

생쥐 난자-난구 복합체의 성숙과 분산에 관한 연구 : 세포내 cAMP 의 조절

권혁방·고선근·임옥빈  
(전남대학교 자연대 생물학과)

Studies on the Cumulus Expansion and Oocyte Maturation of Mouse  
Cumulus-Oocyte Complexes: Regulation of Intracellular cAMP Level

Hyuk Bang Kwon, Sun Kun Ko and Wook-Bin Im  
(Department of Biology, Chonnam National University)  
(1986. 11. 15 접수)

---

ABSTRACT

Cyclic AMP (cAMP) was known to play a key role in the regulation of cumulus expansion and oocyte maturation of mammalian cumulus-oocyte complexes (COC's) *in vivo* and *in vitro*. The present experiments were conducted to know how intracellular level of cAMP in these cells is controlled. Intracellular cAMP level was modulated by culturing mouse COC's with an adenylate cyclase stimulator, forskolin, a phosphodiesterase inhibitor, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), human chorionic gonadotrophin (HCG), or follicle stimulating hormone (FSH). The rate of cumulus expansion and germinal vesicle break-down (GVBD) was checked after culture and used as a biological end point.

Forskolin in the medium began to stimulate the expansion of the complexes at 1 nM and induced maximum expansion (80~90%) at 0.1~10  $\mu$ M. The expansion rate was reduced to 60% when forskolin concentration was increased to 100  $\mu$ M. Oocyte GVBD occurred normally (75~82%) in the presence of 10  $\mu$ M of forskolin, but partial suppression was appeared at 100  $\mu$ M of the drug (40%). IBMX also stimulated the expansion from the concentration of 0.01  $\mu$ M and induced full expansion (81~89%) between the concentration of 1~1000  $\mu$ M. Meiotic resumption was occurred normally under 10  $\mu$ M of IBMX, but suppressed drastically from the concentration of 100  $\mu$ M. The minimum exposing time to hormone or drugs required to trigger cumulus expansion was two minutes with HCG, 15~30 minutes with FSH and fors-

kolin, and two hours with IBMX.

The data presented here seemed to imply that intracellular cAMP level in cumulus cells is regulated by both adenylate cyclase and phosphodiesterase and cumulus expansion is induced by a peak of cAMP while meiotic arrest is maintained by continuous presence of cAMP.

## 서 론

포유동물의 여포난자는 조밀한 난구세포층으로 둘러 싸여져 있으며 핵상은 제 1 감수분열 전기에 정지되어 있다가 황체형성 호르몬(luteinizing hormone, LH)의 자극으로 배란이 일어나고 동시에 감수분열의 재개가 일어난다(Austin, 1961). 이때 난구세포층은 세포간격에 다량의 뮤코당을 분비 하면서 난구세포의 분산을 일으킴과 동시에 난구세포들은 스테로이드를 분비하는 세포로 분화가 된다(Dekel *et al.*, 1978; Schuetz and Schwartz, 1979; Eppig, 1979). 포유동물의 난자-난구복합체를 여포에서 분리해 내어 시험관에서 배양을 하면 여포난자는 뇌하수체호르몬의 도움없이 자발적으로 감수분열을 재개하여 제 2 감수분열 중기까지 진행이 되나(Pincus and Enzman, 1935) 난구세포의 분산은 자발적으로 일어나지 않는다. 그러나 배양액에 생식소자극호르몬 혹은 그 유사체들을(follicle stimulating hormone, FSH; pregnant mares serum, PMS; human chorionic gonadotrophin, HCG) 첨가하면 *in vivo*에서처럼 난구세포의 분산과 분화를 유도할 수 있으며 또한 cAMP의 유도체인 dibutyryl cAMP (dbcAMP)나 세포내 cAMP의 농도를 높이는 시약들도 역시 *in vitro*에서 난구세포의 분산을 유도하는 점으로 보아 호르몬의 작용기작에 cAMP가 제 2 전달자로 작용한다고 알려져 있다(Dekel and Kraicer, 1978; Eppig, 1979; Eppig, 1980; Hillensjo and Channing, 1980). 난자의 성숙조절과정에서 cAMP가 감수분열 억제기작에 중요한 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있으므로(Cho *et al.*, 1974; Dekel and Beers, 1978; Schultz *et al.*, 1983) 인접한 두 분화된 세포사이에 cAMP는 서로 상반된 역할을 하고 있는 셈이다(난구세포에서는 양성조절자로, 난자에서는 음성조절자로). 따라서 난자-난구세포 사이의 관계, 특히 cAMP를 중계로한 상호조절 과정이 매우 중요한 과제로 대두되고 있다(Salustri and Siracusa, 1983; Eppig and Downs, 1984; Salustri *et al.*, 1985). 본 연구에서는 난자와 난구세포내에서 cAMP가 어떻게 조절되는지를 알아보기 위하여 난자-난구복합체를 인공배양 하면서 배양액에 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin과 phosphodiesterase의 저해제인 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 첨가하여 세포내 cAMP의 농도를 간접적으로 조절하고 이들이 난자의 성숙과 난구세포의 분산에 미치는 효과를 조사하였다. 아울러 생식소자극호르몬에 의한 분산유도와 이들 시약에 의해 유도된 분산현상을 비교하여 보았다.

