

신생아제대혈청이 난자성숙과 난구세포 분산에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 산부인과학교실

이여일 · 박현정 · 권영숙

Effect of Human Cord Serum on Oocyte Maturation and Cumulus Cell Expansion

Yu-Il Lee, Hyun-Jeong Park and Young-Suk Kwon

Department of Obstetrics and Gynecology, Chonnam National University Medical School, 8 Hak-dong, Dong-ku, Kwang-ju 501-190, Korea

= Abstract =

This study was performed to investigate the stimulating effect on oocyte maturation and cumulus cell expansion in TC199 media by human cord serum (HCS) supplementation. Immature mouse oocyte cumulus complexes (OCCs) were cultured in TC199 media supplemented with bovine serum albumin (BSA), HCS and human chorionic gonadotropin (hCG) instead of luteinizing hormone (LH) respectively, and the expression of cumulus expansion and oocyte maturation were observed. After 4hr and 24hr culture with or without OCCs, media containing 0.4% BSA, 10% HCS and 10 IU hCG respectively were collected and analyzed for changing concentrations of estradiol (E_2), progesterone (P_4), testosterone (T), and $PGF_{2\alpha}$. There were no elevation of E_2 , T, and $PGF_{2\alpha}$ by OCCs culture, but minute elevation of P_4 level by 24hr OCCs culture in hCG supplementation ($p=0.048$). The stimulating pattern of cumulus expansion of OCCs by HCS and hCG supplementation was similar to our previously report using Ham's F-10 media, however oocyte maturation rates after 24hr OCCs culture in all media were increased by 20~30% compared to Ham's F-10 media. These results suggest that LH in HCS induce cumulus expansion probably by P_4 secretion of OCCs, and TC199 is efficient media for immature mouse oocyte maturation.

Key Words: Oocyte maturation, Cumulus expansion, Human cord serum, Oocyte-cumulus complex.

서 론

최근까지 생식보조기술시 난자 및 수정란의 체외배양을 위해 다양한 배양액 및 배양액 첨가제들이 사용되어 왔다. 그리고 이들 배양액 및 배양액 첨가제로 사용되고 있는 혈청 (Fukui & Ono, 1989), 난포액 (Das *et al.*, 1992; Bar-Ami *et al.*, 1993), 혈청단백 (Ashwood *et al.*, 1989; Benadiva *et al.*, 1989; Khan *et al.*, 1991)들을 생식보조 기술에 사용하기 위하여 정도관리라는 복잡한 과정을 실시해야만 했다. 그렇지만 이들 배양액 첨가제들은 배양액이나 배양 용기에서 유래된 유해 중금속 이온을 착화시키고 투명대 경화를 방지하며 부화 및 착상 이후의 배발달에 도움이 된다고 하여 (Bavister, 1981) 지금까지 보편적으로

al., 1993), 혈청단백 (Ashwood *et al.*, 1989; Benadiva *et al.*, 1989; Khan *et al.*, 1991)들을 생식보조 기술에 사용하기 위하여 정도관리라는 복잡한 과정을 실시해야만 했다. 그렇지만 이들 배양액 첨가제들은 배양액이나 배양 용기에서 유래된 유해 중금속 이온을 착화시키고 투명대 경화를 방지하며 부화 및 착상 이후의 배발달에 도움이 된다고 하여 (Bavister, 1981) 지금까지 보편적으로

*본 연구는 1996년도 전남대학교병원 임상연구소 연구비 (CUHRI-M-96044) 지원에 의하여 이루어진 것임.

로 사용되고 있다. 특히 최근까지 일반적으로 많이 사용되고 있는 신생아제대혈청은 초기 배아에서 배반포까지의 발달에 있어서 RNA를 포함한 protein 합성을 증가시키고 (Tanikawa, 1994) 또한 배아착상에 불리한 투명대 경화를 예방하며 (George & Johnson, 1993) 배아 착상에 도움이 되는 융모성성선자극 호르몬을 배아로부터 분비하게 한다고 (Lopata & Oliva, 1993) 알려져 있다.

