

돼지 난포액내 난구세포 난자복합체 팽창 억제 성분

오현주 · 김은희 · 손채은 · 이은주 · 박영식[†]
경북대학교 동물공학과

Cumulus Oocyte Complex Expansion Inhibiting Ingredient in Porcine Follicular Fluid

H. J. Oh, E. H. Kim, C. E. Shon, E. J. Lee and Y. S. Park[†]

Department of Animal Science & Biotechnology, Kyungpook National University,
Daegu, 702-701, Republic of Korea

SUMMARY

The objective of this study was to identify a follicular fluid ingredient inhibiting the cumulus oocyte complex (COC) expansion. Thus, follicular fluid or liquid chromatographic fractions of follicular fluid was supplemented in COC culture medium. And COCs were incubated for 48 hours to investigate about cumulus expansion and also the first polar body extrusion.

The results obtained were as follows;

1. The fluid of medium follicle significantly inhibited the COC expansion.
2. The fluid of large follicle inhibited the COC expansion.
3. Follicular fluid showed six major fractions at retention volumes (RVs) 1.83, 1.91, 2.15, 2.34, 2.53 and 2.74 ml after separation with Superose 12 column. Of the major fractions, fractions RV2.15, RV2.34, RV2.53 and RV2.74 inhibited both COC expansion and polar body extrusion. Especially, fractions of RV2.15 and RV2.53 significantly inhibited COC expansion, oocyte denudation and polar body extrusion.

In conclusion, porcine follicular fluid contained a COC expansion inhibiting ingredient (CEI) that may be contained largely in fractions RV2.15 and RV2.53. And CEI may inhibit oocyte maturation by inhibition of oocyte denudation and extrusion of the first polar body.

(Key words : porcine follicular fluid, cumulus oocyte complex, cumulus expansion, polar body extrusion, liquid chromatography)

서 론

난포액에는 난자의 성숙을 촉진하거나 억제하는 인자가 함유되어 있으며(Daen, 1994; Suzuki 등, 1986; Schuetz와 Rock, 1982), 난포액이 난자의 성숙에 미치는 영향은 난포의 발달단계에 따라서

다르다. 중간 크기의 돼지 난포로부터 회수한 난포액은 난자의 체외성숙을 저해하지만(Georgios와 Hagen, 1999; Downs와 Eppig, 1984; Cameron 등, 1983; Tsafiriri 등, 1982; Stone 등, 1978; Tsafiriri와 Channing, 1975), 큰 크기의 돼지 난포로부터 회수한 난포액은 체외배양 난구세포난자복합체(COC)의 팽창과 수정율을 높인다고 보고된 바 있다

본 연구는 경북대학교에서 지원하는 연구비(2000년)로 수행되었음.

[†]Correspondence

(Funahashi와 Day, 1993a, b; Yosida 등, 1992; 1990; Naito 등, 1988). 그러나 Tsafiri와 Channing (1975)은 작은 크기뿐만 아니라 큰 크기 돼지 난포액도 돼지 난자의 성숙을 억제한다고 하였다. 이와 같이 난포액이 난자의 성숙에 미치는 영향은 연구자에 따라 상반되게 보고되고 있다.

난포액에 함유되어 있는 난자의 성숙을 억제하는 인자를 밝히려는 연구가 있었으며, 1KD이하의 저분자량인 단백질 물질일 것이라 보고되었다 (Dostzuri과 Pavlok, 1996; Kadam과 Koide, 1991; Downs 등, 1985; Downs와 Eppig 등, 1984; Hillensj 등 1979; Jagiello, 1977). 이러한 난포액내 억제성분에 의한 난자 성숙의 저해작용은 난구세포와 관계가 있는데, Hillensj 등(1979)은 난포액에 함유되어 있는 억제인자가 난구세포를 통하여 난자 성숙억제효과를 나타낸다고 하였고, Dostzuri와 Pavlok(1996)는 체외에서 난구세포가 없는 난자 체외 성숙시킬 경우 난포액에 의해 감수분열이 저해되지 않았다고 하였다.

