

Epidermal Growth Factor(EGF)가 생쥐 초기배아의 발생에 미치는 영향

한양대학교 자연과학대학 생물학과, 제일병원 불임연구실¹, 이화여자대학교 의과대학 의학과², 서울여자대학교 자연과학대학 생물학과³

변혜경 · 이호준¹ · 김성례² · 김해권³ · 김문규

Effect of Epidermal Growth Factor(EGF) on Early Embryonic Development in Mouse

Hye Kyung Byun, Ho Joon Lee¹, Sung Rye Kim², Hae Kwon Kim³,
and Moon Kyoo Kim

*Department of Biology, Hanyang University, Infertility Resaerch Laboratory¹,
Cheil General Hospital, Department of Medicine², Ewha Woman's University,
Department of Biology³, Seoul Women's University, Seoul, Korea.*

= Abstract =

Growth factors (GFs) produced by the embryo or by the maternal reproductive tract have been reported to regulate the embryonic development and differentiation. Among GFs, EGF as a mitogen plays a role in mitosis and functional differentiation of trophectoderm cells in mouse. The present study was carried out to investigate the effect of EGF on development of mouse embryos and to localize EGF in the mouse oocytes and embryos, which has been reported to be detected in the reproductive tract in mammals.

To investigate the effect of EGF on the development of the embryo, mouse 2-cell embryos were cultured to blastocysts stage in Ham's F10 medium, treated with EGF(10-50 ng/ml) for 72 hrs.

Immunocytochemistry was performed from oocyte to blastocyst stage with anti-EGF and anti-Mouse IgG, in order to determine the stage which EGF would be expressed in mouse.

Exogenous EGF (more than 10 ng/ml) in the culture medium improved the developmental and hatching rates in the mouse embryos. As a result of immunocytochemistry, the embryonic EGF was expressed after the late 4-cell stage. EGF is thought to enhance preimplantation embryonic development and hatching.

Exogenous EGF in the culture medium is thought to activate EGF receptor in the late 4-cell embryos and to enhance blastulation and hatching in mouse embryos. It is concluded that EGF enhances the developmental and hatching rates in the mouse embryos.

* 본 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성 연구비 (BSRI-94-4437) 지원과 제일병원 기초연구비 지원에 의한 것임.

서 론

포유류 배아의 발생과정에서 착상전 초기배아의 성장 및 분화는 특정 유전자의 발현과(Clegg and Piko, 1982; Wiley and Obasaju, 1989; Telford *et al.*, 1990) 이를 조절하는 호르몬(Roblero and Izquierdo, 1976; Clin *et al.*, 1977; Shutt and Lopata, 1981; Fishel and Edwards, 1984; Rosenblum *et al.*, 1989), 에너지원 (Brinster, 1965; Biggers *et al.*, 1989; Poueymirou *et al.*, 1989; McKiernan *et al.*, 1991; Kane *et al.*, 1992; Takahashi and First, 1992; Brison *et al.*, 1993), 그리고 성장인자 (Kane *et al.*, 1992; Wales, 1992; Yang *et al.*, 1993) 등에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다. 이들 가운데 배아 자체내에서 분비되거나 (Rappolee *et al.*, 1988; Werb, 1990; Schultz *et al.*, 1993) 또는 모체로부터 공급되는 (Brigstock *et al.*, 1989; Mattson *et al.*, 1989) 성장인자가 배아의 발생 및 분화에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다.

가장 널리 알려진 EGF는 53개의 아미노산으로 구성된 분자량 6.2 KD의 single chain polypeptide로서, 상피세포, 증배엽세포, 결체조직, 신경교세포, 난포내 과립세포 등을 배양할 때 mitogen으로 작용하여 이들의 성장과 분화를 자극한다고 보고되었다(Hill, 1989). 또한 EGF와 그 수용체가 포유류의 난소(Maruo *et al.*, 1993)를 비롯한 수란관 (Lei and Rao, 1992; Morishige *et al.*, 1993), 자궁내막 (Chagini *et al.*, 1986; Berchuck *et al.*, 1989) 등의 조직에서 검출되었으며, EGF는 생쥐, 소, 사람 등의 미성숙난자의 세포질 성숙에 작용하고 (Dekel and Sherizly, 1985; Downs *et al.*, 1988, 1989; Carson *et al.*, 1989; Das *et al.*, 1991; Park and Lin, 1993; Harper and Brackett, 1993) 생쥐 배아 영양배엽의 세포분열 및 기능 분화에도 mitogen으로 작용한다고 보고되었다 (Paria and Dey, 1990).