본교실의 박현정 등 (1995)과 이여일 등 (1997)은 신생아제대혈청을 인간 생식보조기술시 흔히 사용되는 복합배양액인 Ham's F-10에 첨가하여 생쥐 미성숙 난자-난구 복합체를 배양한 결과 대조군에 비해 현저한 난구세포 분산촉진현상을 관찰하였고, 유의하지는 않지만 대조군에 비해 미량의 성호르몬들이 생성되는 경향도 조사한 바 있다. 따라서 본 연구는 인간 생식보조기술에 사용할 배양액 및 첨가제에 대한 정도관리를 위해 생쥐 난자-난구 복합체의 체외 배양에 적합한 새로운 배양체계를 정립하기 위한 기초적 실험의 일환으로, 생쥐 미성숙 난자-난구 복합체 배양에 보다 민감하다고 알려진 TC199을 기본배양액으로 사용하고 신생아제대혈청 첨가에 의한 난자성숙과 난구세포 분산정도 및 난자-난구 복합체의 estradiol (E₂), progesterone (P₄), testosterone (T), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) 생성에 대한 영향을 조사하기 위해 본연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 배양액의 제조

기본배양액은 초순수정제수 (Burdick & Jackson) 1l에 TC199 (Gibco #31100-035) 분말 9.9g을 넣고 Penicilline G 0.075g (Sigma), Streptomycin 0.075g (Sigma), Calcium lactate 0.2452g (Calbiochem), NaHCO₃ 2.2g (Sigma)를 첨가하여 제조한 TC199 배양액을 사용하였다. 삼투압은 280mOsm/kg으로 조절하였고 이를 가압멸균 한 후 4℃ 냉장고에 보관하고 2주 이내에 사용하였다. 실험에 사용된 4종의 배양액으로는 기본배양액에 단지에너지원으로 0.4% 소혈청단백 (bovine serum albumine; BSA)을 첨가한 배양액, 10% 신생아제대혈청 (human cord serum; HCS)을 첨가한 배양액, 10 IU 융모성성선자극호르몬 (human chorionic gonadotropin; hCG)을 첨가한 배양액, 기본배양액에 HCS와 10 IU hCG를 함께 첨가한 배

양액으로 하고 사용하기 전날 만들어 37℃, 5% 조건에서 이산화탄소 부관기에서 15시간 동안 평형시켜 사용하였다.

2. HCS의 준비

HCS는 정상 분만 산모의 태아제대로부터 혈액을 채취하여 1000rpm에서 30분 동안 원심분리한 후 0.22μm 여과기로 가압멸균하고 56℃ 항온수조에서 1시간 동안 불활성화 시킨 후 1ml씩 취하여 사용 전까지 -70℃에 보관하였다.

3. 생쥐 난자-난구 복합체의 획득

생후 3~4주 된 ICR계 암컷생쥐를 매회 실험마다 5~6마리를 사용하였고, 난포성장을 위하여 5 IU pregnant mare serum gonadotropin (Sigma)을 복강 주사한 45~48시간 후 경추골 파열 방법으로 희생시켜 난소를 제거한 후, 양쪽 난소를 기본배양액에 넣어 난소 주위의 지방조직과 혈액응고 성분을 제거한 후 다시 2~3회 세척하고 해부현미경 (Nikon, 200X) 하에서 성숙난포만을 미세바늘로 터트려 난포속의 난자-난구 복합체를 취합하였다.

4. 난자-난구 복합체의 배양

난자-난구 복합체는 입으로 조절하는 미세피펫으로 골라낸 후 기본배양액에서 3~4회 세척한 다음 난구세포가 밀착된 미성숙한 복합체를 25개씩 골라, 4 구멍 배양접시 (Nuncclon®, Denmark) 내에 0.4% BSA를 첨가한 배양액, 10% HCS를 첨가한 배양액 그리고 10 IU hCG를 첨가한 배양액을 각각 1ml씩 2개 준비한 후, 각 배양액을 난자-난구 복합체를 넣은 군과 넣지 않은 군으로 구분하고 4시간, 24시간 동안 배양하였다.

LH의 난구세포 분산 촉진효과를 검증하기 위한 난자-난구 복합체의 배양을 위해서는 기본배양액에 0.4% BSA를 첨가한 배양액을 대조군으로 하고 실험군은 10% HCS를 첨가한 배양액과 LH 대신 10 IU hCG를 첨가한 배양액, 그리고 10% HCS과 10 IU hCG를 함께 첨가한 배양액을 사용하였다. 각각의 배양액은 배양접시에 25μl drop을 만들고 1ml의 mineral oil로 덮어서 실험 전 15시간동안 37℃, 5% CO₂로 평형 시킨 후 각각의 배양액에 20개씩의 난자-난구 복합체를 넣고 4시간, 8시간, 24시간 동안 배양하면서 난구세포 분산정도와 난자 성숙정도를 관찰하였다.

