA, Hodgen GD : Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse pre-embryos. *Mol Reprod Dev* 1992, 32, 236-242.
- Thibodeaux JK, Godke RA : In vitro enhancement of early stage embryos with co-culture. *Arch Pathol Lab Med* 1992, 116, 364-372.
- Verhage HG, Fazleabas AT, Donnelly K : The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* 1988a, 122, 1639-1645.
- Verhage HG, Fazleabas AT : The in vitro synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*Papio anubis*) oviduct. *Endocrinology* 1988b, 123, 552-558.
- Wiemer KE, Cohen J, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, Godke RA : In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum Reprod* 1989a, 4, 595-600.
- Wiemer KE, Malter HE, Cohen J, Wright G, Wiker SR, Godke RA : Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts : embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989b, 52, 503-508.
- Wiemer K, Amborki G, Blakewood R, Godke R : Development of a fetal bovine uterine-cell monolayer culture system for bovine embryos. *Theriogenology* 1989c, 29, in press.
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH, Schultz GA : Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol Reprod Develop* 1991, 30, 330-338.
- Yeung WSB, Ho PC, Lau EYL, Chan STH : Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Human Reprod* 1992, 7, 1144-1149.