

공배양의 작용기전에 관한 연구

부산대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 문화병원 불임클리닉²,
산대학교 자연과학대학 분자생물학과³

김미경^{1,3} · 주보선^{2,3} · 김미선³ · 문화숙² · 이규섭¹ · 김한도³

Mechanism for the Action of Co-culture

Mi Kyoung Kim^{1,3}, Bo Sun Joo^{2,3}, Mi Sun Kim³, Hwa Sook Moon²,
Kyu Sup Lee¹, Han Do Kim³

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Pusan National University School
of Medicine, ²The center of Reproductive Medicine and Infertility,
Moon Hwa Hospital, ³Department of Molecular Biology,
Pusan National University School of Natural Science

Objective: A number of studies to improve in vitro culture conditions have been tried over past ten years by using co-culture system with helper somatic cells. However, the mechanism of coculture is poorly understood. This study was designed to understand the mechanism for the mode of actual action of co-culture using co-culture system of ICR strain's 1-cell embryos with human oviduct epithelial cells by examining the effect of conditioned medium and contactless coculture using a cell culture insert on the embryo development and by measuring the level of superoxide anion from conditioned medium after co-culture.

Methods: ICR strain's zygote embryos were cultured in medium alone (control), coculture, conditioned medium, or contactless coculture system for 6 days. Conditioned media (CM) were prepared as following 5 groups. All CM were collected after culturing oviduct cells for 2 days. CM-1 was stored at -20°C until use, and CM-2 was prepared just before the use as a culture medium. CM-3 was cocultured with embryos and retrieved just before use. CM-4 and CM-5 were derived from the microfiltration of CM-2 and CM-3, respectively, using Microcon-10 (10 kDa molecular weight cut-off). The percentage of the embryos developed to hatched blastocyst stage and the level of superoxide anion in supernatant from medium alone culture (control), coculture, and contactless coculture were measured.

Results: The rates of embryo development to the hatched blastocyst stage were significantly higher in coculture (43%) than in control (0%) ($p < 0.05$). The CM-1 group had no embryo development since 2-cell embryonic stage, whereas the CM-2, CM-3, CM-4 and CM-5 groups had the improved development to 4 or 8 cell embryo stage, but the similar rate of development to hatched blastocyst compared to control. The effect of coculture on embryo development was disappeared in the contactless coculture group. The level of superoxide anion was significantly reduced in coculture group compared to control.

Conclusion: It is concluded that the present coculture system overcomes the 2-cell block in vitro and improves the embryo development. This beneficial effect may be due to the direct cell-

cell contact between embryo and helper cells or the removal of deleterious components from medium rather than the embryotrophic factors.

Key Words: Coculture, Embryo development, Conditioned media, Cell to cell contact, Superoxide anion

지난 10여년 동안 배양액의 조성을 변화시키거나 공배양을 이용함으로써 체외배양조건을 향상시키려는 많은 연구가 진행되었다.¹⁻³ 그 결과 많은 연구가 공배양이 배아의 질을 향상시키고 포배기 발달율을 증가시킨다고 보고하였다.^{4,5}

Bongso 등은 공배양의 작용기전을 크게 2가지로 설명하고 있다.³ 하나는 Hypoxanthine이나 반응기산소 (Reactive Oxygen Species, ROS)같은 배양조건 내 유해성분을 제거해 주는 negative conditioning role이고, 둘째는 영양세포로부터 배양액에 방출되는 성장인자, cytokines, 당단백질같은 영양배아조절인자 (embryotrophic factor)에 의한 positive conditioning role이다. 또 다른 기전으로 배아와 체세포간의 단순한 접촉을 고려해 볼 수 있다.⁶

이와 같이 공배양의 작용기전에 대한 설명으로 여러 가지 확설이 제시되고 있으나 공배양의 작용기전은 아직 명확히 증명되어 있지 않다. 더구나 배아 발달을 위한 공배양의 필요성과 무분별한 이용에 대한 우려가 제기되고 있어,⁷ 공배양의 작용기전에 대한 연구는 선행되어야 할 과제이다.

