

약령 마우스에서 분리한 난포난자의 체외발생

이현주 · 김선영 · 김기동¹ · 이상호¹ · 송해범
대구대학교 자연자원대학

***In Vitro* Development of Preantral Follicles Isolated from Juvenile Mice**

H. J. Lee, S. Y. Kim, K. D. Kim¹, S. H. Lee¹ and H. B. Song

College of Natural Resources, Daegu University

SUMMARY

The aim of this study was to assess the developmental capacity of oocytes matured *in vitro* after 10 days of culture when the preantral follicles were isolated from juvenile mice 10- and 20-day old, respectively, and to develop *in vitro* culture system that observed a view to morphology of follicles and nucleus maturation of oocytes.

The antral-like cavities became formation after 6 days of culture in follicle isolated from 10- and 20-day old mice.

The number of follicles were 21.5 and 33.3 in ovary isolated from 10- and 20-day old mice, respectively.

The diameters of oocytes were 51.85 and 57.50 μm before culture and were grew 55.95 and 63.11 μm after culture for 10 days, in follicles isolated from 10- and 20-day old mice, respectively.

The observation rates up to the M II and from GV to M II were 4.3 and 22.1%, and 14.5 and 61.1% after culture for 10 days in follicles isolated from 10- and 20-day old mice, respectively.

(Key words : preantral follicle, juvenile mice, *in vitro* culture, nuclear maturation)

서 론

난소의 난포는 포유동물 난소의 구조적 및 기능적 단위로서 난모세포와 이를 둘러싸고 있는 과립세포, 기저막과 협막세포로 구성되어 있다. 수정능과 배아의 발달로 이어지는 난모세포, 즉 난포의 정상적 발달은 난포내 구성 세포간의 복잡한 상호

작용에 의하여 좌우된다. 이러한 상호작용은 난모세포의 성장과정 동안 단계별로 독특하고 점진적인 환경변화를 이루어낸다. 발달 중 어느 단계에서건 난포의 발달은 지속적이고 빈번하게 난포폐쇄로 진행된다.

최근의 체외수정란 생산 방법은 발달능에서 우위에 있는 대난포강(large antral) 난포 혹은 배란전 난포의 공급 여하에 의존하고 있으며 난포는 난소

이 논문은 2002년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

¹ 고려대학교 생명공학원(Graduate School of Biotechnology, Korea University)

[†] Correspondence : E-mail: goatsong@daegu.ac.kr

내에 상대적으로 적은 수 만이 존재하는 문제가 있다. 하지만 포유동물의 난소는 많은 수의 원시난포와 전난포강 단계의 난포들이 존재하고 있다. 이들 발달 단계에 있는 난포의 체외성숙은 곧 동물형질전환, 희귀 품종의 보존 및 나아가서 유전자원 보존에까지 적용이 가능하다(Betteridge 등, 1989 ; Gosden, 1992).

난소난포의 체외성숙에 요구되는 조건, 대사 및 분화과정 등 및 난소난포의 분리방법 등에 대한 연구는 설치류를 모델로 하여 이미 많은 연구가 진행된 바 있다(Eppig와 Schroeder, 1989; Gore-Langton과 Daniel, 1990; Carroll 등, 1991; Nayudu와 Osborn, 1992; Boland와 Gosden, 1994; Hartshorne 등, 1994; Spears 등, 1994; Eppig와 O'Brien, 1996). 가축에서도 일부 연구가 진행되기는 하였으나 아직 보편적 성과는 없는 실정이다.

본 연구는 원시난포의 체외배양체계를 확립할 수 있는 가능성을 검토하기 위하여 신생 마우스에서 분리한 각 일령별 난소로부터 난포를 분리하고 체외배양하여 난포의 형태변화, 성장률 및 난자의 핵성숙 단계를 조사하여 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 마우스를 이용하였다. 암컷은 2.5 IU의 PMSG와 hCG를 48 시간 간격으로 처리 후 수컷과 24 시간 합사하여 교미를 유도하였다. 난소난포는 출생 후 10일령과 20일령의 암컷 마우스로부터 분리하였다.