착상전 초기배아의 발생과정에서 EGF의 작용 시기와 그 조절기작은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으며, 앞으로 보다 폭넓은 연구가 요구되고 있다. EGF를 배양액에 처리하여 형태학적으로 배아의 발생정도를 측정하거나 면역세포화학방법(immunocytochemistry)을 이용하여 EGF (Rappolee *et al.*, 1988; Morishige *et al.*, 1993) 또는 그 수용체가 (Wiley *et al.*, 1992; Winters *et al.*,

1993) 배아에서 발현되는 시기를 알아 봄으로써 발생과정에서 EGF가 착상전 초기배아의 발생 및 분화에 미치는 영향을 알아 볼 수 있다.

본 연구에서는 EGF가 생쥐 초기배아의 포배 형성과 부화에 미치는 영향을 알아보고자 실행되었다. 그리고 EGF를 일정 농도로 희석, 처리하여 배아 발생에 효과적인 성장인자의 농도를 알아보고자 하였다. 또한 anti-EGF를 난자와 각 발생단계의 배아에 처리하여 EGF의 발현 시기를 알아 봄으로써 EGF가 배아의 발생에 작용하는 시기를 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 배아의 획득

배아를 획득하기 위하여 암컷 생쥐의 복강에 PMSG 5 IU를 주사하고, 48시간 후에 hCG 5 IU를 주사하여 과배란을 유도한 뒤 수컷 생쥐와 교배시켰다. 다음날 아침 교배(copulation plug)를 확인하고, hCG주사 후 48~50시간에 경추과피로도살하여 수란관을 적출한 후 해부현미경(Wild M5) 하에서 기본배양액 (0.4% BSA-Ham's F10)을 관류시켜 2-세포기 배아를 획득하였다. 획득한 배아는 해부현미경 하에서 관찰하여 건강하게 보이는 배아만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2. EGF의 처리 및 배아의 배양

EGF(Sigma)는 멸균된 HBSS에 녹여 1,000 ng/ml의 stock solution으로 준비한 후 50 μ l씩 분주하여 -20°C 이하에서 보관하였다. 사용 직전에 기본배양액으로 10~50 ng/ml의 농도로 희석하였다.

농도별로 50 μ l의 drop을 만들어 paraffin oil (Sigma)로 덮어 체외배양을 준비하였다 (Brinster, 1963). 각 실험군당 10~20개씩의 배아를 각각의 농도별로 준비된 drop에 넣어 37°C, 5% CO₂, 95% 공기가 공급되고 100% 습도가 유지되는 배양기 (Queue 2700)내에서 72시간 동안 배양하였다.

3. Anti-EGF의 처리

Anti-EGF(Sigma)와 anti-Mouse IgG(Sigma)는 PBS를 이용하여 각각 1: 100, 1:50의 농도로 희석하였다.

과배란을 유도한 암컷의 난소에서 난자를, 수란관과 자궁에서 수정관과 2-, 4-, 8-세포기, 상실

Table 1. Development of mouse 2-cell embryos treated with epidermal growth factor (EGF) in *in vitro* culture for 72 hr

