

과립막세포와의 Co-Culture가 소 난포란의 체외수정과 분할에 미치는 영향

신태영 · 조충호 · 황광남* · 황우석

서울대학교 獸醫科大學

*日本 群馬大學校 醫科大學 內分泌研究所

Effects of Co-Culture with Granulosa Cells on *In Vitro* Fertilization and Cleavage of Bovine Extrafollicular Oocytes

T. Y. Shin, C. H. Jo, K. N. Hwang* and W. S. Hwang

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

*Institute of Endocrinology, Gunma University

Summary

The present study was performed to investigate the effects of co-culture with granulosa cells on *in vitro* fertilization and cleavage of early bovine embryo development. Bovine oocytes were matured for 20-24 hrs *in vitro* with granulosa cells or without and then fertilized *in vitro* using frozen-thawed spermatozoa treated with BO-caffeine, BO-BSA(20mM heparin added). At 18hrs after insemination, oocytes were fixed and examined or further cultured in TCM 199 for 48hrs.

The fertilization rates between the control(70.4%) and the groups of co-cultured with granulosa cell(2.5×10^6 cells/ml; 71.6%, 5.0×10^6 /ml; 71.9%, 1.0×10^7 /ml; 71.1%) did not differ significantly. The cleavage rates in the groups co-cultured with granulosa cell(2.5×10^6 cells/ml; 43.6%, 5.0×10^6 /ml; 46.8%, 1.0×10^7 /ml; 45.0%) were significantly higher than that of without granulosa cell, respectively($P < 0.05$). However there were no significant differences between the groups co-cultured with granulosa cells.

The result indicated that co-culture with granulosa cell was effective means to cleavage of bovine follicular oocytes but did not affect the *in vitro* fertilization.

서 론

소 난포란에 대한 체외배양이 1965년 Edwards에 의해 처음으로 보고된 이후 소난자의 체외성숙 및 체외수정에 관한 연구가 여러 학자에 의해 수행되어 왔다. 소 난포란의 체외에서의 성공적인 受精의 보고 (Parrish 등, 1986; Fukui 등, 1983, 1984; Bondioli와 Wright, 1983; Iritani와 Niwa, 1977)와 함께 체외수정에 의한 산자의 생산(Hanada 등, 1986; Sirard 등, 1985; Brackett 등, 1982, 1984)에 대한 성공예가 외국에서 수행 보고되었다.

체외수정의 성공률은 사용되는 난자 및 정자의 질과 난자의 채취, 배양법, 배양온도, 배양액, 배양시

간 등의 요인들에 의해 영향을 받게 된다고 하였으며 (Rodgers, 1981), 체외수정 후 발육능력은 수정전 세포질내 성숙정도에 비례한다고 보고하였다(Leibfried와 Bavister, 1983; Thibault, 1977). 또한 소 난포란의 핵과 세포질의 완전한 성숙을 이루기 위하여 배지에 FSH, LH, estradiol 등과 같은 호르몬 (Moor와 Trounson, 1987), 혈청 (Leibfried-Rutledge 등, 1986), 난관상피(Gandolfi와 Moor, 1987) 및 과립막세포(Fukui와 Ono, 1989) 등을 첨가하였다.

Tsafirri와 Channing(1975)은 돼지에서 과립막세포와의 co-culture가 체외성숙을 억제한다고 보고하였고 과립막세포의 추출물에 의한 억제효과도 보고되었다 (Tsafirri 등, 1976). 그러나 과립막세포와의 co-

culture 시 마우스(Nekola와 Smith, 1974), 돼지(Rice와 McGaughey, 1980; Jagiello 등, 1977), 소(Leibfried와 First, 1980; Jagiello 등, 1977) 및 면양(Jagiello 등, 1977)에서 각각 억제효과가 없었다고 보고되었으며 과립막세포에서 분비되는 성숙억제인자는 난구세포와 난자사이의 상호작용에 영향을 끼쳐 난자내로 투과되지 않는다고 보고되었다(Sirard와 Bilodeau, 1990).