Table 1. Concentrations of sex steroids after 4 hr and 24 hr culture in the three different media containing BSA, HCS, and hCG

Culture time	Culture media \pm OCC ^a	No. of cultures	E ₂ (pg/ml)	P ₄ (pg/ml)	T (pg/ml)
4hr	TC199 + 0.4 % BSA	6	-	-	-
	TC199 + 0.4 % BSA + OCC		-	-	-
	TC199 + 10 % HCS	6	429.3 \pm 170.4 ^b	2315.4 \pm 98.8	46.5 \pm 12.9
	TC199 + 10 % HCS + OCC		479.8 \pm 173.5	2798.5 \pm 370.6	59.7 \pm 16.0
	TC199 + 10 IU hCG	4	4.0 \pm 8.0	6.2 \pm 3.9	-
TC199 + 10 IU hCG + OCC	7.7 \pm 8.9		12.4 \pm 11.4	-	
24hr	TC199 + 0.4 % BSA	6	-	-	-
	TC199 + 0.4 % BSA + OCC		-	-	-
	TC199 + 10 % HCS	6	439.6 \pm 176.9	2488.4 \pm 476.5	71.2 \pm 8.5
	TC199 + 10 % HCS + OCC		434.3 \pm 147.0	2531.9 \pm 385.3	81.1 \pm 8.2
	TC199 + 10 IU hCG	4	7.0 \pm 11.2	11.8 \pm 4.2*	-
	TC199 + 10 IU hCG + OCC		7.8 \pm 12.6	33.7 \pm 7.0*	-

^a With or without 25 oocyte cumulus complexes were cultured in media

^b Values are means SEM., * p=0.048

Table 2. Concentrations of PGF_{2 α} after 4 hr and 24 hr culture in the three different media containing BSA, HCS, and hCG

Culture time	Culture media \pm OCC ^a	No. of cultures	PGF _{2α} (pg/ml)
4hr	TC199 + 0.4 % BSA	4	-
	TC199 + 0.4 % BSA + OCC		-
	TC199 + 10 % HCS	6	322.3 \pm 125.0 ^b
	TC199 + 10 % HCS + OCC		376.4 \pm 139.5
	TC199 + 10 IU hCG	4	368.5 \pm 267.9
	TC199 + 10 IU hCG + OCC		661.0 \pm 19.7
24hr	TC199 + 0.4 % BSA	4	-
	TC199 + 0.4 % BSA + OCC		-
	TC199 + 10 % HCS	6	181.0 \pm 115.9
	TC199 + 10 % HCS + OCC		443.7 \pm 145.3
	TC199 + 10 IU hCG	4	509.5 \pm 60.1
	TC199 + 10 IU hCG + OCC		653.7 \pm 182.3

^a With or without 25 oocyte cumulus complexes were cultured in media

^b Values are means \pm SEM

5. 배양액내 호르몬의 측정

배양 후 4시간과 24시간째 각각의 배양액내 E₂, P₄, T, PGF_{2 α} 의 농도는 통상의 RIA 방법으로 측정하였다.

6. 난자성숙과 난구세포분산의 판정

난구세포의 분산정도는 Ball 등 (1984)의 방법

에 따라 역상현미경으로 관찰하였으며, 분산이 전혀 일어나지 않은 것은 (-), 부분적으로 일어난 것은 (+), 전반적으로 일어난 것은 (++)로 분류하였다. 난자 성숙 판정은 난자-난구 복합체를 배양한 후 난구세포를 미세피펫을 사용하여 제거하고 핵막이 붕괴되었으면 metaphase I (MI)으로 하고 제 1 극체가 나타난 것은 metaphase II (MII)로 하였다.

Table 3. Cumulus expansion and oocyte maturation of OCC in 4 different media

culture media	No. of cultures	Culture time											
		4hr				8hr				24hr			
		Expansion(%)				Expansion(%)				Expansion(%)			
	-	+	++	%MI ^b	-	+	++	%MI	-	+	++	%MI ^c	
TC199+0.4 % BSA	10	100	0	0	100	100	0	0	100	100	0	0	75±6.74
TC199+10 % HCS	10	98±1.3 ^a	2.0±1.3	0	100	45.8±9.5	53.9±9.6	0	100	0	38.8±9.3	61.1±9.3	85.7±3.7
TC199+10 IU hCG	10	100	0	0	100	0	100	0	100	0	0	100	77.3±9.9
TC199+10 % HCS +10 IU hCG	10	97±1.5	3.0±1.5	0	100	8.0±4.4	92.0±4.4	0	100	0	4.3±2.3	95.7±2.3	80.8±3.6