Treatment (ng/ml)	Total No. of embryos	Developmental stage				
		2~4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst	Hatching
Control	120	21 ^a (17.5±0.1)	5 (4.2±0.1)	8 (6.7±0.1)	86 (71.7±0.4)	65 (54.2±0.3)
10	120	16 (13.3±0.1)	2 (1.7±0.0)	0 (0.0)	102* (85.0±0.5)	86* (71.7±0.4)
20	120	6 (5.0±0.1)	3 (2.5±0.1)	4 (3.3±0.1)	107* (89.2±0.4)	74* (61.7±0.3)
30	120	5 (4.2±0.1)	0 (0.0)	5 (4.2±0.1)	110* (91.7±0.5)	82* (68.3±0.4)
40	120	3 (2.5±0.0)	3 (2.5±0.1)	7 (5.8±0.1)	107* (89.2±0.6)	92* (76.7±0.4)
50	120	5 (4.2±0.1)	4 (3.3±0.1)	5 (4.2±0.1)	106* (88.3±0.6)	91* (75.8±0.5)

Control; 0.4% BSA-Ham's F10, a; (Mean ± SE)%, *p< 0.01, n=9

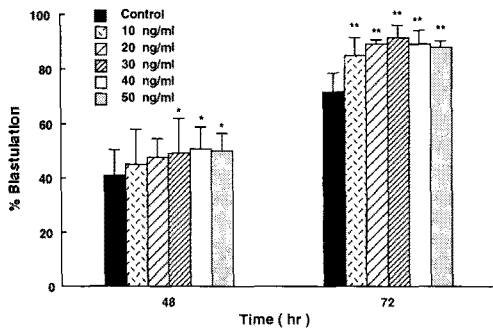


Fig. 1. Blastulation of 2-cell embryos treated with EGF for up to 48 and 72 hr culture in mouse. (Control: 0.4% BSA-Ham's F10) Values are mean, bars are SD. *p<0.05, **p<0.01

기, 포배기, 부화된 포배기 등 각 발생단계별 배아를 획득하여 0.5% pronase(Sigma)에 상온에서 3분 동안 처리하여 투명대를 제거하였다. 투명대가 제거된 이들 난자와 배아를 10% PVP(80KD)-PBS (Sigma)에 넣어 4℃에서 냉각시킨 후, 최종 농도가 2% paraformaldehyde (Sigma)와 0.1% Triton X-100 (Sigma)이 되도록 혼합한 고정액에 4℃에서 30분 동안 처리하였다. 고정시킨 난자와 배아를 4℃ PBS로 잘 씻어낸 후 anti-EGF와 4℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 4℃ PBS로 3회 씻어낸 후 poly-L-lysine solution (Sigma)을 처리한 slide glass 위에 놓고 형광현미경 (Nikon, TMD) 하에서 관찰하였다.

4. 관찰 및 통계 분석

배아를 배양하면서 24, 48, 72시간마다 도립간 현미경(Nikon, TMD)하에서 관찰하였다. 배아의 상태는 2-, 4-, 8-세포기, 상실기, 포배기 배아로 구분하였고, 퇴화되거나 비정상적인 형태로 분명치 않은 것은 acridine orange로 염색하여 확인하였다.

통계학적 유의성은 Student's t-test 방법을 사용하였으며 p값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. EGF가 포배형성에 미치는 영향

EGF를 처리한 기본배양액에서 생쥐 2-세포기 배아를 체외에서 48시간 배양 후 발생 정도를 관찰한 결과는, 포배형성률이 대조군과 10, 20, 30, 40, 50 ng/ml 처리군 (n=9)에서 각각 평균 40.8, 45.0, 47.8, 49.4, 50.6, 50.0%로 나타나 30 ng/ml 이상 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 (p<0.01) 높은 것으로 나타났다(그림 1).

2. EGF가 2-세포기 배아 발생에 미치는 영향

생쥐 2-세포기 배아를 체외에서 72시간 배양했을 때 대조군에서 포배는 71.7±0.4(86/120)%, 부화된 포배는 54.2±0.3(65/120)%의 결과를 나타내