본 연구는 인간난관상피세포를 이용한 ICR 계통의 생쥐 1-세포기 배아의 공배양 체계를 통해 공배양의 작용기전을 알아보고자 했다. 먼저 공배양이 발달정지현상 (cell block)을 극복하고 포배아로의 정상적인 배발생을 하는지를 조사하였으며, 조건배양액과 배양삽입물 (cell culture insert)을 이용하여 공배양의 효과가 positive role 또는 negative role에 의한 것인지, 배아와 체세포간의 접촉에 의한 것인지를 조사하였다. 마지막으로 공배양 후 조건배양액에서 superoxide anion치의 변화를 조사함으로써 배양액내 superoxide anion 농도변화와 배발생과의 관계를 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물 및 배아 준비

체외에서 발달정지현상을 보이는 6~8주된 ICR 계통의 자성생쥐에 5 IU PMSG와 5 IU HCG를

48시간 간격으로 차례로 복강 주사하여 과배란 유도시킨 다음 8~10주령 동일 계통의 웅성생쥐와 1:1로 교배시켰다. 자성생쥐를 경추탈골하여 회생시키고 난관대부에서 1-세포기 수정란을 회수한 다음 1 mg/ml hyaluronidase (Sigma, H-3506)가 첨가된 배지에서 난구세포를 제거하였다.

2. 인간난관상피세포 공배양준비

인간난관상피세포는 자궁적출술을 시행하는 가임여성의 난관을 획득하여 지방과 결합조직을 미세수술가위로 제거하고 인산완충액 (Dulbecco's Phosphate buffered saline, dPBS: Gibco 21300-025)에서 여러번 세척하였다. 팽대부 부분을 절개한 후 상피세포를 수술용 칼로 긁어낸 다음 300 x g에서 5분간 2번 원심분리시켰다. 세포침전물을 TCM199 + 10% 인간난포액 (hFF)와 섞어 25 cm³ flask에서 3일간 배양하여 단일층이 형성되었을 때 상층배양액을 버리고 신선한 배양액으로 2일간 더 배양하였다. 배양접시 표면에 부착된 상피세포들을 0.05% (w/v) trypsin / 0.53 mM EDTA 용액으로 분리시킨 다음 4-well dish (Nunc, Roskilde, Denmark)에 well당 1x10⁵/ml 농도로 균주하고 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였다. 공배양 1시간 전에 신선한 HTF + 0.4% BSA로 교체하여 실험에 이용하였으며, HTF + 0.4% BSA 배양액에서만 배양한 균을 대조군으로 하였다.

3. 조건배양액 준비

조건배양액 (CM)은 2일 동안 난관상피세포 단독으로 배양했을 때와 배아와 공배양했을 때로 나누었다. CM-1은 2일간 난관상피세포만을 배양한 뒤 사용전까지 -20℃에 보관한 것이고, CM-2는 난관상피세포만을 배양한 뒤 사용 직전에 준비하였고, CM-3는 배아와 공배양한 뒤 조건배양액을 사용하기 직전에 준비한 것이다. CM-4, CM-5는 각각 CM-2, CM-3를 microconcentrator (10 KDa cut-off)를 이용하여 농축시켜 얻은 것으로 농축된 조건배양액은 신선한 HTF + 0.4% BSA와 섞어 30 µl 배양소적을 만들어 1-세포기 생쥐배아의 배발

Table 1. Effects of coculture on the development of zygotes in vitro

Culture condition	No. of zygotes	No.(%) of developed to			
		2-cell	4-8 cell	blastocyst	≥ hatching
Control	75	73 (97)	15 (20) ^a	2 (3) ^a	0 (0) ^a
Coculture	75	72 (96)	54 (72) ^b	47 (63) ^b	32 (43) ^b

*Difference superscripts within column indicated significant differences (p<0.05).

**The results were mean of three experiments

생에 이용하였다.

4. 배양삽입물 (cell culture insert)을 이용한 공배양

배아와 난관상피세포사이의 접촉이 배아 발달에 끼치는 영향을 알아보기 위해 배양삽입물 (cell culture insert, transwell: Corning 3450)을 난관상피세포 단일층위에 놓은 다음 피펫 끝이 구멍 크기 0.45 micron인 막에 닿지 않게 조심하여 1-세포기 생쥐배아를 올려 놓았다. 이 배양삽입물은 난관상피세포에서 분비되는 단백질이나 영양물질의 통과만 가능한 것으로 이러한 방법을 배아와 상피세포의 접촉이 없는 비접촉성 공배양이라고 정의하였다.