^a Values are means ± SEM, ^b Percentage of metaphase I oocyte, ^c Percentage of metaphase II oocyte

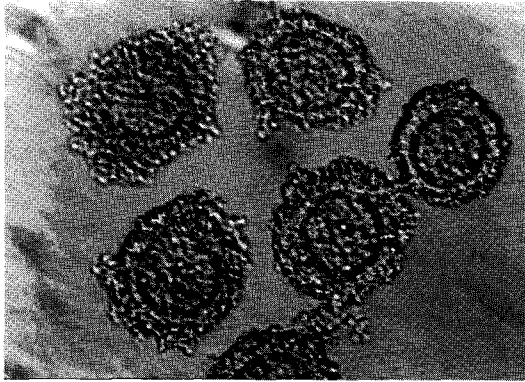


Fig. 1. OCCs (prophase I) with a germinal vesicle and compact cumulus cells before culture (× 200).

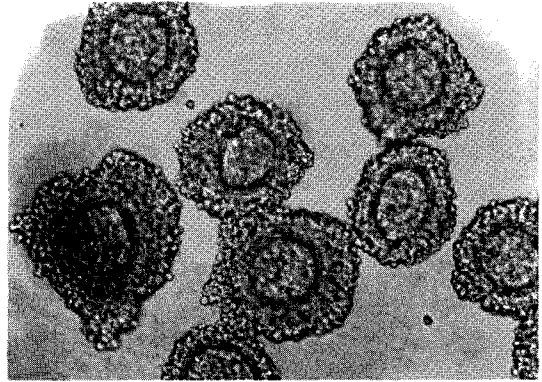


Fig. 2. OCCs cultured in TC199 supplemented with 0.4% BSA for 24 hrs showing no cumulus expansion (× 200).

7. 통계처리

실험결과는 one-way analysis of variance (ANOVA)의 multiple-range test를 사용하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. HCS 와 hCG가 난자-난구복합체의 성호르몬 및 PGF_{2α} 생성에 미치는 영향 (Table 1, 2)

HCS 내의 LH가 난자-난구 복합체의 성호르몬 및 PGF_{2α} 생성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 난자-난구 복합체를 HCS가 첨가된 배양액, 그리고 LH 효과만을 알아보기 위하여 LH 대신 hCG가 첨가된 배양액에서 4시간, 24시간 배양해본 결과, 대조군으로 사용한 BSA가 첨가된 배양

액에서 E₂, P₄, T, PGF_{2α} 모두를 전혀 측정할 수 없었고, HCS가 첨가된 배양액에서 E₂, P₄, T, PGF_{2α}가 모두 상당량 측정되었지만 난자-난구 복합체 부가 여부에 따라 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 그러나 hCG를 첨가한 배양액에서 난자-난구 복합체를 넣어 24시간 배양하였을 때에 난자-난구 복합체 없이 배양했을 경우 보다 P₄ 만의 유의한 증가를 관찰할 수 있었다 ($p = 0.048$).

2. 난자-난구 복합체의 난자성숙과 난구세포분산에 대한 HCS 및 hCG의 효과 (Table 3)

난자-난구 복합체는 단지 에너지원 (energy source)으로 BSA를 첨가한 대조군 배양액에서는 배양 전 (Fig. 1) 과 유사하게 배양 기간 전 예에서 난구세포 분산이 전혀 일어나지 않았다 (Fig. 2). 그러나 10 IU hCG를 첨가한 배양액으로부터

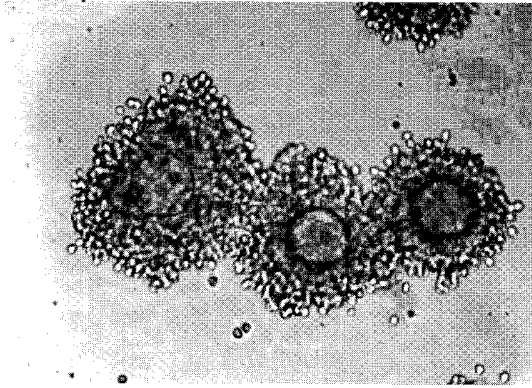


Fig. 3. OCCs cultured in TC199 supplemented with 10 IU hCG for 8 hrs showing partial cumulus expansion ($\times 200$).