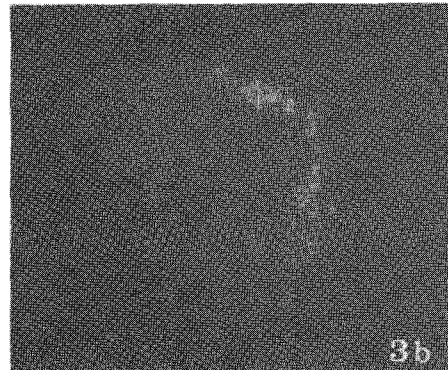
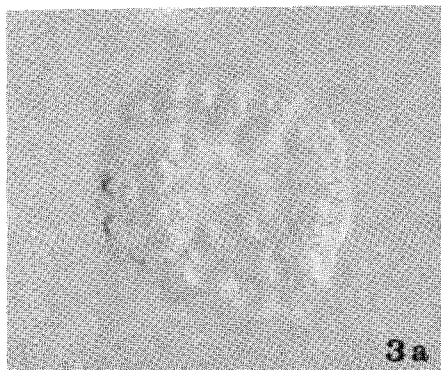
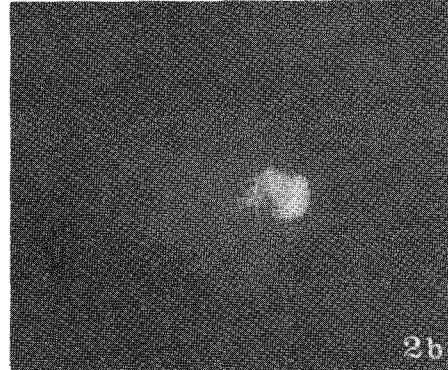
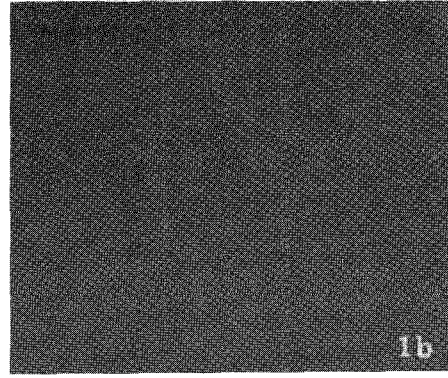
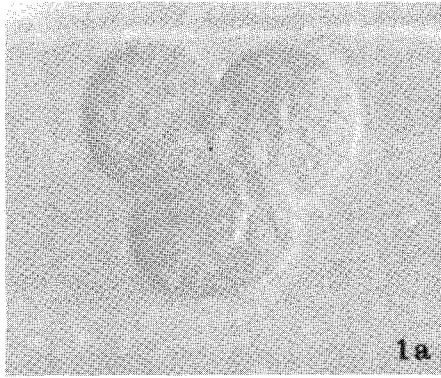


Plate I. Microphotographs of EGF localization in the mouse embryos immunocytochemically stained with anti-EGF and anti-Mouse IgG(x400).

1. Early 4-cell stage embryo after 50 hr post hCG injection observed under conventional light microscope (LM) (with Normarski's optics) (a), and showing none of EGF under fluorescent microscope (FM) (b), 2. Late 4-cell stage embryo after 60 hr post hCG injection under LM (a), and showing EGF under FM (positive staining) (b). 3. Hatched blastocyst under LM (a), and showing EGF at the trophoblast under FM (intense staining) (b).

었다. 10~50 ng/ml의 농도별 실험군에서 각각 85.0±0.5(102/120), 89.2±0.4(107/120), 91.7±0.5(110/120), 89.2±0.6(107/120), 88.3±0.6(106/120)로서 평균 88.7%의 포배발생률이 나타났

고, 부화률은 각각 71.7±0.4(86/120), 61.7±0.3(74/120), 68.3±0.4(82/120), 76.7±0.4(92/120), 75.8±0.5(91/120)%로서 평균 70.8%로 나타났다 (표 1).

포배로의 발생률과 부화률은 EGF를 처리했을 때 대조군에 비해 유의하게 ($p < 0.01$) 높은 것으로 나타나 EGF가 생쥐 초기배아의 발생과정에 효과적으로 작용함을 알 수 있었다.

3. EGF의 발현

본 실험의 결과에서 난자와 수정란, 2-세포기 배아에서는 EGF가 발현되지 않았다. 4-세포기에서는 hCG주사 50시간 경과 후 획득된 초기 4-세포기에서는 EGF가 발현되지 않았으나 (도판 I-1a, 1b), hCG주사 60시간 경과 후의 후기 4-세포기에서는 EGF가 발현되는 것을 알 수 있었다. (도판 I-2a, 2b).