5. 조건배양액에서 superoxide anion치 측정

대조군, 공배양군, 배아와 난관상피세포의 접촉이 없는 비접촉성 공배양군에서 1-세포기 생쥐배아를 48시간 동안 배양한 후 각 조건배양액에서 Lucigenin (Sigma, M-8010)을 이용하여 superoxide anion치를 측정하였다. Lucigenin은 superoxide anion에 대해 높은 특이성을 가진 것으로 250 μM 농도로 준비하였으며, Superoxide anion치는 Luminometer (Luminomat LB 96P)하에서 발광양을 20분간 측정함으로써 결정하였다.⁸

6. 통계학적 분석

실험을 통하여 얻은 결과들의 유의성 검사를 위하여 Mann-Whitney U Test를 시행하였으며 p값이 0.05 이하일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 공배양이 1-세포기 수정란 발달에 미치는 영향

1-세포기 생쥐배아를 단순배양액 (대조군)과 공

배양에서 6일 동안 배양시킨 결과 2-세포기 배아 단계까지의 배발생률은 90% 이상으로 양군간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 4-8세포기, 포배기, 부화시기까지의 배발생률은 20%, 3%, 0%이고 공배양군은 72%, 63%, 43%로 공배양군에서 유의하게 높았다 (Table 1).

2. 조건배양액이 배발생에 미치는 영향

공배양의 배발생 촉진효과가 난관상피세포에서 분비되는 배아영양조절인자에 기인하는 지를 알아보기 위해 1-세포기 생쥐배아를 앞서 설명한 5종류의 조건배양액에서 6일 동안 배양하였다. 조건배양액-1에서는 2-세포기 이후로 배발달이 일어나지 않았으며, 조건배양액 2, 3, 4, 5에서는 각각 4-8세포기 배아단계까지 발생률이 32%, 31%, 37%, 32%으로 대조군 (18%)보다 높았으나 포배형성을 및 부화율 3~7%로 대조군 (3%)과 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

3. 접촉이 없는 비접촉성 공배양의 배발생 효과

배아와 체세포간의 접촉이 공배양의 효과와 관계있는지 조사하기 위해 공배양조건하에 배양삽입물 (cell culture insert)을 난관상피세포 단일층위에 설치한 비접촉성 공배양조건에서 1-세포기 배아를 6일 동안 배양한 결과 2-세포기 배아 단계까지는 정상적인 배발생을 보였다. 4세포기, 포배기, 부화율은 각각 19%, 3%, 0%로 대조군 (20%, 2%, 0%)과 비슷하게 배발생이 정지되었던 반면, 공배양에서 포배형성과 부화율은 각각 60%와 40%로 나타나 비접촉성 공배양하에서 공배양의 효과가 나타나지 않음을 알 수 있었다 (Table 3).

4. superoxide anion치의 변화

공배양에 따른 배양조건 내 유해성분의 하나인 superoxide anion 치의 변화가 배발생 촉진효과와 관계할 수 있다고 사료되어 대조군, 공배양,

Table 2. Effects of different conditioned media on the development of zygotes in vitro

Culture condition	No. of zygotes	No. (%) of developed to			
		2-cell	4-8 cell	blastocyst	≥ hatching
Control	62	59 (95)	11 (18) ^b	2 (3) ^b	0 (0) ^b
CM-1	60	59 (95)	0 (0) ^b	0 (0) ^b	0 (0) ^b
CM-2	63	60 (95)	20 (32) ^{ba}	4 (6) ^b	0 (0) ^b
CM-3	61	58 (95)	12 (31) ^{ba}	4 (7) ^b	1 (2) ^b
CM-4	62	60 (97)	23 (37) ^{ba}	3 (5) ^b	0 (0) ^b
CM-5	60	56 (93)	19 (32) ^{ba}	2 (3) ^b	0 (0) ^b
Coculture	61	59 (97)	46 (75) ^a	37 (61) ^a	27 (44) ^a

*CM-1, medium conditioned with oviduct epithelial cells for 2 days and stored at -20°C before use. CM-2, medium conditioned with only oviduct epithelial cells for 2 days just before use as culture medium. CM-3, medium conditioned with oviduct epithelial cells and embryos for 2 days just before use as culture medium. CM-4 and CM-5 were derived from microfiltration of CM-2 and CM-3.