따라서 본 연구는 돼지 난포액이 난구세포의 팽창을 억제하는 성분을 함유하고 있는지를 규명하고 나아가서 이 성분이 난자의 나화와 제1극체의 방출 등 난자의 성숙에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수

미성숙 암퇘지의 난소를 회수하여 39°C의 생리 식염수가 든 보온병에 넣어 실험실로 운반하였다. 직경 2~5 mm의 난포를 5 ml 주사기로 흡인하여 난구세포에 둘러싸인 난자(cumulus oocyte complex, COC)를 회수하였으며, 회수한 COC는 Medium 199 (Cat. No. 12340-030, Gibco, USA)으로 반복 세척한 다음, 눈금이 있는 대안렌즈가 장착된 도립현미경(CK2, Olympus, Japan)하에서 크기에 따라 난구세포가 1~2층(165~175 μ m)인 작은 크기의 COC (small COC)와 난구세포가 4~5층(195~205 μ m)인 큰 크기의 COC (large COC)로 분리하였다.

2. 난포액 준비

직경이 2~5 mm인 중간 크기 난포 또는 6~10

mm인 큰 크기 난포에서 회수한 난포액을 각각 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 다음 상등액을 회수하여 신선한 난포액(Fresh)과 액체질소에서 동결한 난포액(Frozen)을 준비하였다. 동결용해 난포액은 39°C 항온수조에서 용해하여 사용하였다.

3. 난포액 단백질 성분의 분리

직경이 2~5 mm인 중간 크기의 난포에서 회수한 난포액을 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 침전물은 제거하고 상등액을 회수한 다음, 5 ml의 난포액을 삼각플라스크에 넣고 5°C의 항온수조에서 흔들면서 25 ml의 methanol을 천천히 혼합하였다. Methanol을 첨가한 후 50 ml의 iso-Octane을 첨가하여 충분히 흔든 다음 냉장실에서 정치하여 층 분리를 유도하였다. 정치 후 분리된 두 층의 용액 중 아래 methanol층을 회수하여 N₂로 500 μ l만 남기고 증발시켜 단백질 추출물을 얻었다. 단백질 추출물을 0.22 μ m 공극의 여과막으로 여과한 다음, 30KD cutoff를 가지고 있는 microcentrifuge filters (Sigma, USA)에 넣고 4°C에서 10,000g로 30분 동안 원심분리하여 30KD이하의 성분을 회수하였다. 이 성분을 Superose 12 column이 장착된 액체 크로마토그래피에 주입하고 pH 7.0의 20 mM HEPES를 함유한 150 mM NaCl 관류액을 40 μ l/min 속도로 흘려 단백질 추출물에 함유되어 있는 성분을 분리하였다.

4. 난구세포난자복합체의 배양과 평가

난포액 또는 난포액 분리성분을 함유한 TCM 199 (Cat. No. 11150-042, Gibco, USA) 20 μ l 소적을 35 mm 배양접시에 놓고 paraffin oil로 피복한 후 38°C에서 12시간 정치하여 평형시켰다. 평형시킨 배양액 소적에 미리 준비한 COC를 넣고 38°C, 5% CO₂에서 48시간 배양하였으며, 배양 후 COC의 직경과 나화 후 극체 방출을 조사하였다.

5. 실험설계

실험 1

중간 크기의 난포로부터 준비한 신선난포액 (Fresh)과 동결난포액(Frozen)을 함유한 TCM199

에서 small 및 large COC를 배양한 후 난구세포의 팽창 정도를 조사하였다. 난포액의 효과를 비교하기 위하여 난포액이 첨가되지 않은 TCM199(Control)에서 COC를 동일한 방법으로 배양하였다.

실험 2

큰 크기의 난포로부터 준비한 신선난포액(Fresh)과 동결난포액(Frozen)을 함유한 TCM199에서 small 및 large COC를 배양한 후 난구세포의 팽창 정도를 조사하였다. 난포액의 효과를 비교하기 위하여 난포액이 첨가되지 않은 TCM199(Control)에서 COC를 동일한 방법으로 배양하였다.

