

돼지 난구세포의 분산조절에 관한 연구 : cAMP와 Calcium의 작용

권혁방 · 이원교 · 김남중* · 김문규** · 나철호

(전남대학교 생물학과; *한림의대 해부학교실; **한양대학교 생물학과)

Regulation of Cumulus Expansion of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes
in vitro: Involvement of cAMP and Calcium

Hyuk Bang Kwon, Won Kyo Lee, Nam Jung Kim,*

Moon Kyoo Kim** and Chul Ho Ra

(Dept. of Biology, Chonnam National University; *Dept. of Anatomy,

Han-Rim Medical School; **Dept. of Biology, Hanyang University)

(1986. 10. 15 접수)

ABSTRACT

The present experiments were carried out to investigate the mode of cAMP regulation of cumulus expansion in pig. Intracellular level of cAMP in the cumulus cells was modulated by culturing porcine cumulus oocyte complexes (COC's) with forskolin, an adenylate cyclase stimulator and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), a phosphodiesterase inhibitor. The role of calcium in the hormone induced cumulus expansion process was also studied. Forskolin in the medium stimulated cumulus expansion from the concentration of 0.01 μ M and induced full expansion at 1~10 μ M. In contrast, IBMX in the medium (20~180 μ M) failed to induce the expansion. Verapamil, a calcium ion transport blocker, suppressed follicle stimulating hormone(FSH)-induced cumulus expansion in a dose dependent fashion (0.002~0.2 mM) when the COC's were exposed to the drugs during culture period(32 hr). But verapamil did not interfere with the triggering action of FSH during early four hours of culture period.

The data presented here showed that adenylate cyclase in the porcine cumulus cells may play a key role in the regulation of the intracellular cAMP level and calcium ion may be involved in the later period of cumulus expansion process.

서 론

포유동물의 여포난자는 난구세포층(cumulus cell layer)으로 둘러싸여 있으며 인접한 난구세포들로부터 영양물질을 공급받아 세포질의 성장이 이루어진다. 이때 난자의 핵상은 제 1 감수분열 전기에 머물러 있으며 배란이 될때까지 감수분열의 재개가 억제되어있다(Biggers *et al.*, 1967; Heller *et al.*, 1981). *In vivo*에서 성숙된 여포(Graafian follicle)들이 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)의 자극을 받으면 배란이 시작됨과 동시에 난자는 감수분열을 재개하게 되고 난구세포층은 세포간격에 다량의 뮤코당(주로 hyaluronic acid)을 분비 하면서 소위 분산현상(cumulus expansion)을 일으킨다(Dekel *et al.*, 1979; Schuetz and Schwartz, 1979; Eppig, 1981; reviewed by Eppig, 1985). *In vitro*에서 여포로부터 분리해낸 난자-난구 복합체를 배양하면 호르몬의 도움이 없이도 난자의 감수분열이 자발적으로 재개되어 제 2 감수분열 중기까지 진행이 되나(spontaneous maturation), 난구세포의 분산은 자발적으로 일어나지 않는다. 그러나, *in vitro*에서 생식소 자극 호르몬(follicle stimulating hormone, FSH or LH) 및 그 유사체를 처리하면 인위적으로 난구세포의 분산을 유도할 수 있다(Dekel and Kraicer, 1978; Eppig, 1979; Kwon, 1983). DbcAMP나 세포내 cAMP를 높여주는 시약들이 역시 *in vitro*에서 분산을 유도하는 것으로 보아 cAMP가 이들 호르몬의 제 2 전달자로 작용한다고 생각되고 있다(Dekel and Kraicer, 1978; Eppig, 1985). 근래에 난자의 성숙조절 과정에 난구세포의 cAMP가 중요한 역할을 할 것이라는 많은 보고가 있는 이때 난구세포의 중요성이 점차 크게 대두되고 있다(Dekel and Beers, 1978; Schultz *et al.*, 1983; Eppig and Downs, 1984).