**Different superscripts within columns indicated significant differences ($p < 0.05$).

***The results were mean of three experiments

Table 3. Effects of contactless coculture system on the development of zygotes

Culture condition	No. of zygotes	No. (%) of developed to			
		2-cell	4-8 cell	blastocyst	≥ hatching
Control	92	87 (95)	18 (20) ^b	2 (2) ^b	0 (0) ^b
Contactless	100	95 (95)	19 (19) ^b	3 (3) ^b	0 (0) ^b
Coculture	94	88 (94)	70 (75)	56 (60) ^a	38 (40) ^a

*Contactless coculture is the system that a cell-culture insert was set on the confluent oviductal cell monolayers unlike the normal coculture system.

**Different superscripts within columns indicated significant differences ($p < 0.05$).

***The results were mean of three experiments

비접촉성 공배양군의 조건배양액에서 superoxide anion치를 측정하였다. 공배양과 비접촉성 공배양에서는 superoxide anion치의 변화가 없었으나 대조군에서는 시간이 지남에 따라 superoxide anion치의 유의한 증가 양상을 나타냈다 ($p < 0.05$) (Figure 1).

고 찰

포유동물 배아의 체외배양시 종특이적으로 배 발달정지현상 (cell block event)이 일어난다. 이러한 현상은 배아의 유전자 활성화시에 일어나는 것으로 부적합한 배양조건 때문으로 생각되고 있다.⁹ Poueymiron 등은 공배양이 전사 (transcription) 과정의 촉진과 포배기까지의 배아 발달을 돕는다고 했고,¹⁰ Ouhibi와 Liu 등은 인간난관상피세포를 이용한 공배양이 착상전 배아의 발달을 향상시키

는 것을 보여주었다.^{11,12} 실제로 다양한 세포를 이용한 사람을 포함한 포유류 배아 공배양에 관한 최근의 많은 연구들은 공배양이 체외수정 후 배아의 질, 포배형성을, 착상 및 임신율을 향상시킨다고 보고하였다.^{13,14} 본 연구에서도 인간난관상피세포를 이용한 공배양이 생쥐배아의 발달정지현상을 극복하고 성공적으로 포배기까지 발달시켰음을 보여주었다. 이러한 결과들은 공배양이 체외 배 발달정지현상을 극복하여 배발생을 촉진시키는 것을 입증하고 있다.

Bongso 등은 공배양의 작용기전을 크게 2가지 측면에서 설명했다.³ 하나는 체세포에 의한 배아 영양조절인자의 분비 (positive conditioning role)이고 다른 하나는 체세포의 대사작용에 의해 배양액내 유해성분의 제거이다 (negative conditioning role). 그러나 공배양의 이로인 효과에 대한 작용기전은 명확히 설명되지 못하고 있다.