실험 3

중간 크기의 난포로부터 추출한 단백질을 LC로 분리하여 회수한 분질 RV1.83, RV1.91, RV2.15, RV2.34, RV2.55 및 RV2.74를 20%의 난포액 수준으로 TCM199에 첨가하고, 준비된 배양액에 중간 크기의 난포로부터 회수한 large COC를 배양한 후 난구세포의 팽창, 나화 및 극체의 방출을 조사하였다. 난포액 LC 분질의 효과를 비교하기 위하여 난포액이 첨가되지 않은 TCM199(Control)에서 COC를 동일한 방법으로 배양하였다.

6. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균과 오차 (Mean±SE)를 구하였으며 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan 다중검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 중간 크기 난포액이 COC의 팽창억제에 미치는 효과

중간 크기의 난포(직경 2~5 mm)에서 추출한 난포액이 COC의 팽창에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 중간 크기의 난포에서 회수한 1~2층 또는 4~5층의 난구세포를 가지고 있는 COC를 신선 또는 동결 난포액이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 다음 측정된 난구세포의 팽창은 Table 1과 같다.

중간 크기 난포액의 효과를 조사하기 위하여 TCM199만을 사용하여 배양한 대조구(Control)와 TCM199에 신선한 난포액을 20% 첨가한 처리구(Fresh) 및 TCM199에 동결액을 20% 첨가한 처리구(Frozen)에서 48시간 배양한 COC의 크기를 조사하였던 바, small COC는 각각 232.5 ± 6.8 , 201.9 ± 6.5 및 $214.7 \pm 4.5 \mu\text{m}$ 였으며, large COC는 각각 277.3 ± 3.9 , 242.9 ± 4.2 및 $248.3 \pm 7.9 \mu\text{m}$ 였다. 즉, COC의 크기는 대조구가 Fresh 및 Frozen 처리구

Table 1. Effect of fluid of medium follicle^A on cumulus oocyte complex (COC) expansion

Treatments	Small COC ^T		Large COC ^E	
	No. of oocytes used	Size (μm) of COC after incubation	No. of oocytes used	Size (μm) of COC after incubation
Control ^X	127	232.5 ± 6.8^a	115	277.3 ± 3.9^a
Fresh ^Y	132	201.9 ± 6.5^b	110	242.9 ± 4.2^b
Frozen ^Z	133	214.7 ± 4.5^b	111	248.3 ± 7.9^b

^A Medium follicle means a follicle of 2 to 5 mm in diameter.

^T Small COC was obtained from medium follicles. It had 1 to 2 cumulus cell layers and ranged between 165 and 175 μm in size.

^E Large COC was obtained from medium follicles. It had 4 to 5 cumulus cell layers and ranged between 195 and 205 μm in size.

^X Control means that COCs were incubated in TCM199.

^Y Fresh means that COCs were incubated in TCM199 supplemented with 20% of fresh fluid of medium follicle.

^Z Frozen means that COCs were incubated in TCM199 supplemented with 20% of frozen fluid of medium follicle.

Superscripts a and b in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

보다 유의하게 높았으나, 처리구간에는 유의한 차이가 없었다. 따라서 중간 크기의 난포액은 보존 상태와 관계없이 크거나 작은 크기 COC의 난구세포 팽창을 억제하는 것으로 사료된다.

Durzbrn 등(1997)은 돼지 난포액에는 난포의 발달단계에 따라서 함유 성분이 다르며, 특히 중간 크기 난포의 난포액에는 난자의 성숙을 억제하는 인자가 있다고 하였다. 중간 크기의 난포에서 회수한 난포액을 함유한 체외배양액에서 체외 배양한 난자의 경우 감수분열이 시작되지 않거나(Tsafiriri와 Channing, 1975), 난자의 체외 성숙율이 저하되었다(Georgios와 Hagen, 1999; Romero-Arrdondo 등, 1994)고 보고된 바 있다. 따라서 중간 크기의 난포에서 회수한 난포액에는 난구세포의 팽창을 억제하여 난자의 성숙을 저해하는 인자가 함유되어 있을 것으로 추론된다.