상실기와 포배기에서 그리고 부화된 포배기에서는 EGF가 발현되었는데, 특히 포배기에서 영양배엽에 균일하게 분포하는 것을 알 수 있었다 (도판 I-2a, 2b, 3a, 3b).

고 찰

최근 생식수관에서 합성, 분비되어 생식수관의 기능을 조절하는 것으로 보고된(Hill, 1989; Nelson *et al.*, 1991) EGF를 배양액에 처리하여 생식수관과 유사한 환경을 조성하여 포유류의 착상전 초기배아를 체외배양했을 때 EGF가 배아의 발생에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

Colver 등(1991)은 EGF, PDGF, FGF등의 성장인자를 생쥐 착상전 초기배아에 처리했을 때 이들 성장인자가 발생에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 반면에 Paria와 Dey(1990)는 EGF, TGF- β , TGF- α , IGF-I 등을 처리한 실험에서 성장인자가 생쥐 착상전 초기배아의 발생을 증진시켰다는 상반된 결과를 보고하였다. EGF를 100, 500, 1,000 ng/ml의 고농도로 처리한 예비실험에서, 72시간 체외배양 후 포배로의 발생률이 대조군 68.0%에 비해 각각 70.0, 76.0, 72.0%로 나타났고 부화률이 대조군 68.0%에 비해 각각 38.0, 32.0, 36.0%로 나타나 고농도의 성장인자 처리가 배아의 발생을 억제시키거나 퇴화시키는 등의 역효과를 나타내지 않음을 알 수 있었으며 이는 Paria와 Dey(1990)의 결과와 일치하였다.

본 실험의 EGF 처리군에서 포배형성율과 부화률이 대조군에 비해 유의하게 ($P < 0.01$) 높게 나타났다. 이것은 EGF가 할구 증식을 촉진시켜 초기배아의 compaction과 포배형성 (blastulation)

을 증진시켰으며 영양배엽거대세포 (trophoblast giant cell)에 작용하여 세포내 대사를 활성화시켜 포배강 팽대(blastocoel expansion)를 촉진시키고 또한 부화 및 이후 분화를 촉진시켰기(Haimovici and Anderson, 1993) 때문으로 사료되며 Nielson 등(1986), Wood와 Kaye(1989), Dardik과 Schultz(1991) 그리고 Kane 등(1992)의 보고 내용과 일치하였다.

면역세포화학방법을 이용하여 난자와 수정란에서부터 부화된 포배기 배아에 이르기까지 각 발생 단계별 배아에 anti-EGF와 anti-Mouse IgG를 처리했을 때 후기 4-세포기 배아 이후부터 EGF가 발견되었으며 특히 포배기와 부화된 포배기에서 EGF가 영양배엽에 균일하게 분포하는 것으로 나타났다(도판 I). 이것은 EGF수용체가 4-세포기 이후에 발견된다는 Wiley 등(1992)의 보고 내용과 일치하였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 배아 자체에서 생산된 EGF는 생쥐 배아에 존재하는 EGF 수용체가 활성화되기 시작한 4-세포기 이후부터 작용을 개시하여 compaction, 포배형성 시기, 그리고 부화되는 시기에 직접적으로 autocrine하게 작용하여 compaction과 포배형성 및 부화를 증진시키며 착상에도 작용할 것으로 사료된다. 따라서 EGF는 생쥐 착상전 배아의 후기 발생을 촉진시키는 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

본 실험의 결과에서 나타났듯이 포배로의 발생률과 부화률에 있어서 EGF를 일정농도 이상으로 처리했을 때에는 역치현상을 나타내었고 배아의 발생이 억제되거나 퇴화되는 등의 역효과는 관찰되지 않았으며, 고농도로 처리한 예비 실험에서도 같은 결과를 얻었다. 이로써 외부에서 첨가되는 성장인자가 배아의 발생에 저해를 주지 않으며 또한 배아에서 활성화되는 수용체의 수가 한정되었기 때문에 적정농도 이상의 성장인자를 처리하더라도 일정한 효과의 역치현상을 나타내는 것을 알 수 있었다.