한편, Thibault 등(1987)은 소, 양, 돼지 및 토끼에서 과립막세포가 체외성숙에 좋은 영향을 미쳤다고 보고하였으며 체외수정률과 발육능의 증진도 토끼(Motlik와 Fulka, 1981), 돼지(Fulka와 Motlik, 1980) 및 면양(Staigmiller와 Moor, 1984)에서 각각 관찰하였다. 또한 소에서도 과립막세포와의 co-culture 가 체외수정률과 그 후의 발육성적에 도움을 준다고 하였다(Fukui와 Ono, 1988; Lu 등, 1987, 1988; Lutterbach 등, 1987; Xu 등, 1987; Crister 등, 1986).

이상에서 살펴 본 바와 같이 성숙배지에 첨가한 과립막세포가 소 난포란에 미치는 영향은 다양하게 보고되었으며 보고자들 간의 첨가농도 역시 일정치 않았다.

이에 저자는 소 난포로부터 채취한 과립막세포가 체외성숙시 co-culture 했을 때 난포외 소 난자의 체외수정률과 체외발육능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채취

도축된 홀스타인암소(연령:3~7세)로부터 양측난소를 채취하여 난소표면의 혈액과 여분의 결체조직을 제거한 후 100IU/ml의 penicillin(이하 PC로 약함)과 100 μ g/ml의 streptomycin(이하 SM으로 약함)이 첨가된 30~35 $^{\circ}$ C의 생리식염수가 든 보온병에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실에 도착한 후 37 $^{\circ}$ C의 생리식염수로 2~3회 세정한 후 멸균여과지로 혈액과 수분을 제거하고 18 gauge 침이 달린 10ml 주사기로 5% 소 태아혈청(fetal calf serum, 이하 FCS로 약함)이 첨가된 37 $^{\circ}$ C의 Dulbecco's phosphate buffered saline(Gibco, U.S.A., 이하 D-PBS로 약함)을 1 ml 정도 흡인한 후 직경

2~5mm의 소난포로부터 난자를 흡인하였다. 이를 시계접시 위에 올려놓고 실체현미경(15~30X)하에서 검경하여 난구세포가 팽윤되지 않고 세포질이 균질한 정상난자를 선별하여 배양에 이용하였다.

2. 과립막세포의 채취

난소에서 직경 10~12mm의 정상 성숙난포를 여분의 결체조직을 제거한 후 이를 찢어서 유출된 난포액과 함께 내막을 scraping하여 5% FCS가 첨가된 Tissue Culture Medium 199(Gibco, U.S.A., 이하 TCM 199로 약함)을 5ml 첨가한 후 700g에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 상층액을 버리고 2회의 세정과정을 반복한 후 농도별로 조정하여 성숙배지에 첨가하였다.

3. 난포란의 세정 및 배양액

소 난포란의 성숙배양액은 TCM 199에 10% FCS와 항생물질로 100IU/ml의 PC와 100 μ g/ml의 SM을 첨가하여 작성하였다. 작성한 배양액은 0.2 μ m millipore filter(Costar, U.S.A.)로 여과하여 25mM의 HEPES(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 세정용과 HEPES가 첨가되지 않은 성숙배지용으로 분류하였다. 성숙배지에 난포기의 성숙난포로부터 채취한 과립막세포를 각각 0, 2.5 $\times 10^6$ 개/ml, 5.0 $\times 10^6$ 개/ml, 1.0 $\times 10^7$ 개/ml의 비율로 첨가하였고 39 $^{\circ}$ C 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂배양기 내에서 2~3시간 동안 前배양을 실시한 후 사용하였다.

4. 난포란의 체외배양

선별된 정상난자를 25mM의 HEPES가 첨가된 세정용 배지로 3회 세정한 후 성숙배지가 들어있는 4 well dish(Nunc, U.S.A.)에 well당 8~10개의 난자를 과립막 세포와 함께 넣은 다음 그 위에 paraffin oil(mineral oil, Squibb, U.S.A.)을 중층하여 39 $^{\circ}$ C 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화상태인 CO₂배양기 내에서 24시간 동안 성숙 배양하였다.