본 연구에서는 난구세포의 분산을 유도하는 cAMP의 조절기능을 조사하기 위하여 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin과 phosphodiesterase의 저해제인 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX)을 사용하여 세포내 cAMP의 농도를 간접적으로 조절하고 이들이 난구세포의 분산에 미치는 영향을 조사하였다. 아울러 calcium ion의 막이동 저해제인 verapamil을 사용하여 분산유도 과정에 calcium ion의 관여 여부를 조사하여 보았다.

재료 및 방법

실험의 재료로 돼지의 난자-난구 복합체를 사용하였다. 광주근교의 도살장(삼호축산)에서 돼지의 난소를 공급받아 생리 식염수에 담아서 실험실로 운반한 후 한시간 내에 실험에 사용하였다. 돼지의 난소에서 중간크기 이상(직경 3 mm)의 여포로부터 19 gauge의 바늘이 붙은 일회용 주사기를 사용하여 여포액과 복합체를 흡입해낸 후 Hepes(sigma)가 첨가된 standard egg culture medium(SECM, Biggers *et al.*, 1971)으로 옮긴 다음 난구세포가 일정층 이상 붙은 정상적인 복합체를 골라 내었다. 기본배양액으로는 TC 199(Hanks balanced salt solution base, Difco)과 10% fetal bovine serum(Gibco)을 섞은 용액에 Hepes(12 mM), pyruvate(0.03 mM, Sigma), glutamine(1 mM), lactate(2.5 mM) 등을 첨가하여 사용하였다. 난구세포의 분산을 유도하기 위해 사용한 FSH(follicle stimulating hormone, from porcine pituitary, Sigma)와 IBMX(Sigma)는 TC 199에 녹여 stock으로 만든 후 (10 IU/ml;