2. 배양액

난포의 체외배양에 사용한 기본배양액은 Eppig (1992)가 이용한 조건을 토대로 Waymouth MB752 /1에 0.23 mM pyruvic acid, 50 mg/l streptomycin sulfate, 75 mg/l penicillin G, 5 ng/ml FSH, 1 ng/ml EGF와 10%의 FBS로 구성되었다. 난포배양액은 기본배양액에 ITS(5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium)를 첨가하여 사용하였다. 난자성숙 배양액으로 EGF를 제외한 기본배양액에

100 ng/ml의 FSH와 1 ng/ml의 hCG를 첨가한 것을 이용하였다.

난소와 난자의 세척은 4 mg/ml의 BSA가 첨가된 M2 배양액으로 실시하였다. 난소로부터 난포를 분리하기 위하여 20 IU/ml deoxyribonuclease (DNase)와 2.5 mg/ml의 collagenase가 첨가된 기본 배양액을 이용하였다.

3. 난포의 체외배양

생후 10 및 20일령의 미성숙 암컷 마우스를 경추 탈골법으로 도살한 후 복부를 절개하여 난소를 적출하였다. 난소는 M2/BSA 용액으로 3 회 세척 후 난포배양액 하에서 26G 주사바늘로 조각을 내었다. 난소의 조직절편은 DNase와 collagenase가 함유된 기본배양액 하에서 37°C 20분 동안 배양하였다. 효소처리된 난소의 조직절편을 micropipet으로 수회 흡입 배출을 반복함으로써 난포를 분리하였다. 난포는 theca cell층과 granulosa cell층의 구조적 형태가 정상적인 것만을 선별하여 실험에 이용하였다. 선별된 난포는 다시 10% FBS/M2로 2 회, 난포배양액에서 3 회 세척을 실시한 후 배양하였다.

난포의 배양은 60-mm 배양접시에 20 µl의 drop을 만들고 drop당 하나의 난포를 넣은 후 mineral oil로 덮고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 10일 동안 배양하였다. 배양액은 매 2일 간격으로 교환하였다.

체외배양 기간 동안 난포의 성장을 난포강의 형성(antrum formation), 난포의 구조(follicular structure), 난자의 나화(denuded oocyte) 및 난자의 퇴행(degeneration of oocyte) 등의 형태변화를 기준으로 판정하였다.

또한 난포난자의 성장은 투명대를 제외한 난자의 직경을 50배율의 해부현미경하에서 ocular scale을 이용하여 15회 반복 측정하였다.

난자의 핵성숙을 관찰하기 위하여 체외배양한 난포로부터 pasteur pipet을 이용하여 난자세포를 회수하고 난자성숙배양액 하에서 18 시간 배양한 후 DAPI 염색을 실시하여 형광현미경 하에서 조사하였다.

결 과

1. 난포의 형태변화

본 실험에서는 20일령의 경우 Fig. 1A에 보이는 바와 같이 형태적으로 난포의 구성 세포층이 온전하고 난모세포의 퇴화가 진행되지 않은 난포를 이용하였으며 기타 Fig. 1B 및 1C와 같이 theca cell의 일부가 소실되었거나 난모세포의 형태가 구형의 모양을 갖추지 못한 경우는 배제하였다.

배양 중 난포난의 형태 변화는 Fig. 2에 보이는 바와 같이 배란시의 난자와 형태적으로 동일한 경우 (Fig. 2A), Theca cell 층의 소실이 일어난 경우 (Fig. 2B) 및 난자가 완전히 발달하지 못하여 직경이 기준보다 작은 경우 (Fig. 2C) 등 다양하게 나타났다.

난포의 성장률은 20일령 마우스에서 분리한 preantral follicle이 10일령에서 분리한 경우보다 높게 나타났다 (Table 1). 난포강 형성은 배양 6일에 처음 관찰되기 시작하여 20일령의 경우 배양 3

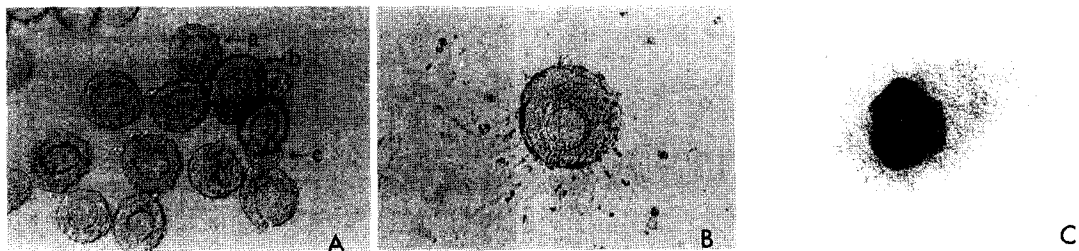


Fig. 1. *In vitro* growth and differentiation of primordial follicles from 20-day old mice (culture periods are 0, 1, 3 days).