결론적으로, 본 실험의 결과를 통해 생쥐의 2-세포기 배아의 발생에서 외부로부터 첨가된 EGF는 배아의 포배형성과 부화를 향상시킴을 알 수 있었다. 따라서 성장인자를 배양액에 처리하여 배아를 배양하면 발생률을 향상시킴으로써 배아의 분화와 발생을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 EGF가 생쥐 배아의 발생에 미치는 영향을 알아보고, EGF가 생쥐 난자 및 배아에서 발현되는 시기를 알아보고자 하였다.

EGF가 배아의 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 생쥐 2-세포기 배아를 Ham's F10 배양액에서 72시간동안 배양하였다. 또한, 생쥐 배아에서 EGF가 발현되는 시기를 알아보기 위하여 anti-EGF와 anti-Mouse IgG를 이용하여 면역세포화학방법을 시행하였다.

배양액내 EGF(10 ng/ml이상)는 배아의 발생률과 부화율을 향상시켰다. 면역세포화학방법의 결과, 배아 자체에서 생산되는 EGF는 후기 4-세포기 이후부터 발현되었다.

결론적으로 배양액에 첨가된 EGF는 후기 4-세포기 이후 배아에 존재하는 수용체와 반응하여 착상전 초기배아의 포배형성과 부화를 향상시킨다고 사료된다.

인 용 문 헌

- Berchuck A, Soisson AP, Olt GJ, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC, McCarty KS: Epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 161, 1247-1251.
- Biggers JD, Gardner DK, Leese HJ: Control of carbohydrate metabolism in preimplantation mammalian embryos. In: Rosenblum I Y Heyner S eds. *Growth factors in mammalian development*. New York, CRC Press, 1989, pp. 19-32.
- Brigstock DR, Heap RB, Brown KD: Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 747-758.
- Brinster RL: A method for in vitro in vitro cultivation of mouse ova from two cell embryo to blastocyst. *Exp Cell Res* 1963, 32, 305-308.
- Brinster RL: Studies on the development of mouse embryos *in vitro*. II. The effect of energy source. *J Exp Zool* 1965 158, 59-68.
- Brisson DR, Hewitson LC, Leese HJ: Glucose, pyruvate, and lactate concentrations in the blastocoel cavity of rat and mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 1993, 35, 227-232.
- Carson RS, Zhang Z, Hutchinson LA, Herington AC, Findlay JK: Growth factors in ovarian function. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 735-746.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I: An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1989, 86, 679-688.
- Chegini N, Rao Ch. V, Wakim N, Sanfilippo J: Binding of ¹²⁵I-epidermal growth factor in human uterus. *Cell Tissue Res* 1986, 246, 543-548.
- Clegg K, Piko L: RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. *Nature* 1982, 295, 342-345.
- ClineEM, Rabdali PA, Oliphant G: 1977. Hormone-mediated oviductal influence on mouse embryo development. *Fertil Steril* 1977, 28, 766-771.
- Colver RM, Howe A, McDonough PG, Boldt J: Influence of growth factors in defined culture medium on *in vitro* development of mouse embryos. *Fertil Steril* 1991, 55, 194-199.
- Dardik A, Schultz RM: Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: Stimulatory effect of TGF- α and EGF. *Development* 1991, 113, 919-930.
- Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS: Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 1991, 55, 1000-1004.
- Dekel N, Sherizly I: Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 1985, 116, 406-409.
- Downs SM, Daniel SAJ, Eppig JJ: Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J Exp Zool* 1988, 245, 86-96.
- Downs SM: Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. *Biol Reprod* 1989, 41, 371-379.