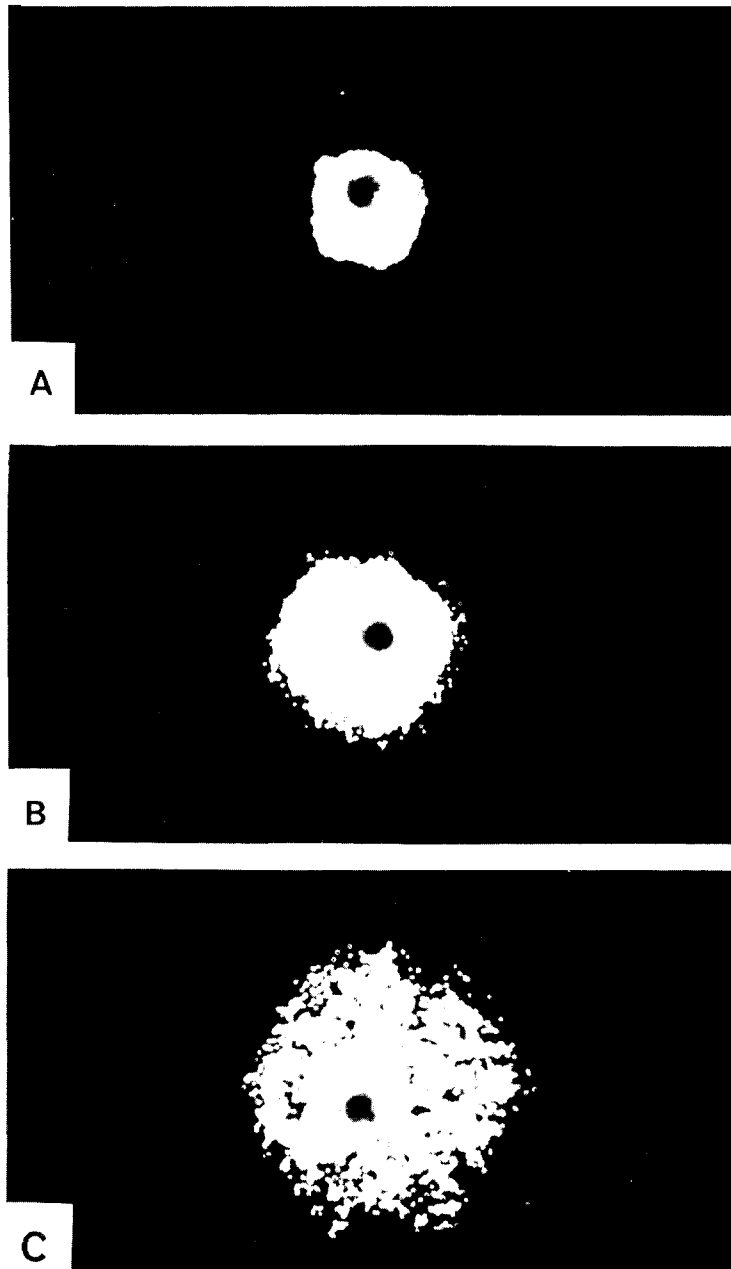


Fig. 1. (A) A pig cumulus-oocyte complex after 32 hours of incubation in medium containing IBMX ($180 \mu\text{M}$). The cumulus is not expanded. (B) A complex exposed to FSH (0.01 IU) for 30 min followed by 32 hours of incubation in plain medium. The cumulus is partially expanded. (C) A complex after 32 hours of incubation in medium containing forskolin ($1 \mu\text{M}$). The cumulus is fully expanded.

1.8 mM) 사용하였으며 forskolin(Sigma)과 Ca^{2+} 이동의 저해제인 verapamil은 순수한 ethanol 용액에 녹여 stock(10 mM; 20 mM)로 만든 후 해당량을 직접 배양액에 첨가하여 농도를 조절하였다. 난자-난구 복합체들을 multiwell microtest plate(Nunclon)를 사용하여 배양하였다. 각 well에 약 0.2 ml의 배양액을 붓고 복합체들을 넣은 다음 plate를 5% CO_2 와 습기찬 공기를 공급받는 정온기(Forma Scientific)내에 옮긴 후 32~48시간 동안 배양을 하였다. 배양이 끝난 후 복합체를 간직한 plate를 직접 도립현미경(Nikon) 위에 놓고 난구세포의 상태(분산정도, monolayer 형성 등)를 조사하였다. 난구세포의 생존상태를 조사하기 위하여 0.4% trypan blue를 포함한 saline으로 복합체들을 옮긴 다음 염색이 되는 정도를 조사 하였다. 실험결과의 유의성 검정은 정규분포를 이루는 두 모비율의 비교방법을 사용하였다(Snedecor and cochrane, 1967).

결 과

Forskolin과 IBMX의 분산유도 효과

난구세포내 cAMP의 농도변화와 세포들의 분산현상과의 관계를 조사하기 위하여 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin과 phosphodiesterase의 저해제인 IBMX를 사용하여 세포내 cAMP의 농도를 간접적으로 조절하여 보았다. Forskolin의 농도를 달리하여(0.001~100 μ M) 처리한 배양액에 난자-난구 복합체를 넣고 32시간 동안 계속 배양한 후 그 분산율을 조사한 결과 Fig. 2와 같았다. 배양액내의 forskolin은 0.01 μ M의 농도에서 부터 복합체의 분산을 유도하기 시작하여 1 μ M과 10 μ M에서 최대의 분산효과를 나타내고(94% and 87%) 100 μ M에서는 그 효과가 감소하였다(63%). 특히 완전분산된 복합체의 수는(Fig. 1C) 1 μ M의 실험군 보다 100 μ M에서 현저히 줄어 들었다(75%에서 28%로). 한편 cAMP의 분해를 억제함으로써 해서 세포내 cAMP를 안정화 시키는 IBMX를 배양액에 첨가하고(20~180 μ M) 난자-난구 복합체를 32시간 배양한 결과 IBMX는 180 μ M의 농도에 이르기 까지 거의 난구세포의 분산을 유도하지 못했다(Table 1, Fig. 1A). 이 결과는 난구세포내에서 cAMP의 분