- (A) Early preantral follicle cultured for 0 day ; intact round follicular structure with one or two layers of granulosa cells and at least some adhering thecal cell the oocyte had to be visible, round and centrally located in the follicles.
- (B) Early preantral follicle cultured for 1 day ; central germinal vesicle(GV)-stage oocyte with a thin zona pellucida, surrounded by two layers of granulosa cells, a basal membrane and a single layer of thecal cells. Some cells have started to spread the culture dish, attaching the follicle to the plate.
- (C) Early preantral follicle after 3 days of culture ; formation of a monolayer around the follicle and outgrowth of granulosa cells through the basal membrane, spread over the monolayer.

Table 1. Growth characteristics of early preantral follicles

Days of culture	Age of neonates	No. of follicles	Antrum formation (%)	Follicular structure(%)	No(%) of oocytes	
					Denuded	Degenerated
3	10	140	-	106(75.7)	34(24.3)	-
	20	167	-	143(85.6)	24(14.4)	-
6	10	152	1(2.0)	29(19.1)	123(80.9)	-
	20	149	45(30.2)	58(38.9)	44(29.5)	2(1.3)
9	10	124	5(4.0)	2(1.2)	112(90.3)	5(4.0)
	20	142	54(38.0)	17(12.0)	63(44.4)	8(5.6)
10	10	177	7(4.0)	4(2.3)	141(80.0)	25(14.1)
	20	251	26(10.4)	43(17.1)	120(47.8)	62(24.7)

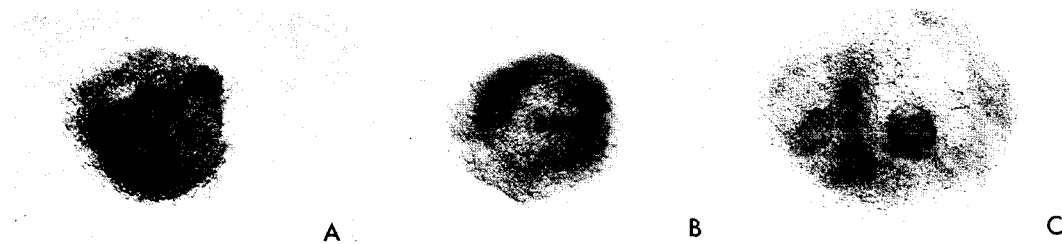


Fig. 2. *In vitro* growth and differentiation of primordial follicles from 20-day old mice(culture periods are 6, 9, 10 days).

- (A) Early preantral follicle cultured for 6 days ; granulosa cell outgrowth around the follicle and over the monolayer. The oocyte is centrally located. Onset of antrum formation around oocyte covered by tightly packed corona cells. The mural granulosa cells are more loosely interconnected.
- (B, C) Follicles cultured for 9 and 10 days ; development of antral cavities.

일에서 6일 사이에 급속히 진행되어 45%에 이른 후 배양 9일째에 최대 54%까지 증가하였다. 이에 비하여 10일령의 경우 난포강 형성률이 매우 저조하여 배양 10일째에 26%에 머물렀다. 난자의 나화율은 10일령의 경우, 배양 3일에 24.3% 였으나 계속 증가하여 6일째 80.9%, 9일째 90.3%로서 20일령의 최고인 10일째의 47.8% 보다 높게 나타났다. 하지만 이와 반대로 난자의 퇴화율은 20일령의 경우에 보다 높게 나타났다. 한편 10일령의 경우 급격한 변화가 일어나지 않았다. 배양 10일에 관찰된 난포강의 형태는 주로 open antrum이었으며 그 이전에 관찰되던 enclosed antrum의 난포는 나타나지 않았다.

나화 난자의 비율이 10일령에서 보다 높게 나타난 것은 본 실험에 이용된 난포는 회수를 위한 효

소 처리가 이후 난포의 배양에 영향을 미친 것으로 추정된다. 이러한 영향은 theca cell층의 일부 소실을 초래하여 세포의 명확한 형태가 없으며, 난포가 바닥에 부착하고 granulosa cell 들이 증식과 더불어 basal membrane 밖으로 성장하여 monolayer를 형성하는 등의 결과를 보였다.