## 재료 및 방법

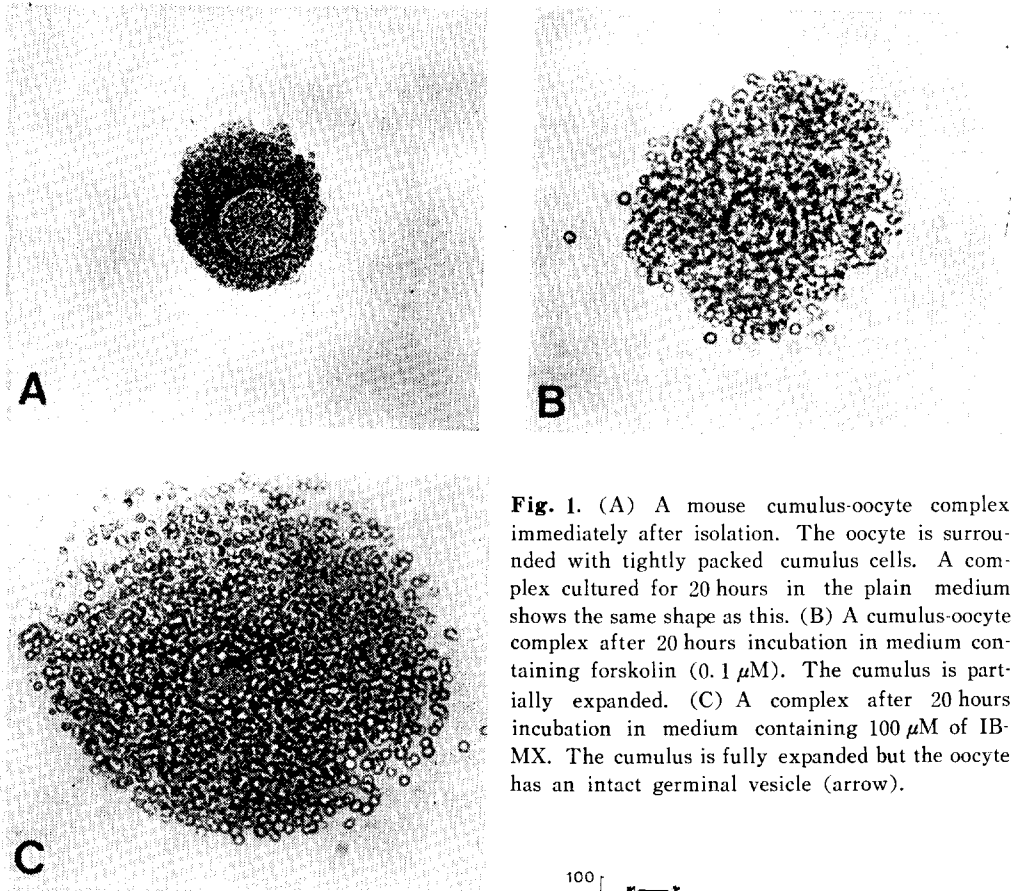
실험재료로 본 과에서 사육중인 생후 3~4 주된 ICR 암컷 생쥐를 사용하였다. PMS (3 IU)을 복강주사하여 여포성장을 촉진시킨 후 이틀 후에 난소를 떼어 내었다. 분리해낸 난소를 기본배양액인 standard egg culture medium (SECM; Biggers *et al.*, 1971)으로 옮긴