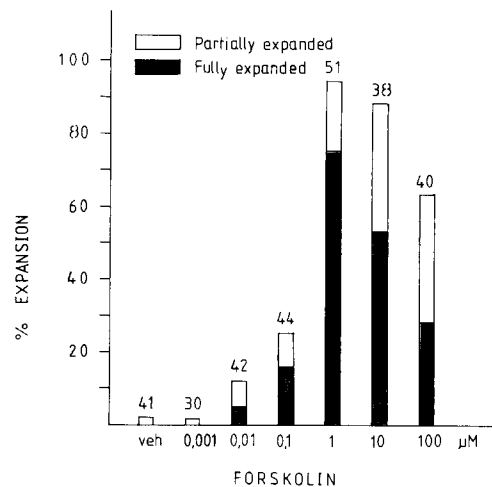


Fig. 2. Effect of forskolin on the cumulus expansion of pig cumulus-oocyte complexes (COC's) *in vitro*. Pig COC's were cultured for 32 hours in the medium containing different concentrations of forskolin (0.001~100 μ M) and their cumulus expansion were checked under an inverted microscope. No. of COC's examined was indicated at the top of each bar. The data were obtained by pooling of at least four repeated experiments.

Table 1. Effect of IBMX on the cumulus expansion of pig COC's *in vitro*.

IBMX (μM)	No. Expanded/total	% Expansion
0	0/21	0
20	0/22	0
60	0/21	0
180	1/21	4

Pig COC's were cultured for 32hr in the continuous presence of IBMX (0~180 μM). Cumulus expansion were examined under an inverted microscope after culture. The data were obtained by pooling three repeated experiments.

Table 2. Potentiating effect of IBMX on forskolin-stimulated cumulus expansion of pig COC's *in vitro*.

Treatment	Expansion(No.)			%* Expansion	tot. No. Examined
	fully expanded	partially expanded	not expanded		
Forskolin, 0.1 μM	4	4	27	23	35
Forskolin, 0.1 μM plus IBMX, 180 μM	21	17	15	72**	53
Forskolin, 1 μM	41	6	8	86	55

*% expansion; % of the COC's showing full or partial expansion/total. Pig COC's were cultured for 32 hour in the continuous presence of forskolin with or without IBMX and their cumulus expansion were examined. The data were obtained by pooling four repeated experiments

** $p < 0.01$, when compared to forskolin, 0.1 μM group.

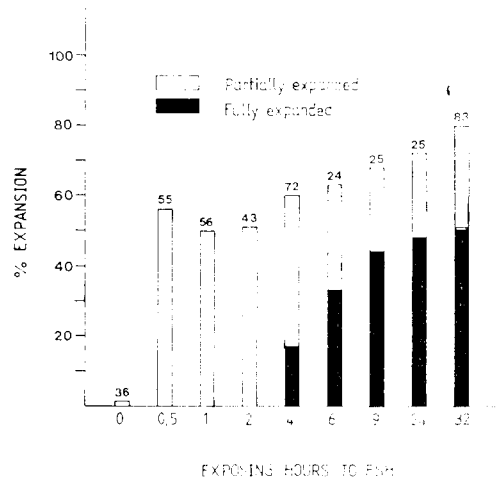
해를 막는것 만으로는 분산을 유도할 정도로 cAMP의 농도를 높일수 없다는 것을 의미하는 것 같았다. 그러나 낮은 농도의 forskolin(0.1 μM)과 IBMX(180 μM)을 동시에 첨가했을때 forskolin 단독으로 유도한 분산율(23%)보다 매우 효과적으로 분산을 유도하는(72%, $p < 0.01$) 상승효과를 나타내는 것으로 보아 phosphodiesterase가 *in vivo*에서 cAMP의 농도를 조절하는데 보완적인 역할을 할 가능성이 있다고 보겠다(Table 2).