2. 난자의 성장률

마우스의 난소에서 분리한 난포는 20일령의 경우 난소당 평균 33.3개, 10일령의 경우 21.5개였다. Table 2에 보이는 바와 같이, 분리한 난포내 난자의 크기는 20일령의 경우 직경이 57.5 μm , 10일령의 경우 51.9 μm 이었다. 이들 난포를 10일간 배양시 난자의 직경은 10일령과 20일령에서 각각 55.9 μm 와 63.11 μm 로 증가하였으며 성장 비율은 20일령의 경우보다 높게 나타났다. 난포의 회수는 10일령의 경우 미성숙 난포가 20일령에 비하여 많이 존재하여 그 비율이 보다 낮게 나타났다.

Table 2. *In vitro* growth of oocyte in follicles isolated from ovaries

Age of neonates (days) ¹	No. of ovaries used	No. of follicles used (mean)	Size of oocyte(m)	
			Before	After
10 ²	26	558(21.5)	51.85	55.95
20	21	700(33.3)	57.50	63.11

¹ The result were obtained from 15 experiments and the duration of follicles culture were 10 days.

² Day 10 refers to the day of neonates born.

3. 난자의 핵성숙

분리한 난포를 10일간의 배양 후 난자의 핵성숙 정도를 살펴본 바, Table 3에 나타난 바와 같이 10일령의 경우 GV, GVBD, M I, A I 및 M II가 각각 57.0%, 0%, 6.4%, 0% 및 4.3% 이었으며, 20일령은 각각 28.5%, 8.4%, 2.1%, 28.4% 및 22.1%로 나타났다. 따라서 GVBD 이상 발달한 난자는 20일령에서 61.1%로서 10일령의 14.9%에 비하여 보다

Table 3. Nuclear maturation of oocytes recovered after follicles cultured for upto 10 days¹

Age of neonates (day)	No. of oocytes		No. (%) of oocytes at stage of ²					
	Used	Analysed	GV	GVBD	MI	AI	MII	Deg
10	10	10	27(57.5)	2(4.3)	3(6.4)	-	2(4.3)	13(27.6)
20	20	20	27(28.4)	8(8.4)	27(28.4)	2(2.1)	21(22.1)	10(10.2)

¹ Oocytes were matured *in vitro* for 18h and analysed by staining with DAPI.

² Abbreviations are GV : germinal vesicle, GVBD : GV breakdown, M I, II : metaphase I, II, A I : anaphase I and Deg : degenerated.

높게 나타났다. 한편, 퇴행난자의 경우는 10일령과 20일령에서 각각 27.6% 및 10.2%이었다.

고 찰

생식세포 및 수정란의 조작 기술이 발달하여, 최근 수정란의 체외생산은 주로 난소 내에 상대적으로 적은 수의 난포강이 형성된 난포 내지는 배란전 난포를 회수하여 이용하는 방법에 의존하고 있다. 하지만 포유동물의 난소는 많은 수의 원시난포와 preantral follicle이 존재하고 있다. 본 연구는 이러한 발달 초기의 난소 난포를 회수한 후 체외배양을 통하여 수정능력을 갖춘 성숙 난포를 얻고자 실시하였다.

본 실험의 결과에 의하면 배양 3일까지는 일령에 관계없이 대다수의 난포가 정상 형태를 유지하였으나 난포강은 형성되지 않는 것으로 나타났다. 난포강 형성이 뚜렷하게 관찰되는 최초 시기는 배양 6일째로서 이전의 유사한 연구 보고와도 일치하였다. Cortvrindt 등(1996)과 Ronghao 등(1995)의 경우 14일령의 마우스에서 분리한 난포를 16일간 체외배양하였을 때 난포강의 형성이 배양 6일에 최초로 관찰되었으며, 이때 LH가 첨가되지 않았음에도 이 때 estradiol, progesterone, inhibin 등의 수준이 체내 성장 난포의 경우와 차이가 없다고 보고하였다. ITS와 FSH 만을 첨가하고, LH가 결여된 배양 조건인 본 실험의 경우에서도, 난자의 rounding 및 open antrum이 형성되어 마우스 난포의 성장에 LH 보다는 FSH와 다른 tropic factor, insulin, transferrin 및 selenium 이 오히려 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

FSH의 단독 투여는 open antrum의 형성은 유도할 수 있으나 이후 granulosa cell의 분리가 일어나며 난자의 퇴행을 일으키는 것으로 보고된 바 있다 (Ronghao 등, 1995). 한편, 본 실험의 형태학적인 변화 중 나타나는 cumulus expansion과 mucification은 다른 보고(Dekel 등, 1979; Salustri 등, 1989; Chen 등, 1994)에 비추어 난자의 성숙 자체와 성선자극 호르몬에 의한 영향인 것으로 추정된다.