다음 해부현미경하에서 예리한 침으로 여포를 터뜨려 난구세포가 완전하게 붙어 있는 난자-난구 복합체를 골라내어 배양의 재료로 삼았다. 배양방법은 주로 Brinster의 paraffin method(1963)에 따랐다. 즉 petri dish(Sam Woo)에 10 ml의 paraffin oil을 붓고 접시바닥에 100  $\mu$ l의 배양액 방울을 만든다음 10 개 내외의 복합체를 이곳에 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 습기찬 공기를 공급받는 정온기(Forma Scientific) 내에서 일정시간 배양하였다. 배양이 끝난후 난구세포의 분산현상은 도립현미경(Nikon)하에서 직접 관찰하였고 난자의 핵상은 hyaluronidase (Sigma)로 난구세포를 제거한 다음 acetic alcohol (ethyl alcohol : acetic acid, 3 : 1)로 고정, aceto-orcein으로 염색한 후 위상차현미경(Nikon)하에서 난자의 성숙상태를 관찰하였다. 실험에 사용했던 시약중 IBMX (Sigma)는 SECM에, forskolin (Sigma)은 순수한 ethanol에 녹여서 각각 1 mM stock solution으로 제조하여 해당량을 직접 배양액에 첨가하여 사용했다. 복합체를 배양할때는 SECM에 10% fetal bovine serum (FBS, Difco)과 Hepes (12 mM)을 첨가하여 사용했다. Human chorionic gonadotrophin (HCG, Sigma)은 10 IU가 되도록 첨가하여 사용했으며 follicle stimulating hormone (FSH, from porcine pituitary, Sigma)은 0.01 IU가 되도록 첨가하여 사용했다. 실험결과와 유의성 검정은 정규분포를 이루는 두 모비율의 비교방법을 사용하였다(Snedecar and Cochran, 1967).

## 결 과

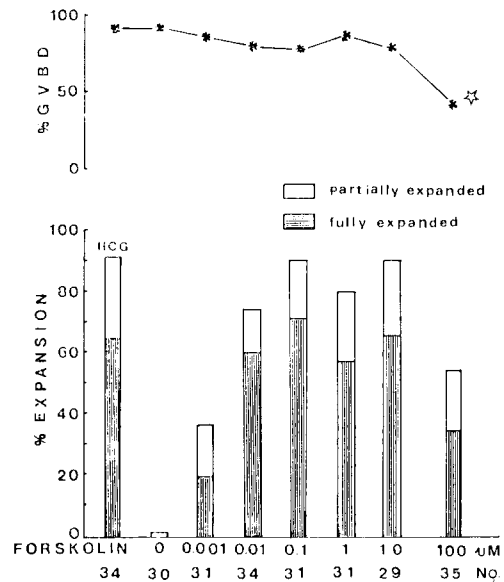
### Forskolin과 IBMX가 난구세포의 분산과 난자의 핵 붕괴에 미치는 효과