상기 결과들을 종합해 보면 난구세포내 cAMP의 농도가 일정수준이상 높아졌을때 분산을 유도하기 시작하며 폐지의 난구세포내 cAMP의 농도를 높이는 과정에서 adenylate cyclase가 주도적인 역할을 하고 phosphodiesterase는 보완적인 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

난구세포의 분산을 유도하는데 필요한 FSH의 자극기간

폐지 난구세포의 분산을 유도하는 것으로 알려진 FSH가 얼마동안의 자극기간이 필요한지를 알아보기 위하여 난자-난구 복합체를 일정시간(0~24시간) FSH(0.01 IU/ml)가 포함된 배양액에서 배양을 한 후 보통배양액으로 옮겨서 계속 32시간까지 배양해 보았다(Fig. 3). 난구세포들은 30분동안 FSH에 노출되었어도 32시간 후에는 56%의 복합체들이 부분적인 분산현상을 나타내었다(Fig. 1B). 이는 일부의 세포들이 이 기간 동안에 FSH의 자극으로 분산과정에 들어간 것을 의미한다. 그러나 완전한 분산을 일으킨 복합체들이 나타나기 시작한 것은 4시간 노출된 실험군에서 부터 이며(17%) 9시간 노출된 실험군과 계속 노출된 실험군 사이에는 완전분산을 일으킨 수가 차이가 없었다(각 44%와 51%).

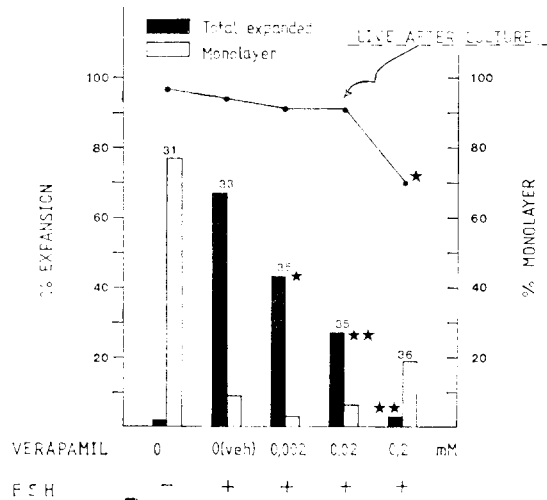
Fig. 3. Time of exposure to FSH required to stimulate cumulus expansion of pig COC's *in vitro*. Pig COC's were precultured in FSH (0.01 IU/ml)-containing medium for different period and then transferred to plain medium and cultured further for up to 32hr. No. of COC's examined was indicated at the top of each bar. The results from four experiments were pooled.



난구세포의 분산과 Ca²⁺의 역할

난구세포의 분산조절과정에 Ca²⁺이 관여하는 지의 여부를 조사하기 위하여 Ca²⁺막 이동의 저해제인 verapamil을 사용하였다. 분산을 유도하기 위하여 FSH(0.01 IU/ml)를 첨가하고 verapamil(0.002~0.2 mM)을 처리한 배양액에서 난자-난구 복합체들을 42시간 배양을 한 후 그들의 상태를 관찰한 결과 Fig. 4와 같았다. Verapamil을 0.002 mM 포함한 배양액에서부터 복합체들은 대조군의 그것보다(62%) 유의하게 분산이 억제되기 시작하였으며 (43%, p<0.05), 0.2 mM을 포함한 실험군에서는 분산이 거의 일어나지 않았다(p<0.01). FSH로 자극을 받지 않은 복합체들은 대부분 바깥층의 난구세포들이 monolayer를 형성하는데 (77%), verapamil은 분산과 함께 이 monolayer의 형성도 억제하는 것으로 나타났다. 난구세포의 생존상태를 조사해 보면 verapamil, 0.02 mM을 포함한 배양액에서 난구세포들은 대조군(vehicle group)의 그것과(94%) 차이없이 대부분 trypan blue에 염색이 되지 않았다

Fig. 4. Effect of verapamil on the FSH-induced cumulus expansion, monolayer formation and viability of the pig COC's *in vitro*. Pig COC's were cultured for 42 hours in the continuous presence of FSH (0.01 IU/ml) and different doses of verapamil except plain medium group. Cumulus expansion and monolayer formation were observed after culture. Viability of the COC's were checked by trypan blue exclusion test. The results were obtained by pooling of four repeated experiments. No. of COC's tested was indicated at the top each bar.