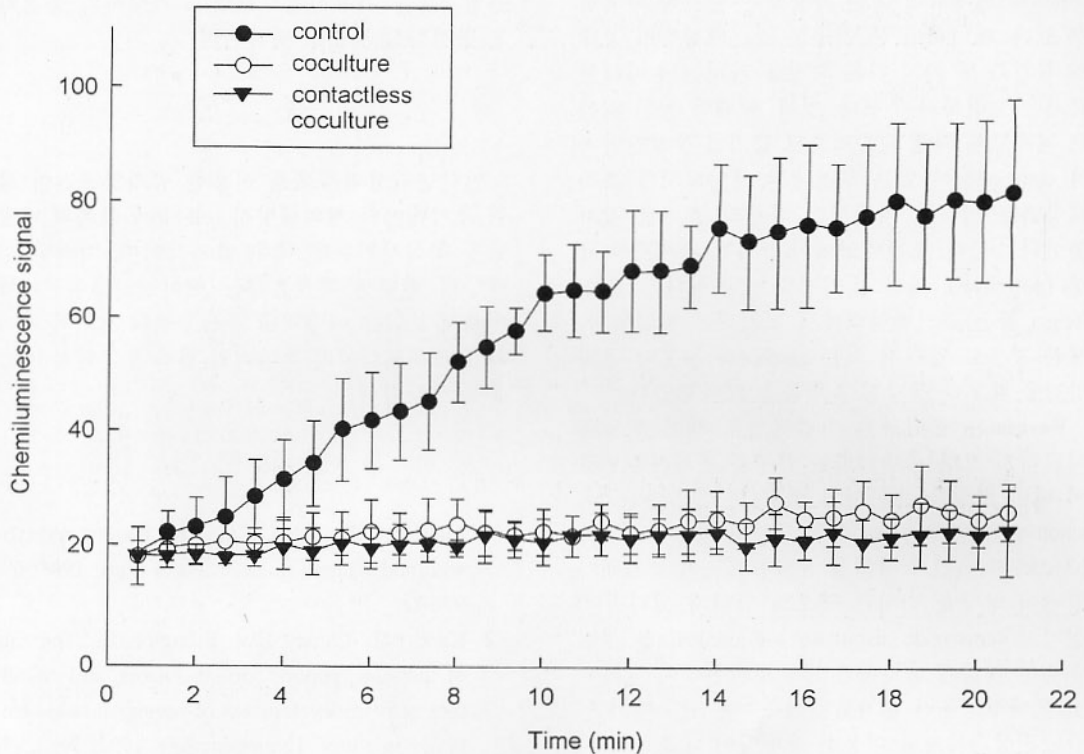


Figure 1. Lucigenin chemiluminescence tracing. After culture of zygote embryos for 3 days in medium alone (control), coculture, and contactless coculture, the level of superoxide anion in each conditioned medium were measured by an assay using lucigenin chemiluminescence tracing. Readings were started immediately on addition of lucigenin to each conditioned media. Control shows high superoxide anion compared to other groups. Values were means \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$.

많은 연구들은 체세포가 특이적인 당단백질, 성장인자와 cytokine을 분비하며^{3,11,15} 초기배아 역시 다양한 세포 성장인자에 대한 receptor를 갖고 있음을 보여주었다.¹⁶ Ferry와 Chen 등은 소의 난관상피세포와 과립세포 공배양으로부터 조건배양액을 이용하여 소와 생쥐배아의 포배기 발달율이 증가함을 보여주었으며,^{17,18} Maeda 등은 소의 과립세포와 vero cell을 공배양한 조건배양액에서 10~30 KDa과 30 KDa 이상의 분자량을 가진 2종의 배아영양조절인자가 있음을 제시했고,¹⁹ Lepens와 Sakkas는 인간난관상피세포에서 생산되는 고분자의 (>100 KDa) 물질이 있음을 보고했다.²⁰ 그러나 이는 공배양의 positive conditioning role에 대한 간접적인 증거만을 제시했을 뿐 직접적인 증거가 되지 못한다. 왜냐하면 조건배양액이 모든 종에서 배아 발달을 도와주지 못한다는 보고도 있기 때문이다.^{21,22}

본 연구에서는 공배양의 배발생 촉진효과가 배아영양조절인자와 관계하는지를 조사하기 위해 5종의 다양한 조건배양액을 적용하였으나, 조건배양액은 준비 방법에 관계없이 공배양의 배발생 촉진효과를 유발하지 못했으며, 더욱이 배양삽입물을 이용한 비접촉성 공배양에서도 공배양의 효과가 사라졌다. 이러한 결과들은 공배양의 효과가 배아영양조절인자보다는 배아와 체세포간의 직접적인 접촉에 기인하고 있음을 시사한다. Fukaya 등은 공배양의 효과가 배아와 체세포간의 접촉과 연관이 없다고 보고한 바 있으나,⁶ 체내에서 이미 유전자 활성화가 시작된 생쥐 2-세포기 배아를 사용하였기 때문에, 이 결과는 생쥐 발달 정지현상과 세포 접촉에 의한 공배양의 효과를 관찰하기에는 적합하지 않은 것으로 사료된다.