배양방법 역시 난포의 형태학적 성장에 영향을 미치는 것으로 보인다. Ronghao 등(1995)의 경우 배양접시 전체 공간을 이용하여 난포를 배양하였던 바, 배양접시 가장자리에서 closed antrum을 보이는 경우가 흔히 관찰되었다고 보고하였다. 본 실험의 경우와 같이 drop culture를 이용하였을 때 closed antrum을 보이는 난포가 관찰되지 않았음을 고려하면 이러한 추정이 타당한 것으로 사료된다.

비록 난포의 형태가 동일하다 할지라도 난자의 성숙이 일령에 따라 차이를 보이는 것은 다른 연구자들에 의하여도 동일한 결과가 보고된 바 있다. Eppig 등(1992)은 일령에 따라 난자의 발달능력에 차이가 있음을 제시하였고, Eppig(1979)와 Canipari 등(1984)은 핵성숙이 난자의 크기에 비례한다고 하였다. 한편, Cortvrindt 등(1996)은 14일령의 마우스에서 직경 100~139 μm 의 난포내 난자의 직경이 평균 $56 \pm 4.4 \mu\text{m}$ 였고, 10일 동안 체외배양시 난자의 직경은 $65 \pm 3 \mu\text{m}$ 였다고 보고하였는데, 이는 본 실험의 결과와 비교할 때 10일령 난자보다는 컸고 20일령 난자보다는 작았다. 이러한 차이는 마우스의 일령과 난포의 크기가 비례하는 것을 시사한다고 볼 수 있다. 하지만 난포의 완전한 성

장 및 성숙에 필요한 체외배양 조건이 갖추어지지 못한 점에 기인할 수도 있다. 따라서 사용된 호르몬의 적정 농도, 기타 요구되는 성장인자 등에 대한 연구가 요구된다.

포유동물 난자의 핵성숙은 granulosa cell과 성선자극 호르몬 등이 조절한다(Eppig & Downs, 1987). 성선자극 호르몬의 작용은 granulosa cell을 매개로 하여 난자에 작용을 하며 이 때 granulosa cell 내의 cAMP의 증가와 난자내 cAMP 수준의 감소가 유도되며 핵성숙이 일어나는 것으로 알려져 있다(Schultz 등, 1983). Granulosa cell과 난자의 상호작용은 이는 gap-junction을 매개로 한 난자의 성장 및 성숙에 필수적이다(Eppig, 1979; Brower와 Schultz, 1982). 본 실험의 결과 및 다른 연구보고의 결과에서 나타난 일령에 따른 난자의 성숙도의 차이는 곧 일령별 뇌하수체의 기능의 차이에 기인하는 것으로 여겨진다. 한편, granulosa cell과 난자의 상호작용의 중요성은 나화난자의 경우 99% 이상이 핵성숙이 GV이었음을 보여준 본 실험의 결과에서도 나타났다. 나화난자에 FSH나 LH를 처리하여도 GVBD는 일어나지 않는 것으로 보고된 바 있다(Eppig와 Downs, 1987). 체내에서의 난자의 발달은 FSH와 LH가 모두 요구되나, 체외배양 시 granulosa cell-난자의 complex가 유지되어도 FSH와는 달리 LH의 첨가 효과가 나타나지 않는 것으로 보고되었는데 이에 대한 설명은 아직 체내외의 환경적 차이에 기인하는 것으로 추측할 뿐이다.

본 연구에서는 난자의 체외 조작 기술의 발달과 더불어 요구되는 보다 많은 난자의 생산에 맞는 방법을 개발하기 위하여 미성숙 난포의 체외배양을 시도하였다. 본 실험의 결과는 난포의 체외배양에 대한 가능성을 제시하였다. 따라서 난포의 체외배양은 앞으로 체외배양 조건에 대한 개선이 이루어지면 생식세포를 활용하는 생명공학 분야에 난자의 공급 방법으로서 공헌을 할 것이다.