*p<0.05, when compared to control (vehicle group)

**p<0.01, when compared to control

Table 3. Reversibility of verapamil effect on the cumulus expansion of pig COC's *in vitro*.

Culture conditions			% Expansion	No. Examined
3hr	4hr	25hr		
Plain medium	FSH, 0.01 IU/ml	Plain medium	66	35
Verapamil, 0.2 mM	FSH, 0.01 IU/ml	Plain medium	56	36
	Verapamil, 0.2 mM			
3hr	29hr			
Plain medium	FSH, 0.01 IU/ml		78	50
Verapamil, 0.02 mM	FSH, 0.01 IU/ml		81	53
Verapamil, 0.2 mM	FSH, 0.01 IU/ml		80	49

Pig COC's were cultured for 3 hr in the presence or absence of verapamil and transferred to different culture medium as indicated above. The COC's were washed three times at each step in plain medium and cultured for up to 32hr. The data were obtained by pooling four repeated experiments.

(91%). 그러나 0.2 mM의 verapamil을 포함한 배양액에서 배양된 복합체들은 일부가(약 30%) 난구세포층의 바깥부분이 염색이 되는 것이 관찰되었다(Fig. 4). 따라서 높은 농도의 verapamil에 계속 노출된 난구세포들은 이 시약에 의해 생존력에 저해를 받은 것으로 나타났다. Verapamil의 억제효과가 가역성을 띠고 있는지의 여부와 FSH의 초기 자극과정(4시간)을 억제할지를 조사하기 위하여 일정시간 verapamil에 노출시킨 복합체들을 여러조건 배양액으로 옮겨 배양하여 보았다(Table 3). Verapamil, 0.2 mM에 3시간 노출되었던 복합체들을 FSH(0.01 IU/ml)를 포함한 배양액으로 옮겨 계속 배양을 했을 때 대부분의 복합체들은 정상적으로 난구세포의 분산을 일으키어(81%) 대조군의 그것과(78%) 차이가 없었다. 복합체들을 verapamil, 0.2 mM에 3시간 노출시키고 FSH와 verapamil이 들어있는 배양액으로 옮겨 4시간 분산을 유도한 후 다시 보통배양액으로 옮겨 계속 배양을 했을 때 난구세포들의 분산율은 대조군과 별 차이가 없었다(Table 3). 이 결과들은 verapamil(0.2 mM)이 3시간 혹은 7시간 동안에 난구세포들에 비가역적인 손상을 입히지 않은 것으로 해석되었다.

고 찰

여포난자를 둘러싸고 있는 난구세포들은 여포가 성장하는 동안 난자에 영양물질을 공급하는 영양세포로 작용하나 그라프씨 여포(Graafian follicle)로 성장한 뒤 LH의 자극으로 배란이 일어날 때 이 난구세포들은 분산을 일으키고 동시에 스테로이드 호르몬을 분비하는 세포로 분화가 된다(Channing *et al.*, 1981; Schuetz and Dubin, 1981). 이러한 난구세포의 분산과 분화는 생식소 자극호르몬(FSH 혹은 LH)의 자극에 의해 *in vitro*에서도 유도될 수 있으며 이 과정에서 cAMP가 양성조절자로 작용한다는 많은 보고가 있어왔다(Schuetz *et al.*, 1985; reviewed by Eppig, 1985). 본 연구에서는 이러한 난구세포의 분산유도 과정에 참여하는 cAMP의 조절과정을 조사하고 이때 Ca^{2+} 의 참여 여부도 아울러 조사하여 보았다.