본 연구에서 조건배양액에서 공배양의 배발생 촉진효과가 없었다 할 지라도 공배양의 positive

conditioning role에 대한 가능성은 완전히 배제될 수 없다. 왜냐하면 본 연구는 조건배양액이 공배양 환경과 몇 가지 다른 특징을 가지는데 이러한 문제를 고려하지 못했다. 첫째, 공배양 동안 배아는 체세포에 의해 계속적으로 증가하는 성장인자와 cytokine들이 있는 환경에서 배양되지만 조건배양액은 이러한 역동적인 환경의 효과를 갖지 못한다.²³ 둘째, 조건배양액의 효과는 체세포의 극성(polarity)에 따라 달라진다는 점이다.²⁴ 셋째, Reiger 등은 조건배양액에서 초기배아 발달에 유해한 것으로 알려져 있는 glucose의 농도가 공배양했을 때보다 상당히 높았음을 보여주었다.²⁵

Bavister는 공배양이 직접적으로 배아 발달을 자극하기 보다는 부적합한 환경을 완화시킴으로써 배아 발달을 돕는다고 주장했다.²⁶ Superoxide anion과 hydrogen peroxide를 포함한 반응산소기가 p34cdc2의 인산화 저해를 유발함으로써 초기배아 발달에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다.^{27~30} 실제로 superoxide dismutase나 thioredoxin을 생쥐 수정란 배양에 첨가하면 발달정지현상이 극복되고 포배형성율이 증가되었다.^{31,32} 본 연구에서 인간난관상피세포를 이용한 공배양이 대조군과 비교해서 superoxide anion이 상당히 감소되었음을 관찰할 수 있었다. 앞서 Harvey 등은 소 난관상피세포가 항산화효소의 전사체를 합성한다고 보고했고, Fukui 등은 체세포들이 배아가 체외배양시 노출될 수 있는 산소대사물의 수준을 감소시킴으로써 superoxide anion으로 인한 배발생 저해효과를 감소시킬 수 있음을 시사한 바 있다.^{33,34} 공배양과 비접촉성 공배양에서 superoxide anion치가 변하지 않는 반면, 대조군에서는 계속적으로 증가한다는 본 연구 결과는 대조군이 superoxide anion의 생성을 증가시켜 보다 유해한 환경을 초래하는 반면 공배양하의 체세포의 증식은 증가된 superoxide anion을 제거하여 배양조건을 향상시킬 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 본 연구에서 비접촉성 공배양은 superoxide anion 치가 증가되지 않았음에도 불구하고 공배양의 효과가 나타나지 않았는지에 대해서는 명확하지 않으며 이를 밝히기 위한 연구가 진행중이다. 아마도 배아의 유전자 활성화(embryonic genome activation)을 위해서는 superoxide anion 치의 감소와 함께 다른 요소가 필요한 것으로 사료되며, 그 중 하나로 배아와 세포사이의 직접적인 접촉을 생각해 볼 수 있는데, 이는 세포간의 접촉이 발달정지현상을 극복하는 신호

전달체계를 가동시킴으로써 초기배아의 유전자를 활성화할 것으로 생각된다.

결 론

인간난관상피세포를 이용한 공배양조건이 생쥐 초기배아의 체외배양시 cell-block 극복과 배발달을 향상시키는데 매우 효과적이며, 이러한 공배양의 배발생 촉진효과는 배아영양조절인자에 의해서 보다는 배양액내 유해물질의 제거와 배아와 보조세포사이의 직접적인 접촉에 기인하고 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Mahendra De Silva. Culturing human embryos with and without glucose. *Fertil Steril* 1998; 69: 970-1.
2. Kane MT, Carney EW, Ellington JE. The role of nutrients, peptide growth factors, and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology* 1992; 38: 297-313.
3. Bongso A, Fong C-Y, Ng S-C, 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.
4. Freeman M, Whitworth M, Hill G. Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 408-14.
5. Wiemer KE, Cohen J, Tucker MJ, Godek RA. The application of co-culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 4: 226-38.
6. Fukaya T, Chida S, Murakami T, Yajima A. Is direct cell-to cell contact needed to improve embryonic development in co-culture? *Tohoku Exp Med* 1996; 180: 225-32.
7. Bavister BD. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod* 1992; 7: 1339-41.
8. McKinney KA, Lewis SEM, Thompson W. Reactive oxygen species generation in human sperm: Luminol and lucigenin chemiluminescence.