5. 정자의 처리

공시정액은 0.5ml straw 당 5 $\times 10^7$ 개의 정자가 들어있는 홀스타인 유우의 동결정액을 사용하였으며 정액의 희석과 정자의 체외배양을 위한 배양액으로 Brackett과 Oliphant 배양액(이하 BO로 약함)을

기본배양액으로 하였으며 첨가반응과 수정능 획득을 유도하기 위하여 10mM의 caffeine(Fulka Chemika, Switzerland)이 첨가된 BO-caffeine액과 10mg/ml의 bovine serum albumin(Sigma, U.S.A., 이하 BSA로 약함) 및 20mM의 heparin(Gibco, U.S.A.)이 첨가된 BO-BSA액을 0.2 μ m의 millipore로 여과하여 사용하였다.

동결정액을 온탕용해법을 이용 38 $^{\circ}$ C 수조내에서 30초간 진탕용해한 후 plastic 시험관에 넣어 5ml의 BO-caffeine액을 서서히 가한 후 700g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 과정을 3회 반복하여 동결보호제를 완전히 제거한 후 BO-caffeine 액과 BO-BSA(20mM heparin첨가)액을 동량첨가하여 정자최종농도가 1 \times 10⁷개/ml가 되도록 재부유시켰다(최종농도: 5mM caffeine, 10mg/ml BSA, 10mM heparin). 이 정자부유액으로 100 μ l의 미소적을 작성한 후 paraffin oil을 중층시켜 CO₂배양기내에서 2시간동안 前배양을 실시하였다.

6. 체외수정

준비된 정자부유액에 각 미소적당 8~10개의 성숙난자를 첨가하여 18시간동안 CO₂배양기내에서 배양하여 체외수정을 실시하였다.

7. 체외수정률의 판정

체외수정실시 18시간 후에 난중의 1/2을 꺼내어 5% FCS가 첨가된 D-PBS액내에서 구경이 작은 피펫으로 조심스럽게 흡인배출함으로써 난구세포를 완전히 제거한 다음 고정액(ethyl alcohol : acetic acid=1:3)으로 24시간동안 고정한 후 1% acetorcein 으로 염색하여 위상차 현미경하에서 관찰하였다. 이 때 수정여부의 판정은 Ball 등(1983)의 방법에 따라 1) 전핵의 형성이 없이 정자의 침입이 일어난 것 2) 한 개 또는 두 개의 전핵이 형성된 것 3) 다정자 침입이 일어난 것으로 각각 구분하여 조사하였다.

8. 체외발육

체외수정 실시 후 18시간에 체외수정률을 조사한 1/2의 난을 제외한 나머지를 5% FCS가 첨가된 TCM 199(25mM HEPES)에 세번 세정한 후 10% FCS가 첨가된 성숙배양액에 옮겨 48시간동안 CO₂

배양기내에서 배양하였고 그 후 현미경하에서 분할률을 각각 검사하였다.

9. 통계처리

실험결과치는 분산분석으로 각 실험군간의 유의성을 검정한 후 LSD를 이용한 다중평균비교를 통하여 비교분석하였다.

결 과

소 난포란의 체외배양시 성숙배지에 첨가한 과립막세포와의 co-culture가 소 난포란의 체외수정률과 체외분할률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험한 결과는 다음과 같았다.

1. 체외성숙시 과립막세포와의 Co-culture가 소 난포란의 체외수정률에 미치는 영향

과립막세포의 첨가유무가 소 난포란의 체외수정률에 미치는 영향을 알아 본 결과 수정률은 각각 대조군에서 70.4%, 2.5 \times 10⁶개/ml의 과립막 세포첨가군에서 71.6%, 5.0 \times 10⁶개/ml의 과립막세포 첨가군에서 71.9% 및 1.0 \times 10⁷개/ml의 과립막세포 첨가군에서 71.1%였다. 대조군과 과립막세포첨가군 및 과립막세포첨가군들간의 농도차에 의한 유의차는 인정되지 않았다(Table 1).