2. 큰 크기 난포액이 COC의 팽창억제에 미치는 효과

큰 크기의 난포(직경 6~10 mm)에서 추출한 난포액이 COC의 팽창에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 중간 크기의 난포에서 회수한 1~2층 또는 4~5층의 난구세포를 가지고 있는 COC를 신

선 또는 동결 난포액이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 다음 측정된 난구세포의 팽창은 Table 2와 같다.

큰 크기 난포액의 효과를 조사하기 위하여 TCM199만을 사용한 대조구(Control)와 TCM199에 신선한 난포액을 20% 첨가한 처리구(Fresh) 및 TCM199에 동결난포액을 20% 첨가한 처리구(Frozen)에서 48시간 배양한 COC의 크기를 조사하였던 바, small COC는 각각 224.8 ± 6.3 , 200.2 ± 5.7 및 $201.1 \pm 4.1 \mu\text{m}$ 였으며, large COC는 각각 272.6 ± 5.5 , 242.4 ± 10.1 및 $256.8 \pm 12.3 \mu\text{m}$ 였다. 즉 배양 후 COC의 크기는 작은 COC의 경우 대조구가 Fresh와 Frozen 처리구보다 유의하게 컸지만, 큰 COC의 경우 대조구가 처리구에 비하여 높았으며 유의한 차이도 나타나지 않았다. 따라서 큰 크기의 난포액도 작은 크기 COC뿐만 아니라 큰 크기 COC에서도 난구세포의 팽창을 억제하는 경향이 있는 것으로 사료된다.

Dostzbrl과 Pavlok(1996)은 돼지 난포 중에서 큰 크기의 난포액보다는 직경 2.5~5.0 mm 크기의 중간크기의 난포액이 감수분열 억제효과가 더 컸다고 하였으며, Tsafiriri와 Channing (1975)도 작은 크기 및 큰 크기 돼지 난포액이 모두 돼지 난자의 성

Table 2. Effect of fluid of large follicle^A on cumulus oocyte complex (COC) expansion

Treatments	Small COC ^T		Large COC ^E	
	No. of oocytes used	Size (μm) of COC after incubation	No. of oocytes used	Size (μm) of COC after incubation
Control ^X	40	224.8 ± 6.3^a	23	$272.6 \pm 5.5^{\text{NS}}$
Fresh [†]	42	200.2 ± 5.7^b	24	242.4 ± 10.1
Frozen [‡]	43	201.1 ± 4.1^b	25	256.8 ± 12.3

^A Large follicle means a follicle of 6 to 10 mm in diameter.

^T Small COC was obtained from medium follicles. It had 1 to 2 cumulus cell layers and ranged between 165 and 175 μm in size.

^E Large COC was obtained from medium follicles. It had 4 to 5 cumulus cell layers and ranged between 195 and 205 μm in size.

^X Control means that COCs were incubated in TCM199.

[†] Fresh means that COCs were incubated in TCM199 supplemented with 20% of fresh fluid of large follicle.

[‡] Frozen means that COCs were incubated in TCM199 supplemented with 20% of frozen fluid of large follicle.

Superscripts a and b in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

Superscript NS means that there is not significant difference between treatments.

속을 억제하였다고 보고하였다. 그러나 Elmileik 등(1995)은 큰 크기 소 난포에서 회수한 난포액이 소 난자의 발달과 성숙을 강화시켰다고 하였으며, Sun 등(1984)도 면양의 난포액과 인간의 난포액이 난자의 성숙·수정 및 발달을 자극한다고 보고하였다. 그러므로 큰 난포로부터 회수한 난포액의 난자성숙 억제효과는 종에 따라 다소 차이가 있는 것으로 사료된다.