- science probes. *Arch Androl* 1996; 36: 119-25.
9. Bolton VN, Oades PJ, Johnson MH. The relationships between cleavage, DNA replication and gene expression in the mouse 2-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1984; 79: 139-63.
 10. Poueymirou WT, Conover JC, Schultz RM. Regulation of mouse preimplantation development: differential effect of CZB medium and Whitten's medium on rates and patterns of protein synthesis in 2-cell embryos. *Biol Reprod* 1989; 41: 317-22.
 11. Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J, Menezo Y. Co-culture of 1-cell mouse embryos on differential cell supports. *Hum Reprod* 1990; 5: 737-43.
 12. Liu LPS, Chan STH, Ho PC, Yeung WS. Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryo. *Mol Hum Reprod* 1995; 10: 2781-5.
 13. Bongso A, Ng S-C, Fong C-Y, Ratnam S. Co-cultures: A new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991; 56: 179-91.
 14. 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.
 15. Moreau GM, Arslan A, Douglas DA. Development of immortalized endometrial epithelial and stromal cell lines from the mink (*Mustela vison*) uterus and their effects on the survival in vitro of mink blastocyst in obligate diapause. *Biol Reprod* 1995; 53: 511-8.
 16. Schultz GA, Heyner S. Growth factors in preimplantation mammalian embryos. In *Oxford Review of Reproductive Biology*. Milligon SR, ed., Oxford University Press, Oxford. 43-82.
 17. Ferry L, Mermillod P, Massip A, Dessy. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology* 1994; 42: 445-53.
 18. Chen HF, Ho HN, Chen SU, Chao KH. Peptides extracted from Vero cell culture overcome the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11: 165-71.
 19. Maeda J, Kotsuji F, Negami A, Kamitani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and Vero cells cultured an exogenous protein-free and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. *Biol Reprod* 1996; 54: 930-6.
 20. Leppens G, Sakkas D. Differential effect of epithelial cell-conditioned medium fractions on preimplantation mouse embryos development. *Hum Reprod* 1995; 10: 1178-83.
 21. Rexroad CE, Powell AM. Co-culture of bovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1988; 28: 387-97.
 22. Bongso A, Ng SC, Ratnam S. Co-cultures; their relevance to assisted reproduction. *Hum Reprod* 1990; 5: 890-3.
 23. Desai N, Goldfarb J. Co-cultured human embryos may be subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the co-culture interval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1601-5.
 24. Gomez E, Uria H. Morphological and functional characterization of bovine oviductal epithelial cells monolayers cultured on polarizing membranes. *Reprod Nutr Dev* 1997; 37: 151-62.
 25. Reiger D, Grisart B, Semple E, Langendonck A, Betteridge KJ, Dessy F. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 91-8.
 26. Barvister BD. Co-culture for embryo development: Is it really necessary? *Hum Reprod* 1992; 7: 1339-41.
 27. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro and in vivo. *Development* 1990; 109: 501-7.
 28. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 69-75.

29. Matsumoto H, Noda Y, Goto Y, Kishi J, Nonogaki T, Mori T. The effects of heavy metal ions on the in vitro development of mouse embryos: a compaction of the developmental ability between Ham's F-10 and alpha-MEM. *J Reprod Dev* 1993; 39: 1-6.
30. Natsuyama S, Noda Y, Tamashita M, Nagayama Y, Mori T. Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block. *Biochim Biophys Acta* 1993; 176: 90-4.
31. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 356-60.
32. Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Protection from oxidative stress by thioredoxin and superoxide dismutase of mouse embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 1991; 6: 1305-10.
33. Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X. Expression of genes encoding antioxidants enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo co-culture. *Biol Reprod* 1995; 53: 532-40.
34. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors affecting the in vitro development of in vitro matured bovine oocytes and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 1991; 22: 125-31.