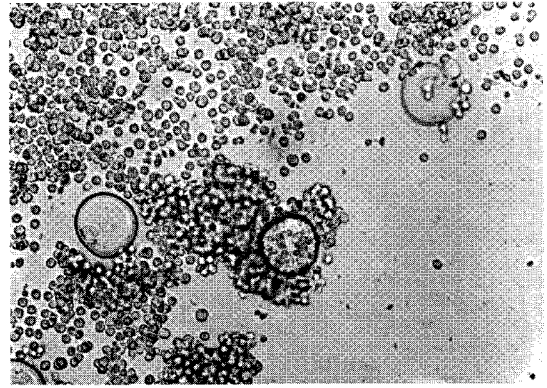


Fig. 4. OCCs cultured in TC199 supplemented with 10 IU hCG for 24 hrs showing marked expansion of cumulus ($\times 200$).

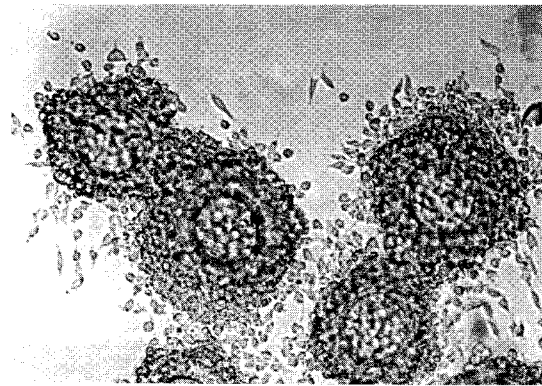


Fig. 5. OCCs cultured in TC199 supplemented with 10% HCS for 8 hrs showing partial cumulus expansion ($\times 200$).

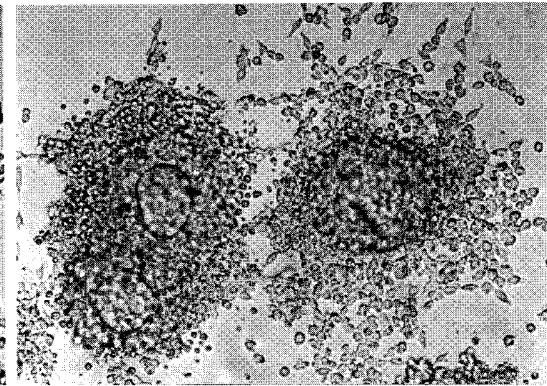


Fig. 6. OCCs cultured in TC199 supplemented with 10% HCS for 24 hrs showing marked expansion of cumulus ($\times 200$).

는 8시간 배양 하였을 때 100% 전 예에서 유의하게 부분적인 난구세포 분산이 일어났고 (Fig 3), 24시간 후에도 100%의 전반적인 난구세포 분산을 나타냈다 (Fig. 4). 또한 HCS를 첨가한 배양액에서는 난자-난구 복합체를 8시간 배양시 대조군에 비하여 유의하게 53.9%가 난구세포 분산이 부분적으로 일어나기 시작하여 (Fig. 5), 24시간 배양하였을 때는 hCG 첨가군의 경우만 못하지만 61.1%로 비교적 현저한 전반적인 분산현상을 나타냄 (Fig. 6) 으로서 ($p < 0.05$), hCG 첨가군만은 못하지만 난구세포에 대한 분산 촉진 양상을 나타냈다. 그리고 기본배양액에 HCS와 hCG를 동시에 첨가한 배양액에서는 8시간째부터 92.0%가 부분적인 난구세포 분산효과를 나타냈으며 (Fig. 7), 24시간째에는 95.7%가 전반적인 난구세

포 분산현상을 보여서 경시적인 변화 양상이 hCG 및 HCS 단독 첨가군과 유사한 촉진 양상을 나타냈다 (Fig. 8). 그러나 난자성숙 진행정도는 상술한 4종의 모든 배양액에서 유의한 차이 없이 배양 후 4시간째 부터 핵막 붕괴가 일어나 24시간 배양했을 때는 75~85.7% 범위로 제 1극체까지 출현하였다.

고 찰

본 실험에서는 생쥐 미성숙 난자-난구 복합체 배양에 보다 민감하다고 알려진 TC199 배양액을 기본 배양액으로 사용하고 경시적인 난구세포 분산현상을 관찰하였는데 HCS나 hCG 또는 HCS와 hCG을 함께 처리하였을 때 Ham's F-10을 기본

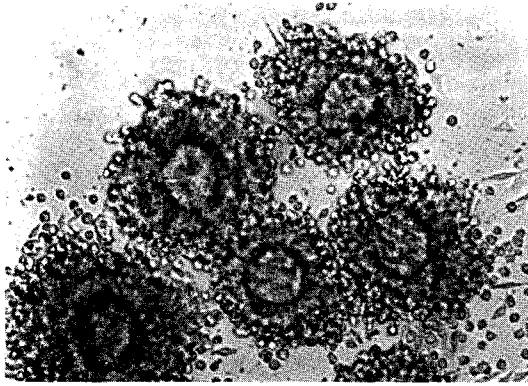


Fig. 7. OCCs cultured in TC199 supplemented with 10% HCS plus 10 IU hCG for 8 hrs showing partial cumulus expansion ($\times 200$).