따라서 큰 크기의 돼지 난포에서 회수한 난포액에는 난구세포의 팽창을 억제하여 난자의 성숙을 저해하는 인자가 함유되어 있는 것으로 추론된다.

3. 난포액내 생리활성물질의 분리와 동정

난구세포난자복합체의 팽창을 억제하는 물질을 동정하기 위하여 methanol과 iso-Octane (1:2) 용액으로 추출한 다음 30KD 여과막을 이용 회수한 단백질 성분을 Superose 12 column을 사용 분리한 결과는 Fig. 1과 같다.

난포액의 단백질 성분을 여과 분리하여 회수한 성분을 20 mM HEPES가 함유된 150 mM NaCl 용액(pH 7.0)으로 분당 40 μ l로 흘려 Superose 12 column에서 분리하였던 바, RV 1.83, 1.91, 2.15, 2.34, 2.53 및 2.74 등 5개의 분절을 얻을 수 있었다(Fig. 1).

분리 성분이 난구세포의 팽창에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 회수한 5개의 분절을 각각 20%

난포액에 해당하는 수준으로 첨가한 TCM199에서 중간크기 난포에서 회수한 4~5층의 난구세포난자복합체를 48시간 배양하였던 바 얻어진 결과는 Table 3과 같다.

난구세포의 팽창을 억제하는 난포액내 성분을 동정하기 위한 본 실험에서, TCM199만으로 난구세포난자복합체를 배양한 대조구(Control), 분리한 분절을 각각 20%의 난포액에 해당하는 용량을 TCM199에 첨가하여 배양한 각 처리구에서 48시간 배양한 COC의 크기와 나화 정도 및 제1극체의 발현 정도를 조사하였던 바, COC의 크기는 대조구, RV1.83, RV1.91, RV2.15, RV2.34, RV2.53 및 RV2.74 처리구에서 각각 244.3 ± 4.7 , 228.4 ± 4.0 , 246.56 ± 8.9 , 210.2 ± 2.2 , 216.1 ± 2.1 , 204.1 ± 4.8 , 및 $218.5 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 였고, 나화난자의 비율은 각각 52.7 ± 2.5 , 45.7 ± 4.0 , 36.7 ± 10.4 , 18.3 ± 11.5 , 25.3 ± 13.6 , 27.7 ± 8.7 , 및 $34.7 \pm 1.5\%$ 였으며, 극체 발현 난자의 비율은 각각 37.7 ± 9.7 , 31.0 ± 5.3 , 24.3 ± 3.8 , 9.3 ± 1.2 , 17.7 ± 2.5 , 8.0 ± 2.7 , 및 $21.0 \pm 5.6\%$ 였다.

난포액 분절 RVs 2.15, 2.34, 2.53 및 2.74는 난구세포난자복합체의 난구세포의 팽창과 극체의 방출을 유의하게 억제하였으며, RVs 1.91, 2.15, 2.34, 2.53 및 2.74 처리구에서 나화난자의 비율이 유의하게 낮았다. 즉, 난구세포의 팽창과 극체의 발현은 처리에 대해 유사한 경향을 보였다. 따라서