2. 체외성숙시 과립막세포와의 Co-culture가 소 난포란의 체외분할률에 미치는 영향

체외수정 후 48시간 배양하여 과립막세포의 첨가유무가 소 난포란의 체외분할률에 미치는 영향을 알아 본 결과 분할률은 각각 대조군에서 34.7%, 2.5 \times 10⁶개/ml의 과립막세포 첨가군에서 43.6%, 5.0 \times 10⁶개/ml의 과립막세포 첨가군에서 46.8% 및 1.0 \times 10⁷개/ml의 과립막세포첨가군에서 45.0%였다. 과립막세포 첨가군들이 대조군에 비해 유의성 있게 높았으나(P<0.05), 과립막세포첨가군들 간의 농도차에 의한 유의차는 인정되지 않았다(Table 2).

고 찰

소 난자의 체외배양시 난자에 적합한 환경을 제공하여 성공적인 결과를 얻기 위해 배지에 FSH, LH,

Table 1. Effects of co-culture with granulosa cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes

Granulosa cell No. / ml	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized*			Total(%)
		S(%)	PN(%)	P(%)	
Control (-)	61	15(24.6)	22(36.1)	6	43(70.4)
2.5×10 ⁶	53	12(22.6)	21(39.6)	5	38(71.6)
5.0×10 ⁶	64	8(12.5)	31(48.4)	7	46(71.9)
1.0×10 ⁷	52	11(21.2)	19(36.5)	7	37(71.1)

*: Fertilization rates were examined 18hrs after insemination.

S: Sperm in the oocyte cytoplasm without pronucleus.

PN: Pronucleus with or without sperm tail remnant.

P: Polyspermy (more 2 or 3 sperm).

Table 2. Effects of co-culture with granulosa cells on cleavage of early bovine embryo development

Granulosa cell No. / ml	No. of oocytes examined	Developmental stage*				Total(%)
		UN**	2-cell	4-cell	8-cell	
Control (-)	49	32	8	9	-	17(34.4) ^a
2.5×10 ⁶	39	22	7	10	-	17(43.6) ^b
5.0×10 ⁶	47	25	9	12	1	22(46.8) ^b
1.0×10 ⁷	40	22	8	10	-	18(45.0) ^b

*: Cleavage was examined 48hrs after *in vitro* fertilization.

** : Unfertilized or degeneration.

^{a,b}: Different superscripts denote significant differences(P<0.05).

estradiol 등의 호르몬(Shalgi 등, 1979; Moor와 Trounson, 1977), 혈청(Choi 등, 1987; Sanbuissho와 Threlfall, 1985; Thibault 등, 1984; Sreenan, 1970) 및 과립막세포(Fukui와 Ono, 1989; Lutterbach 등, 1987; Thibault 등, 1987; Crister 등, 1986; Staigmiller와 Moor, 1984; Motlik와 Fulka, 1981) 등을 첨가하여 왔다.

그러나 과립막세포가 난포란의 체외성숙에 미치는 영향에 관한 연구를 보면 성숙억제효과가 있었다는 보고(Tsafriri와 Channing, 1975)와 없었다는 보고(마우스: Nekola와 Smith, 1974; 돼지와 면양: Jagiello 등, 1977; 소: Leibfried와 Frist, 1980)가 서로 상반되게 나타나고 있었다.

그러나 최근의 연구에서는 과립막세포와의 co-culture가 난자의 세포질 성숙에 관련되는 단백질을 합성하며 난구세포와 난자간에 상호작용하여 성숙과정의 체외발육능력을 증진시키는 효과가 있다는 사실이 돼지(Thibault 등, 1987; Fulka와 Motlik, 1980), 토끼(Thibault 등, 1987; Motlik와 Fulka, 198

1), 면양(Thibault 등, 1987; Staigmiller와 Moor, 1984) 및 소(Fukui와 Ono, 1989; Thibault 등, 1987) 등에서 보고되었다.