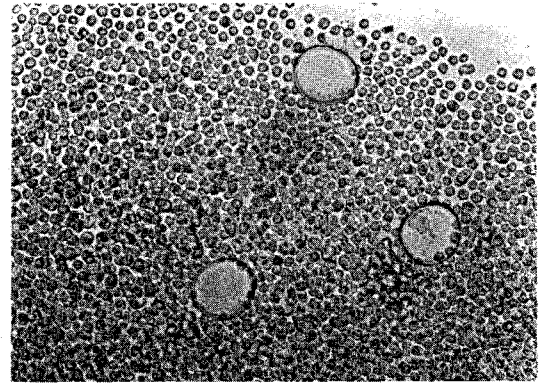


Fig. 8. OCCs cultured in TC199 supplemented with 10% HCS plus 10 IU hCG for 24 hrs showing complete cumulus expansion ($\times 200$).

배양액으로 사용했던 저자들의 (이여일 등, 1997) 전번 실험 결과와 유사함을 확인하였다. 그러나 난자 성숙에 있어서는 TC199를 사용하였을 때 24시간 배양 후 각 실험군에서 제 1 극체가 75~85.7% 범위로 출현하여 Ham's F-10을 기본배양액으로 사용했던 때의 45~54.6% 보다 난자성숙 정도가 훨씬 증가하여 생쥐 난자성숙을 위한 체외배양에는 TC199이 더 적합함을 시사하였다.

포유류의 성숙 난포속의 난자-난구 복합체는 gap junction에 의해 난자와 난구세포가 조밀하게 연결된 상태로 제 1 감수분열 전기에 정지해 있다가 (Wassarman & Albertini, 1994) 배란이 되기 직전에 LH의 분비가 급격히 증가하여 최고치에 도달하게 되면 성숙 난포내 난구세포는 LH의 자극을 받아 cAMP가 증가하여 PKA가 활성화되고 (Dekel & Galiani, 1989) 난구세포내의 microfilament가 재배열되면서 (Allworth & Albertini, 1993) hyaluronic acid를 분비하여 난구세포 분산이 일어난다 (Dekel & Beers, 1980; Sutovsky *et al.*, 1995). 이와 동시에 난자와 난구세포 사이를 연결하는 gap junction은 끊어지면서 난자성숙 억제물질의 전달이 차단되면 난자내 PKC가 활성화되어 난자내 P34^{cdc2}와 같은 특정 단백질들이 탈인산화되면서 (Aberdam & Dekel, 1985; Wassarman & Albertini, 1994) 난자성숙이 재개된다 (Larsen *et al.*, 1986; Larsen *et al.*, 1987; Racowsky & Satterlie, 1987; Racowsky & Baldwin, 1989; Racowsky *et al.*, 1989).

Allworth 등 (1993)은 소 난자-난구복합체를 제 2 감수분열 중기까지 진행시키고 충분한 난구세

포 분산을 유도하기 위해서는 FSH, LH, E₂ 등을 첨가한 성숙배양액이 요구된다고 하였으며, Armstrong 등 (1996)은 난구세포 분산에 있어 매우 낮은 농도의 FSH (0.04 μ g/ml)로 난구세포 분산을 촉진할 수 있지만 LH는 상당히 높은 농도를 사용해야 만이 난구세포 분산을 유도할 수 있다고 보고 하고 있다. 본 실험에서도 LH 대응으로 첨가한 hCG에 의한 생쥐 난자-난구 복합체의 난구세포 분산 양상이 HCS 첨가 배양액에서의 결과와 유사하므로 HCS 내의 LH가 난구세포 분산에 주요한 작용 요인임을 시사하였다. 그러나 난구세포의 분산에 있어서 생식소자극호르몬의 요구는 체내와 체외에서 분명히 달라서 FSH는 체외에서 난구세포 분산을 효과적으로 촉진할 수 있으며 LH는 체내에서 난구세포 분산을 개시되게 하는 것으로도 알려져 있다 (Chen *et al.*, 1994).