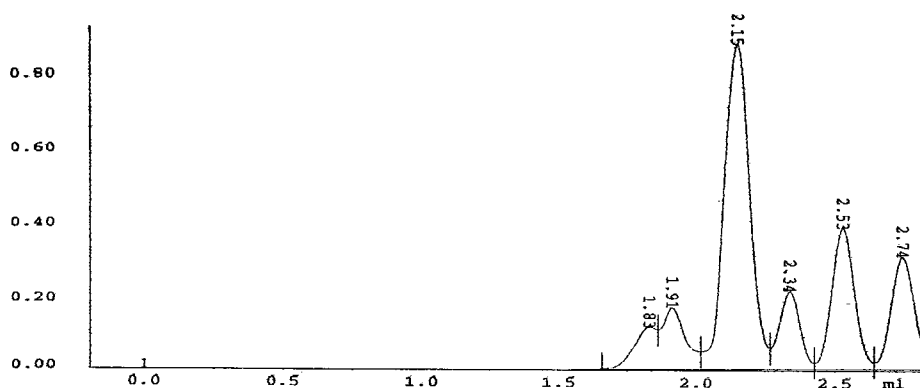


Fig. 1. Fractions of porcine follicular fluid (PFF). PFF was eluted through Superose 12 column with 150 mM NaCl solution buffered with 20 mM HEPES at pH 7.0. After elution, six major fractions were obtained at retention volumes of 1.83, 1.91, 2.15, 2.34, 2.53 and 2.74 ml.

Table 3. Effect of liquid chromatographic fractions of follicular fluid on cumulus oocyte complex (COC) expansion, oocyte denudation, and 1st polar body (PB) extrusion

Fractions of follicular fluid	No. of oocytes used	Size (μm) of COC ^a after incubation	No. of oocytes denuded (%)	No. of oocyte with 1st PB (%)
Control [‡]	51	244.3 \pm 4.7 ^d	27(52.7 \pm 2.5) ^b	19(37.7 \pm 9.7) ^c
RV1.83 [°]	52	228.4 \pm 4.0 ^{cd}	24(45.7 \pm 4.0) ^b	16(31.0 \pm 5.3) ^c
RV1.91 [°]	46	246.6 \pm 8.9 ^d	18(36.7 \pm 10.4) ^a	11(24.3 \pm 3.8) ^{bc}
RV2.15 [°]	52	210.2 \pm 2.2 ^a	9(18.3 \pm 11.5) ^a	5(9.3 \pm 1.2) ^a
RV2.34 [°]	51	216.1 \pm 2.1 ^{ab}	14(25.3 \pm 13.6) ^a	9(17.7 \pm 2.5) ^b
RV2.53 [°]	51	204.1 \pm 4.8 ^a	14(27.7 \pm 8.7) ^a	4(8.0 \pm 2.7) ^a
RV2.74 [°]	49	218.5 \pm 1.2 ^{cb}	17(34.7 \pm 1.5) ^a	10(21.0 \pm 5.6) ^{bc}

^a COC was obtained from medium follicles. It had 4 to 5 cumulus cell layers and ranged between 195 and 205 μm in size.

[‡] Control means that COCs were incubated in TCM199.

[°] RV1.83, RV1.91, RV2.15, RV2.34, RV2.53 or RV2.74 means that COCs were incubated in TCM199 supplemented with fraction RV1.83, RV1.91, RV2.15, RV2.34, RV2.53 or RV2.74, respectively. The fractions were supplemented as much as 20% of follicular fluid.

Superscripts a, b, c and d in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

난구세포의 팽창정도와 극체의 발현정도는 밀접한 관련이 있는 것으로 추론되며, 난자의 성숙을 난구세포의 팽창 정도로 판정할 수 있을 것으로 사료된다. Hillensj 등(1979)도 난포액에 함유되어 있는 억제인자가 난구세포를 통하여 난자 성숙억제효과를 나타낸다고 보고한 바 있다.

특히 RV2.15와 RV2.53 분절은 COC의 팽창을 유의하게 억제하였으며, 또한 극체발현을 유의하게 저하시켰다. 따라서 이들 분절에는 난구세포의 팽창을 억제하는 성분이 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라 이 성분은 난자의 나화와 제1극체의 방출 등 난자의 성숙을 억제하는 것으로 추론된다.