본 실험에서는 과립막세포와의 co-culture시 난포란의 체외발육능 및 체외수정능에 미치는 영향을 알아 본 결과 체외수정률은 과립막세포를 첨가하지 않은 대조군에서 70.4%로서 2.5×10⁶개/ml의 과립막세포 첨가시 71.6%, 5.0×10⁶개/ml의 첨가시 71.9%와 1.0×10⁷개/ml의 첨가시에는 71.1%로 유의성 있는 차이를 보이지 않고 있다. 이와 같은 결과는 과배란처리를 한 소에서 채취한 1.0×10⁶개/ml의 과립막세포를 첨가하여 배양하였을 때 첨가군에서 87%와 첨가하지 않은 군에서 75%로서 유의차가 없었다는 Crister 등(1986)의 보고와는 유사하였으나 체외수정률의 유효한 증진을 보고한 다른 성적(Chikamatsu 등, 1989; Fukui와 Ono, 1989; Staigmiller와 Moor, 1984)들과는 상이한 결과였다. 또한 본 실험의 성적은 3×10⁶개/ml의 과립막세포를 첨가하였을 때 70%의 수정률을 보고한 Xu 등(1987),

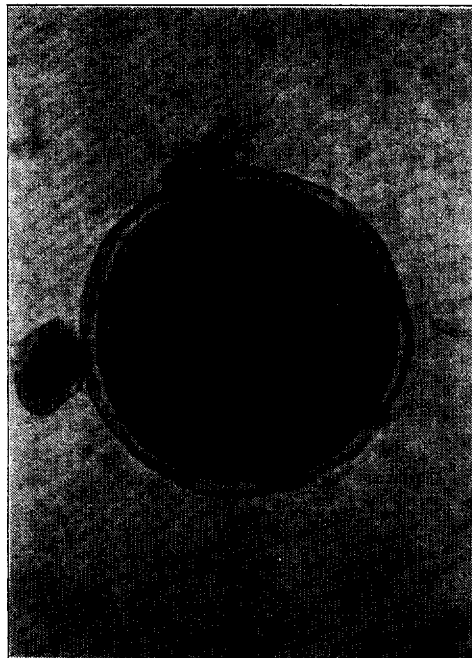
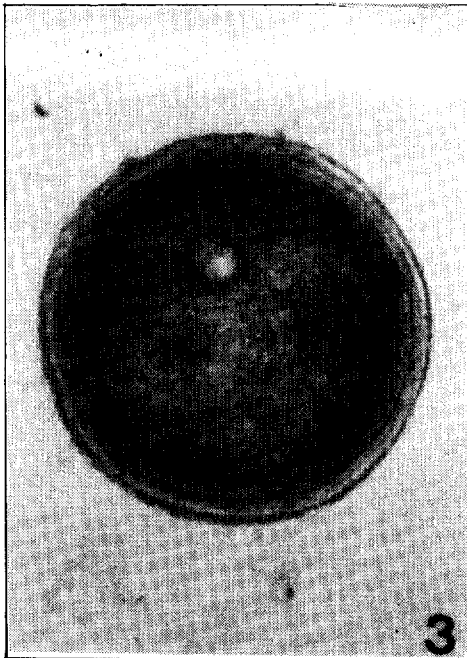
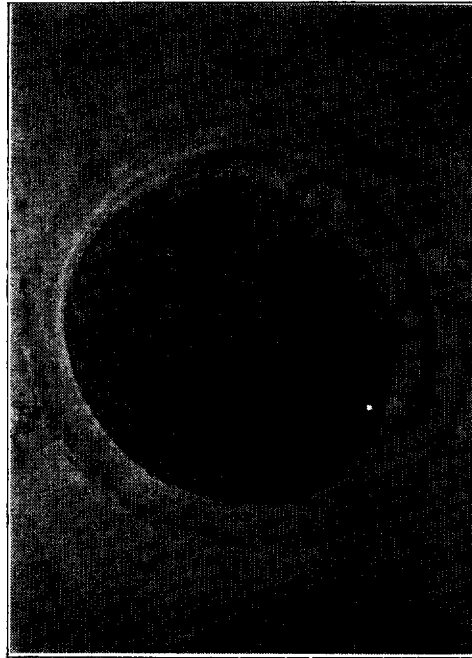
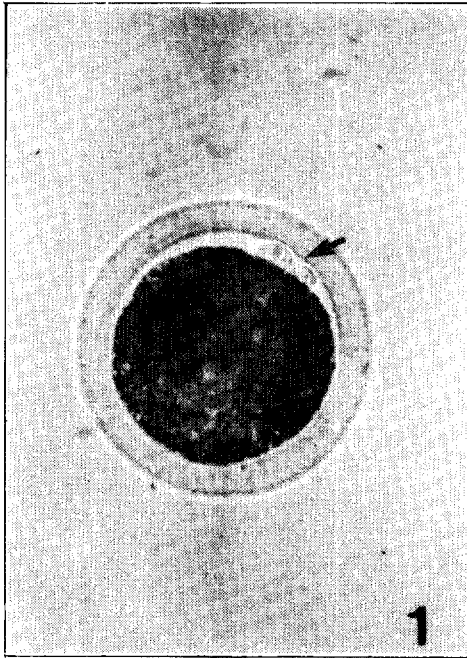