Prostaglandin은 PGE와 PGF_{2 α} 두 가지 isoform을 가지고 있는데 생식소자극호르몬에 의해 성숙 난포에서 합성되며 (Ainsworth *et al.*, 1975; Bauming *et al.*, 1975; Ainsworth *et al.*, 1984) 난포 파열에 관여한다고 보고되어 있다 (Holmes *et al.*, 1983; Murdoch *et al.*, 1986; Sogn *et al.*, 1987). 본 실험에서 TC199에 hCG을 첨가하여 생쥐 난자-난구복합체를 4시간, 24시간 동안 배양하였을 때 PGF_{2 α} 생성을 자극하는 성향을 나타냈으나 대조군에 비해 유의한 증가는 없었으며, HCS를 첨가한 배양액에서도 역시 PGF_{2 α} 생성에 영향을 미치지 못하였다. 이는 들쥐 난자-난구복합체 배양시 물론 PGF_{2 α} 는 아니지만 PGE 생성을 보고한 Schuetz 등 (1992)의 결과와는 상이하였다. 또한

배양 중인 난자-난구복합체의 다른 성호르몬 생성 능력들도 측정하여 보았는데 E₂, T는 모든 실험군에서 유의한 증가를 발견하지 못했다. 그러나 hCG을 첨가한 배양액에서 24시간 동안 난자-난구복합체를 배양했을 때는 미량의 P₄ 증가 (p=0.048) 를 측정할 수 있었는데, 이는 난자-난구복합체 배양 후 P₄ 생성이 오히려 감소했던 Khoury (1994), Vanderhyden (1993) 등의 보고와는 상이하였다.

이러한 연구 결과들을 종합해 보면 생쥐 난자-난구복합체를 TC199 기본배양액에 배양하였을 때 Ham's F-10을 기본배양액으로 사용했을 때와 비교해 난구 세포분산 정도에 있어서는 비슷한 양상을 나타내었으나 난자 성숙에 있어서 TC199이 보다 더 효과적인 배양액임을 보여 주었고, TC199에 hCG을 첨가하여 난자-난구복합체를 배양하였을 때 난자-난구 복합체로부터 미량의 P₄가 생성됨을 추정할 수 있었다. 결론적으로 TC199은 생쥐 난자-난구 복합체 배양의 난자 성숙 촉진에 효과적인 배양액임이 시사 되었고, HCS내의 LH에 의해 난구세포분산이 촉진될 수 있으며 이러한 분산증진은 P₄에 의하지 않나 추정할 수 있으나 이에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다. 또한, 이러한 생쥐 난자-난구 복합체의 실험 모델은 향후 인간 난자-난구복합체의 수정전 배양 체계 및 배양 조건을 평가하는데 있어서 유용할 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Aberdam E, Dekel N: Activators of protein kinase C stimulate meiotic maturation of rat oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 132, 570-574.
- Ainsworth L, Baker RD, Armstrong DT: Preovulatory changes in follicular fluid prostaglandin F levels in swine. *Prostaglandins* 1975, 9, 915-925.
- Ainsworth L, Tsang BH, Marcus GJ, Downey BR: Prostaglandin production by dispersed granulosa and theca interna cells from porcine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 1984, 31, 115-121.
- Allworth AE, Albertini DF: Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* 1993, 158(1), 101-112.
- Armstrong DT, Xia P, de-Gannes G, Tekpetey FR, Khamsi F: Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biol Reprod* 1996, 54(2), 331-338.
- Ashwood-Smith MJ, Hollands P, Edwards RG: The use of albumin 5(TM) as a medium supplement in clinical IVF. *Hum Reprod* 1989, 4, 702-707.
- Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL: Maturation and Fertilization of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci* 1984, 67, 2775-2785.
- Bar-Ami S, Khoury C, Zlotkin E, Brandes JM: Increasing progesterone secretion in human granulosa luteal cells induced by human follicular fluid. *Human Reprod* 1993, 8(1), 46-52.
- Bauminger S, Lieberman, ME, Lindner HR: Steroid-independent effect in gonadotropins on prostaglandin synthesis in rat Graafian follicles in vitro. *Prostaglandins* 1975, 9, 753-764.
- Bavister BD: Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 1981, 317, 45-51.
- Benadiva CA, Kuczynski-Brown B, Maguire TG, Matrianni L Jr, Flickinger GL: Bovine serum albumin (BSA) can replace patient serum as a protein source in vitro fertilization (IVF) program. *J IVF ET* 1989, 6, 164-168.
- Chen L, Russell PT, Larsen WJ: Sequential effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. *Biol Reprod* 1994, 51(2), 290-295.
- Das K, Phipps ER, Hensleigh HC, Tagatz GE: Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation in vitro. *Fertil Steril* 1992, 57(4), 895-901.
- Dekel N, Beers WH: Development of rat oocyte in vitro inhibition of maturation in the presence of absence of the cumulus oophorus. *Dev Biol* 1980, 75, 245-247.
- Dekel N, Galiani D: Involvement of protein kinases in the induction of oocyte maturation in the rat. In: Tsafirri A, Dekel N, editors. *Follicular development and the ovulatory response*. Serono