적 요

본 연구는 돼지 난포액에 난구세포난자복합체(COC)의 팽창을 억제하는 성분이 있는지를 규명하고자 실시하였다. 난포액과 액체크로마토그래피로 분리한 난포액 분절을 함유한 배양액에서 48시간 배양한 다음 COC에서 난구세포의 팽창, 난자의 나화 및 제1극체의 방출을 조사하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 중간 크기의 난포에서 채취한 난포액은 COC의 팽창을 유의하게 억제하였다.
2. 큰 크기의 난포에서 채취한 난포액도 COC의 팽창을 억제하였다.
3. Superose 12 column으로 분리한 난포액에서 retention volumes (RVs) 1.83, 1.91, 2.15, 2.34, 2.53 및 2.74 ml에서 6개의 주요 분절을 얻었으며, 주요 분절 중에서 RV2.15, RV2.34, RV2.53 및 RV2.74 분절은 COC의 팽창과 극체의 방출을 억제하였으며, 특히 RV2.15와 RV2.53분절은 COC의 팽창과 난자의 나화 및 극체의 방출을 유의하게 억제하였다. 결론적으로, 난포액에는 COC의 팽창을 억제하는 성분이 함유되어 있으며, 이 성분은 특히 난포액의 RV2.15와 RV2.53 분절에 주로 함유되어 있다. 또한 난구세포의 팽창을 억제하는 성분은 난자의 나화와 제1극체의 방출 등 난자의 성숙을 억제하는 것으로 추론된다.

참고문헌

Cameron IL, Lum JB, Nations C, Asch RH and

- Silverman AY. 1983. Assay for characterization of human follicular oocyte maturation inhibitor using *Xenopus* oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:817-822.
- Daen FP, Sato E, Naito and Toyoda Y. 1994. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 101:667-673.
- Dostzbrl J and Pavlok A. 1996. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36:681-690.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF and Eppig JJ. 1985. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A.* 82:454-8.
- Downs SM and Eppig JJ. 1984. Cyclic adenosine monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinology*, 114:418-427.
- Durzbrn Reyes G, Rosales AM and Hicks Gzbqtmez JJ. 1997. Participation of the follicular fluid in follicular development oocyte maturation and spermatid function. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 65:349-356.
- Elmleik AMA, Maeda T and Teroda T. 1995. Higher rates of development into blastocyst following the *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with from large bovine follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:85-96.
- Funahashi H and Day BN. 1993a. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 99:97-103.
- Funahashi H and Day BN. 1993b. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39:965-973.
- Georgios Vatzias and Daniel R. Hagen. 1999. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Bio. Reprod.*, 60:42-48.
- Hillensjwnc T, Kripner AS, Pomerantz SH and Channing CP. 1979. Action of porcine follicular fluid oocyte maturation inhibitor *in vitro*: possible role of the cumulus cells. *Acv. Exp. Med. Biod.*, 112:283-291.
- Jagiello G, Graffo J, Ducayen M and Prosser R. 1977. Further studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocyte maturation. *Fertil. Steril.*, 28:476-81.
- Kadam AL and Koidc SS. 1991. A follicular fluid factor inhibiting *Xenopus* oocyte maturation. *Endocr. Res.*, 17:343-355.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete. Res.*, 21:289-95.
- Romero-Arredondo A and Seidel GE Jr. 1994. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41:383-394.
- Schuetz AW and Rock J. 1982. Stimulatory and inhibitory effects of human follicular fluid on amphibian oocyte maturation and ovulation *in vitro*. *Differentiation*, 21:41-44.
- Stone SL, Pomerantz SH, Schwartz-Kripner A and Channing CP. 1978. Inhibitor of oocyte maturation from porcine follicular fluid: further purification and evidence for reversible action. *Biol. Reprod.*, 19:585-92.
- Sun FJ, Holm P, Irvine B and Seamark RF. 1994. Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41:981-988.
- Suzuki, Kurasawa S, Kitai H, Oba M, Komatus S, Yoda K and Iizuka R. 1986. Cooperative inhibitory effect of follicular fluid and cAMP on hamster oocyte maturation. *Experientia*,

42:795-798.

Tsafiri A and Channing CP. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. *Endocrinology*, 96:992-7.

Tsafiri A, Dekel N and Bar-Ami S. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 64:541-51.

Yosida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting

from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 88:1-8.

Yosida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamaba K and Kojima Y. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 95:481-488.

(접수일: 2000. 11. 13 / 채택일: 2000. 12. 2)