적 요

본 실험은 원시난포의 체외배양 체계를 확립할 수 있는 가능성을 검토하기 위해 10일과 20일령

마우스의 난소에서 분리한 난포를 체외배양하여 난포의 형태변화, 난자의 성장률 및 난자의 핵성숙 단계를 조사하여 비교하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 10일령과 20일령의 마우스에서 분리한 난포는 배양 6일째부터 난포강이 형성되었다.
2. 10일령과 20일령 마우스의 난소에서 분리한 난포의 수는 평균 21.5와 33.3개였고, 배양하기 전에 투명대를 제외한 난자의 직경은 51.85 μm 와 57.50 μm 였으나, 10 일간 배양한 후 측정된 난자의 직경은 55.95 μm 와 63.11 μm 로 증가하였다.
3. 10일령과 20일령에서 M II기까지 핵이 성숙된 난자는 각각 4.3%와 22.1%였고, GVBD기 이상은 각각 14.5%와 61.1%였다.

참고문헌

- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP and King WA. 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert. Suppl., 38:87-98.
- Boland NI and Gosden RG. 1994. Effect of epidermal growth factor on the growth and different of cultured mouse ovarian follicles. J. Reprod. Fert., 101:369-374.
- Brower PT and Schultz PM. 1982. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes ; Existence and possible nutritional role during oocyte growth. Dev. Biol., 90:144-153.
- Canipari R, Palombi F, Riminucci M and Mangia F. 1984. Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. Dev. Biol., 102:519-524.
- Carrol J, Whittingham DG and Wood MJ. 1991. Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. J. Reprod. Fert., 92:197-207.

- Chen L, Russell PT and Larsen WJ. 1994. Sequential effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion *in vitro*. Biol. Reprod., 51:290-295.
- Cortvrindt R, Simtz J and Sterirteghem AC Van. 1996. *In-vitro* maturation, fertilization, and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. Human Reprod., 11:2656-2666.
- Dekel N, Hillensjo T and Kraicer PE. 1979. Maturation effect of gonadotrophins on the cumulus-oocyte complex of the rat. Biol. Reprod., 21:191-197.
- Eppig JJ. 1979. A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cells and oocytes with granulosa cell-oocyte junctional contact maintained *in vitro*. J. Exp. Zool., 209: 345-353.
- Eppig JJ. 1992. Growth and development of mammalian oocytes *in vitro*. Arch Pathol Lab. Med., 116:379-382.
- Eppig JJ and Downs SM. 1987. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development *in vitro*; Maintenance of meiotic arrest and gonadotrophin-induced oocyte maturation. Devel. Biol., 119:313-321.
- Eppig JJ and O'Brien MJ. 1996. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. Biol. Reprod., 54:197-207.
- Eppig JJ and Schroeder AC. 1989. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. Biol. Reprod., 41:268-276.
- Eppig JJ, Schroeder AC and O'Brien MJ. 1992. Development capacity of mouse oocytes matured *in vitro*; effect of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. J. Reprod. Fert., 95:119-127.
- Gore-Langton RE and Daniel SAJ. 1990. Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle culture. Biol. Reprod., 43:65-72.
- Gosden RG. 1992. Ovarian germ cell manipulation and transplantation. Agribiotech News Infor., 4:337-340.
- Hartshorne GM, Sargent IL and Barlow H. 1994. Meiotic progression of mouse oocytes throughout follicle growth and ovulation *in vitro*. Human Reprod., 9:352-359.
- Nayudu PL and Osborn SM. 1992. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. J. Reprod. Fert., 96:349-365.
- Ronghao LI, Phillips DW and Mather JP. 1995. Activin promotes ovarian follicle development *in vitro*. Endocrinology, 136:849-856.
- Salustri A, Yanagishita M and Hascall VC. 1989. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. J. Biol. Chem., 264:13840-13847.
- Schultz RM, Montgomery R and Belanoff J. 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation; Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein in dephosphorylation in commitment to resume meiosis. Dev. Biol., 97:264-273.
- Spears N, Boland NI and Murray AA. 1994. Mouse oocytes derived from *in vitro* grown primary ovarian follicles are fertile. Human Reprod., 9:527-532.

(접수일: 2002. 11. 20/ 채택일: 2002. 12. 20)