Fig. 1. Bovine oocyte with 2 polar bodies (arrow) immediately after the *in vitro* fertilization. $\times 250$
Fig. 2. Sperm cell (arrow) in perivitelline space of bovine oocyte following *in vitro* fertilization. $\times 400$
Fig. 3. Fertilized ovum showing a male pronucleus (arrow). $\times 250$
Fig. 4. Fertilized ovum showing a male pronucleus and female pronucleus (arrows). $\times 250$

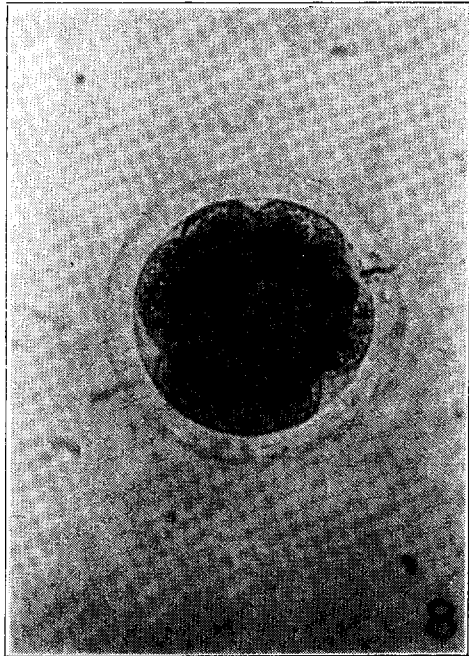
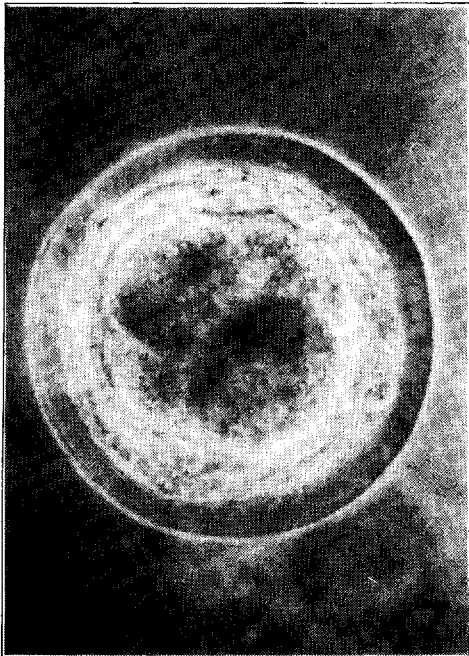
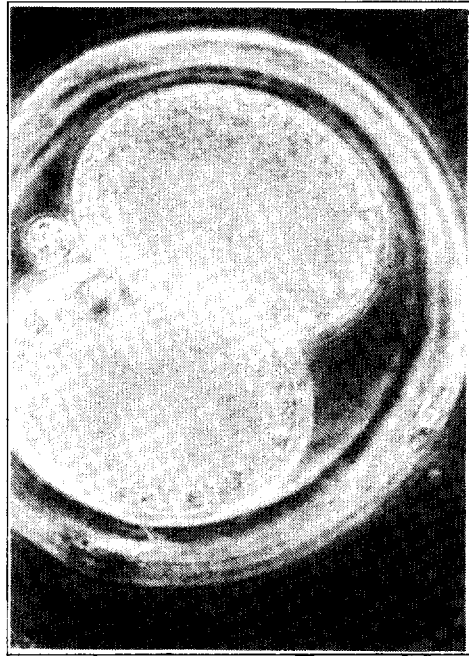
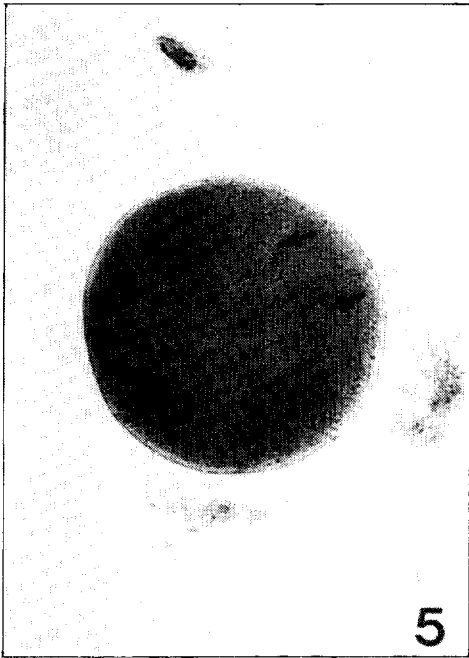