- Symposia Review No.23. Rome: Ares-Serono Symposia, 1989, 67-75.
- Fukui Y, Ono H: Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1989, 86, 501-506.
- George MA, Johnson MH: Use of fetal bovine serum substitutes for the protection of the mouse zona pellucida against hardening during cryoprotectant addition. *Hum Reprod* 1993, 8(11), 1898-1900.
- Holmes PV, Janson PO, Sogn J, Kallfelt B, LeMaire WJ, Ahren K, Cajander S, Bjersing L: Effect of PGF_{2α} and indomethacin on ovulation and steroid production in the isolated rabbit ovary. *Acta Endocrin* 1983, 104, 233-239.
- Khan I, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC: Human serum albumin versus serum: a comparative study on embryo transfer medium. *Fertil Steril* 1991, 59, 98-103.
- Khoury C, Itskovitz-Eldor J, Bar-Ami S: Induction of maturation of cumulus-oocyte complex by gonadotropin-releasing hormone analog is associated with lower progesterone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79(4), 1001-1006.
- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD: A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol* 1986, 113, 517-521.
- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD: Differential modulation of rat follicle cell gap junction populations at ovulation. *Dev Biol* 1987, 122, 61-71.
- 이여일, 박현정, 권영숙: 신생아제대혈청이 배양 중인 생쥐 난자-난구복합체의 홀몬생성에 미치는 영향. *대한산부인과학회지* 1997, 40, 1162-1170.
- Lopata A, Oliva K: Chorionic gonadotrophin secretion by human blastocysts. *Hum Reprod* 1993, 8(6), 932-938.
- Murdoch WJ, Peterson TA, Van Kirk EA, Vincent DL, Inskoop EK: Interactive roles of progesterone, prostaglandin, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol Reprod* 1986, 35, 1187-1194.
- 박현정, 신현우, 이여일: 체외수정 배양액에 대한 제대혈청 및 단백질첨가의 난자성숙 및 난구세포 분산에 미치는 영향. *대한산부인과학회지* 1995, 38, 1219-1227.
- Racowsky C, Baldwin KV: In vitro and vivo studies reveal that hamster oocyte meiotic arrest is maintained only transiently by follicular fluid, but persistently by membrana/cumulus granulosa cell contact. *Dev Biol* 1989, 134, 297-306.
- Racowsky C, Baldwin KV, Larabell CA, De Marais AA, Kazilek CJ: Down-regulation of membrane granulosa cell gap junctions is correlated with irreversible commitment to resume meiosis in golden syrian hamster oocytes. *Eur J Cell Biol* 1989, 49, 244-251.
- Racowsky C, Satterlie RA: Decreases in heterologous metabolic and dye coupling, but not in electrical coupling, accompany meiotic resumption in hamster oocyte-cumulus complexes. *Eur J Cell Biol* 1987, 43, 283-292.
- Schuetz AW, Dubin NH, Kwon H, Rock J, Damewood M: Effect of human serum on rat cumulus-oocyte complex functions in vitro: oocyte activation and endocrine secretions. *J Assisted Reprod Gen* 1992, 9, 133-138.
- Sogn JH, Curry TE, Brannstrom M, LeMaire WJ, Kooser RD, Papkoff H, Janson PO: Inhibition of follicle-stimulating hormone induced ovulation by indomethacin in the perfused rat ovary. *Biol Reprod* 1987, 36, 536-542.
- Sutovsky P, Flechon JE, Pavlok A: F-actin is involved in control of bovine cummulus expansion. *Mol Reprod Dev* 1995, 41(4), 521-529.
- Tanikawa M: Effect of human serum supplementation on fertilization and development of mouse embryos. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1994, 20(2), 209-215.
- Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P: Mouse oocyte regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993, 133(1), 423-426.
- Wassarman PM, Albertini DF: The mamalian ovum. In: Knobil E, Neil JD, eds, *The physiology of reproduction*, 2nd Edition New York: Raven Press, 1994, 79-122.