- Fishel SB, Edwards RG: Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Science* 1984, 223, 816-818.
- Haimovici F, Anderson DJ: Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast outgrowth *in vitro*. *Biol Reprod* 1993, 49, 124-130.
- Harper KM, Brackett BG: Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod* 1993, 48, 409-416.
- Hill D: Growth factors and their cellular actions. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 723-734.
- Kane MT, Carney EW, Ellington JE: The role of nutrients, peptide growth factors and coculture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology* 1992, 38, 297-313.
- Lei ZM, Rao Ch. V: Expression of epidermal growth factor(EGF) receptor and its ligands, EGF and transforming growth factor- α , in human fallopian tubes. *Endocrinology* 1992, 131, 947-957.
- Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, Matsuo H, Manalu AS, Ito H, Mochizuki M: Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 1993, 132, 924-931.
- Mattson BA, Chambers SA, de Pablo F: Comparative aspects of the insulin and the insulin receptor. *In: Rosenblum I Y, Heyner S eds Growth factors in mammalian development*. New York, CRC Press, 1989, pp. 47-70.
- McKiernan SH, Bavister BD, Tasca RJ: Energy substrate requirements for *in vitro* development of hamster 1- and 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1991, 6, 64-75.
- Morishige K-I, Kurachi H, Amemiya K, Adachi H, Adachi K, Sakoyama Y, Miyake A, Tanizawa O: Menstrual stage-specific expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- α in human oviduct epithelium and their role in early embryogenesis. *Endocrinology* 1993, 133, 199-207.
- Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA: Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88, 21-25.
- Nielson LL, Benos D, Biggers JD: Characterization of amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange in rabbit blastocysts. *Biol Reprod* 1986, 34(suppl. 1), 132 Abstr.
- Paria BC, Dey SK: Preimplantation embryo development *in vitro* : Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 4756-4760.
- Park YS, Lin YC: Effect of epidermal growth factor (EGF) and defined simple media on *in vitro* bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology* 1993, 39, 475-484.
- Poueymirou WT, Conover JC, Schultz RM: Regulation of mouse preimplantation development: Differential effects of CZB medium and Whitten's medium on rates and patterns of protein synthesis in 2-cell embryos. *Biol Reprod* 1989, 41, 317-322.
- Rappolee DA, Brenner CA, Schultz DM, Werb Z: Developmental expression of PDGF, TGF- α , and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 1988, 241, 1823-1825.
- Roblero L, Izaquierdo L: Effect of progesterone on the cleavage rate of mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1976, 475-476.
- Rosenblum IY, Farber M, Ramos K, Pritchard ML: Hormonal signaling mechanism: The role of protein phosphorylation in early development. *In: Rosenblum I Y, Heyner S eds. Growth factors in mammalian development*. New York, CRC Press, 1989, pp. 33-46.
- Schultz GA, Hahnel A, Arcellana-panlilio M, Wang L, Goubau S, Watson A, Harvey M: Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. *Mol Reprod Dev* 1993, 35, 414-420.
- Shutt DA, Lopata A: The secretion of hormones during the culture of human preimplantation embryos with corona cells. *Fertil Steril* 1981, 35, 413-416.

- Takahashi Y, First NL: *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamins. *Theriogenology* 1992, 37, 963-978.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990, 26, 90-100.
- Wales RG: Growth factors in early embryonic development: Summary and perspective. *Reprod Fertil Dev* 1992, 4, 355-359.
- Werb Z: Expression of EGF and TGF- α genes in early mammalian development. *Mol Reprod Dev* 1990, 27, 10-15.
- Wiley LM, Obasaju MF: Genetics of early mouse development. In: Rosenblum I Y, Heyner S eds. *Growth factors in mammalian development*. New York, CRC Press, 1989, pp. 1-18.
- Wily LM, Wu JX, Harari I, Adamson ED: Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine development. *Development* 1992, 119, 247-260.
- Winters TA, Febres FG, Fulgham DL, Bertics PJ, Duello TM, Gorski J: Ontogeny of the epidermal growth factor receptor during development of the fetal bovine mesonephros and associated organs of the urogenital tract. *Biol Reprod* 1993, 48, 1395-1403.
- Wood SA, Kaye PL: Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1989, 85, 575-582.
- Yang BK, Yang X, Foote RH: Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 1993, 40, 521-530.
-