본 실험의 결과로부터 *adenylate cyclase*의 촉진제인 forskolin은 *in vitro*에서 돼지 난자-난구 복합체의 분산을 일정한 dose-response 곡선을 보이며 촉진하는 것을 볼 수 있었으며 (Fig. 2), 이에 대해 phosphodiesterase의 저해제인 IBMX는 180 μM 까지 거의 분산을 유도하지 못한다는 것을 알았다(Table 1). 이로 보아 난구세포내의 cAMP는 *adenylate cyclase*에 의하여 주도적으로 농도가 조절되는 것 같으며 phosphodiesterase의 억제만으로는 충분치 않다는 것을 알았다. 배양액내의 forskolin이 돼지 난구세포의 분산을 유도할수 있다는 것은 Racowsky(1985)에 의해 보고된 바 있는데 본 실험에서도 거의 같은 결과가 나왔다. 그러나 IBMX의 돼지 난구세포의 분산효과에 관한 보고는 아직 없으며 흰쥐나 생쥐의 난구세포가 이 시약에 의해 훌륭히 분산이 유도 되는 것으로 보아(Dekel and Kraicer, 1978; Kwon *et al.*, 1986) 매우 대조적인 결과라고 할 수 있다. 특히 생쥐의 경우는 0.01 μM 에서 부터 분산을 유도하기 시작하므로(Kwon *et al.*, 1986) 돼지와 생쥐의 난구세포 사이에 cAMP조절기작에 큰 차이가 있을 것으로 추측된다. *In vivo*에서 난구세포의 분산을 유도하는 주된 호르몬이 FSH라는 보고를 토대로 하여(Eppig, 1979) *in vitro*에서 FSH가 돼지 난구세포의 완전분산을 유도하는데 필요한 시간을 조사해 본 결과 최소 4시간에서 9시간 까지 걸린다는 것을 알았다(Fig. 3). 이 기간 동안에 FSH는 난구세포의 *adenylate cyclase*를 촉진하여 세포내 cAMP의 농도를 높이어 분산과정을 trigger하는 것으로 생각되며 cAMP를 분해하는 phosphodiesterase는 비교적 참여도가 작은 것으로 해석되었다. 또한 배양액내의 verapamil이 농도에 의존하여 FSH에 의해 유도된 분산을 억제하는 것으로 보아(Fig. 4) 이 분산과정에 Ca^{2+} 이 관여할 것으로 추정되었다. Verapamil은 분산을 억제할 뿐 아니라 난구세포층의 monolayer 형성도 억제하였다. Maruska(1984) 등은 소의 복합체를 재료로 calmodulin의 저해제인 trifluoperazine이나 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 사용하여 Ca^{2+} 의 관련 여부를 조사해본 결과 난구세포의 분산과정에 Ca^{2+} 이 관여하지 않을 것이라고 보고한 바 있다. 또한 본 실험실에서 생쥐의 난구세포 분산에 미치는 verapamil의 영향을 조사해 본 결과 0.2 mM의 농도에서도 70% 이상의 난구세포들이 정상적으로 분산을 일으키었다(data not shown). 이것으로 보아 돼지의 난구세포는 Ca^{2+} 활동의 저해제에 다른 포유동물들 보다 더 민감하게 반응하는 것 같았다. Verapamil의 존재하에 FSH로 4시간 자극을 한후 보통 배양액으로 옮겼을 때 대조군과 같이 분산이 유도 되는 것으로 보아(Table 3), FSH가 세포내 cAMP의 농도를 높이는 초기단계에서는 calcium ion이 관여하지 않는 것으로 해석되었다. 따라서 calcium ion은 난구세포 분산의 후기과정, 즉 뮤코당의 합성이나 분비과정에 관여할 것으로 추정된다. 그러나 본 실험의 결과만으로는 verapamil의 독성 효과에 의한 분산저해 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로 Ca^{2+} 의 관여 여부는 앞으로 좀 더 조사를 해 보아야할 것으로 생각 된다.