Fig. 5. Fertilized ovum showing polyspermic fertilization (arrows). $\times 250$

Fig. 6. A two-cell stage bovine embryo fertilized *in vitro* $\times 800$

Fig. 7. A four-cell stage bovine embryo fertilized *in vitro* $\times 400$

Fig. 8. An eight-cell stage bovine embryo fertilized *in vitro* $\times 250$

5.0×10⁶개/ml의 과립막세포 첨가시 71.4%의 수정률을 얻은 Fukui 등(1989)과 유사한 성적이었으며 5.7×10⁶개/ml의 과립막세포 첨가시의 수정률 53.1%인 Lu 등(1987)의 성적 보다는 좋은 결과였다. 한편 소에서 과립막세포의 첨가 농도차에 의한 체외수정률을 비교한 보문을 얻을 수가 없어 첨가농도를 달리하여 타 연구자들의 성적과 비교검토할 수는 없으나 본 실험에서 과립막세포를 농도별로 첨가한 결과 첨가농도에 따른 유의차는 나타나지 않아 과립막세포의 첨가농도가 소 난포란의 체외수정률에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

다정자침입에 있어서는 각 군에서 9.8-13.5%로 나타나 Chikamatsu 등(1989)의 8.6%, Fukui 등(1989)의 8.4~18.3%, Ball 등(1983)의 13%와 유사하게 나타났으나 첨가농도에 따라 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 과립막세포 첨가유무에 따라 조금씩 증가했다는 Chikamatsu 등(1989)의 보고와 일치하는 경향이였다.

체외발육률은 체외수정 후 48시간 동안 체외배양한 결과 대조군에서 34.4%, 2.5×10⁶개/ml의 과립막세포 첨가시 43.6%, 5.0×10⁶개/ml의 첨가시 46.8%, 1.0×10⁶개/ml의 첨가시 45.0%로 나타나 과립막세포 첨가군들에서 유의성 있게(P<0.05) 높았으나 첨가농도차에 의한 유의성은 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 38%의 체외발육률을 보고한 Crister 등(1986)의 성적보다는 높았으나 매정 후 72시간이 지나 2~8세포기까지의 분할률이 과립막세포 첨가시 73.8%, 첨가하지 않았을 때 58%로 보고한 Chikamatsu 등(1989)의 성적에 비해서는 낮은 결과였다. 또한 이런 결과는 Ustumi 등(1988)이 보고한 48시간 배양 후 22%의 체외발육률보다는 높았으나 발육된 22%중 6, 8세포기로의 발육이 25%에 달한다는 同인의 중기 발육성적보다는 낮았다. 이와 같은 결과로 미루어 소 난포란의 성숙배양시 과립막세포와의 co-culture 가 성숙과정중 난자의 발육완료에 영향을 미쳐 수정후의 분할률을 높이는데 기여하는 것으로 사료된다.

적 요

난포의 소 난자의 체외배양시 성숙배지에 첨가한 과립막세포와의 co-culture가 체외수정률과 체외분할

률에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 과립막세포의 첨가여부와 첨가농도가 소 난포란의 체외수정률에 미치는 영향을 알아본 결과 대조군에서는 70.4%의 수정률을 나타내었고 2.5×10⁶개/ml의 과립막세포 첨가시 71.6%, 5.0×10⁶개/ml 첨가시 71.9%와 1.0×10⁷개/ml 첨가시 71.1%의 수정률을 각각 나타내어 과립막세포 첨가유무와 과립막세포 첨가군들간에서의 농도차에 의한 유의차는 인정되지 않았다.

2. 과립막세포의 첨가유무와 첨가농도가 소 난포란의 분할률에 미치는 영향을 알아본 결과 대조군에서는 34.7%의 분할률을 나타내었고 2.5×10⁶개/ml의 과립막세포 첨가시 43.6%, 5.0×10⁶개/ml 첨가시 46.8%와 1.0×10⁷개/ml 첨가시 45.0%의 분할률을 각각 나타내었다. 과립막세포 첨가군들이 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의성(P<0.05)있게 높았으나 과립막세포 첨가군들에서의 유의차는 인정되지 않았다.

이상의 결과를 종합하면 소 난포란의 성숙배양시 과립막세포와의 co-culture가 체외수정률에는 크게 영향을 미치지 않으며 수정란의 분할률을 증진시키나 첨가농도차에 의한 영향은 없는 것으로 나타났다.

참고문헌

- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:717-725.
- Brackett BG. 1983. A review of bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 19:1-5.
- Chikamatsu N, Urakawa M, Fukui Y, Aoyagi Y and Ono H. 1989. *In vitro* fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different cultured system and inseminated with spermatozoa treated by different methods, *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35:154-158.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL and First NL. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 25(1):150(Abstr.).
- Epigg JJ and Schroeder AC. 1986. Culture systems for

- mammalian oocyte development: Progress and Prospects, *Theriogenology*, 25:97-106.
- Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F and Moor RM. 1988. Ram-specific effects on *in-vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 82:337-340.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 86:501-506.
- Iritani A, Kasai M, Niwa K and Song HB. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 70:487-492.
- Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH, Northey DL and First NL. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 36:376-383.
- Motlik J and Fulka J. 1981. Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. *J. Reprod. Fert.*, 63:425-429.
- Parrish JJ, Susco-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Sirard MA and Bilodeau S. 1990. Effects of granulosa cell co-culture on *in-vitro* meiotic resumption of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 89:459-465.
- Staigmiller RB and Moor RM. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.*, 9:221-229.
- Thibault C, Szollosi D and Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.*, 27(5): 865-896.
- Tsafirri A and Channing CP. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocytes meiosis *in vitro*. *Endocrinol.*, 96(4): 922-927.
- Xu KP, Greve T, Callesen H and Hyttel P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 81:501-504.
- 박태균, 이상진, 박세필, 고대환, 윤산현, 박흥대, 정태영, 정길생. 1989. 과립막세포가 우 난포란에 체외수정과 발달에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 13(3):171-178.
- 허준희, 황우석, 조충호. 1990. 배지에 첨가한 혈청, HEPES 및 과립막 세포가 난포의 소난자의 체외성숙에 미치는 영향. *한국임상수의학회지*, 7(1):49-57.