요 약

돼지 난자-난구 복합체를 인공배양 하면서 *adenylate cyclase*의 촉진제인 forskolin과 phosphodiesterase의 저해제인 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX)을 사용하여 분산을 유도하는 cAMP 농도가 어떻게 조절되는지를 조사하고 아울러 호르몬에 의해 유도된 분산과정에 Ca^{2+} 의 관련 여부를 조사하였다. Forskolin은 0.01 μM 의 농도에서부터 난구세포의 분산

을 유도하기 시작하여 1~10 μM 에서 호르몬(FSH)에 의한 것과 같은 높은 분산율(85% 이상)을 나타내었다. 반면에 IBMX(20~180 μM)는 거의 난구세포의 분산을 유도하지 않았다. Calcium 막이동의 저해제인 verapamil(0.002~0.2 mM)은 *in vitro*에서 FSH에 의해 유도되는 난구세포의 분산을 농도에 의존한 억제현상을 나타내었다. 그러나 FSH가 난구세포의 분산을 자극하는 초기 4시간 동안에는 거의 영향을 미치지 않았다. 본 실험의 결과들은 난구세포내 cAMP는 adenylate cyclase의 주도로 조절되며 Ca^{2+} 은 난구세포의 후기 분산과정에 관여 한다는 것을 시사하는 것으로 해석되었다.

REFERENCES

- Biggers, J.D., W.K. Whitten, and D.G. Whittingham, 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In: Methods in Mammalian Embryology (Daniel, J.C. Jr. ed.) pp.86-116 Freeman & Co.
- Biggers, J.D., D.G. Whittingham, R.P. Donahue, 1967. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:560-567.
- Channing, C.P., I.H. Bae, S.L. Stone, L.D. Anderson, S. Edelson, and S.C. Fowler, 1981. Porcine granulosa and cumulus cell properties, LH/HCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Mol. Cell. Endocrinol.* 22:357-370.
- Dekel, N. and W.H. Beers, 1978. Rat oocyte maturation: Relief of cyclic AMP inhibition with gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4369-4373.
- Dekel, N., T. Hillensjo, and P.F. Kraicer, 1979. Maturation effect of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biol. Reprod.* 20:191-197.
- Dekel, N. and P.F. Kraicer, 1978. Induction *in vitro* of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotropins and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 102:1797-1802.
- Eppig, J.J., 1979. Gonadotrophin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: General conditions for expansion *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 208:111-120.
- Eppig, J.J., 1981. Prostaglandin E_2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol. Reprod.* 25:191-195.
- Eppig, J.J., 1985. Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. In: Developmental Biology, Vol. 1, Oogenesis (L.W. Browder, ed.) pp.313-347, Plenum.
- Eppig, J.J., and S.M. Downs, 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 30:1-11.
- Heller, D.T., D.M. Cahill, and R.M. Schultz, 1981. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Dev. Biol.* 84:455-464.
- Kwon, H.B., 1983. Effects of puromycin and actinomycin D on the HCG-induced expansion of cumulus oophorus *in vitro*. *Kor. J. Zool.* 26:225-233.
- Kwon, H.B., S.K. Ko, and W.B. Im, 1986. Studies on the cumulus expansion and oocyte maturation of mouse cumulus oocyte complexes: Regulation of intracellular cAMP level. *Kor. J. Zool.* 30:1-9.
- Maruska, D.V., M.L. Leibfried and N.L. First, 1984. Role of calcium and the calcium-calmodulin complexes in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.* 31:1-6.
- Racowsky, C., 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus

- expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J. Reprod. Fert.* **74**:9-21.
- Schuetz, A.W., and N. Dubin, 1981. Progesterone and prostaglandin secretion by ovulated rat cumulus cell-oocyte complexes. *Endocrinology* **108**:457-463.
- Schuetz, A.W., N.H. Dubin, H.B. Kwon and R.B. Ghodgaonkar, 1985. Cumulus-oocyte complex differentiation: Role of cAMP. The 67th Endocrine Society Meeting. Abs. No. 318.
- Schuetz, A.W., and W.J. Swartz, 1979. Intrafollicular cumulus cell transformations associated with oocyte maturation following gonadotrophic hormone stimulation of adult mice. *J. Exp. Zool.* **297**: 399-406.
- Schultz, R.M., R. Montgomery, and J. Belanoff, 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.* **97**:264-273.
- Snedecor, G.W., and W.G. Cochran, 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, pp. 220-221.