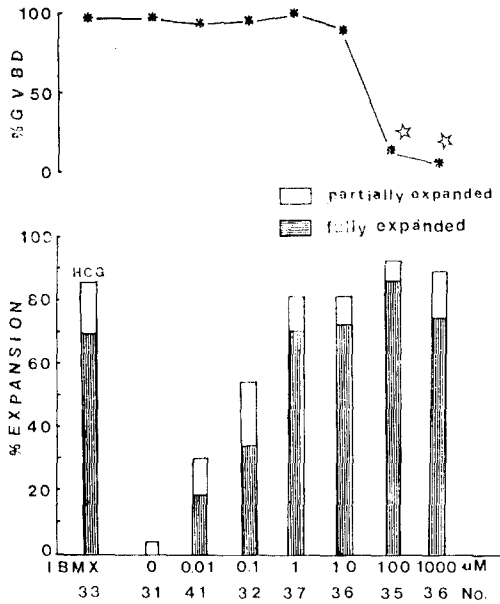
생리 난자-난구 복합체를 인공배양 하면서 배양액내에 forskolin과 IBMX를 첨가함으로써 세포내 cAMP의 농도를 간접적으로 조절하고 이것이 난구세포의 분산(부분분산+완전분산, Fig. 1 B and C)과 난자의 성숙(핵 붕괴)에 미치는 효과를 조사하였다. 배양액내의 forskolin은 1 nM의 농도에서부터 난구세포의 분산을 유도하기 시작하여(36%) 0.01  $\mu$ M에서 74%의 분산을 일으키고 0.1~10  $\mu$ M의 농도구간에서 최대의 분산효과를 나타내었다(80~90%). 이러한 분산율은 HCG(10 IU)에 의해 유도된 분산율(91%)과 차이가 없었으며 대조군에서는 전혀 분산이 일어나지 않아 intact complex (Fig. 1A)와 같았다(Fig. 2). 이들 복합체에서 난구세포를 제거한 후 난자의 핵을 관찰한 결과 forskolin의 농도가 10  $\mu$ M에 이르기까지 난자의 핵 붕괴율에 거의 영향을 나타내지 않았으나(77~90%), 100  $\mu$ M의 농도에 이르면 난자의 핵 붕괴가 유의하게 억제 되었다(40%,  $P < 0.01$ ) (Fig. 2). 이 결과들은 난구세포의 adenylate cyclase가 forskolin의 자극으로 활성화되어 cAMP를 생성하고 농도가 높아진 cAMP가 난구세포의 분산을 trigger했다는 것을 보여 주며 난자의 이 효소는 forskolin이 100  $\mu$ M에 이르러서야 비로소 cAMP를 생성하여 난자의 성숙을 억제한다는 것을 보여 주었다. 한편 phosphodiesterase의 저해제인 IBMX의 영향을 조사해본 결과 배양액내의 IBMX도 농도에 의존하여 난구세포의 분산을 효과적으로 유도하였다(Fig. 3). IBMX는 0.01  $\mu$ M에서부터 분산을 유도하기 시작하여(30%), 1~1000  $\mu$ M의 전 구간에서 81~92%의 복합체를 분산시킴으로 하여 forskolin이나 HCG에 의한 것과 같은 높은 분산율을 유도하였다. 이때 난자의 핵 붕괴는 10  $\mu$ M의 농도까지 정상적으로 일어났으나(92~100%) 100  $\mu$ M에서부터 급격히 저하되어 거의 완전히 억제되었다(6~14%,  $P < 0.01$ , Fig. 1C). 위 결과들은 난구세포나 여포난자내에 phosphodiesterase가 IBMX에 의해 억제가 되어 결과



**Fig. 1.** (A) A mouse cumulus-oocyte complex immediately after isolation. The oocyte is surrounded with tightly packed cumulus cells. A complex cultured for 20 hours in the plain medium shows the same shape as this. (B) A cumulus-oocyte complex after 20 hours incubation in medium containing forskolin ( $0.1 \mu\text{M}$ ). The cumulus is partially expanded. (C) A complex after 20 hours incubation in medium containing  $100 \mu\text{M}$  of IB-MX. The cumulus is fully expanded but the oocyte has an intact germinal vesicle (arrow).

**Fig. 2.** Effect of forskolin on the cumulus expansion and oocyte maturation of mouse cumulus-oocyte complexes (COC's) *in vitro*. Mouse COC's were cultured for 20hr in the presence of various concentration of forskolin ( $0.001 \sim 100 \mu\text{M}$ ) and their cumulus expansion and oocyte maturation (GVBD) were checked as described in Materials and Method. Percent expansion means % of the complexes showing fully and partially expanded cumulus cells per total. The number of complexes at the bottom of each bar was obtained by pooling four repeated experiments. The aster indicates that  $P < 0.01$ , when compared to control.



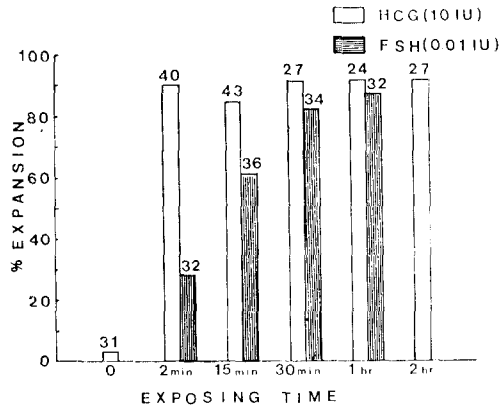


**Fig. 3.** Effect of IBMX on the cumulus expansion and oocyte maturation of mouse COC's *in vitro*. Mouse COC's were cultured for 20 hr in the continuous presence of different concentration of IBMX (0.01~1000 μM) and their cumulus expansion and oocyte GVBD were checked by an inverted microscope. Percent expansion means % of the complexes showing fully and partially expanded cumulus cells per total. GVBD of the oocyte were examined after removal of the cumulus cells. The results were obtained by pooling of four repeated experiments. The aster indicates that P<0.01, when compared to control.

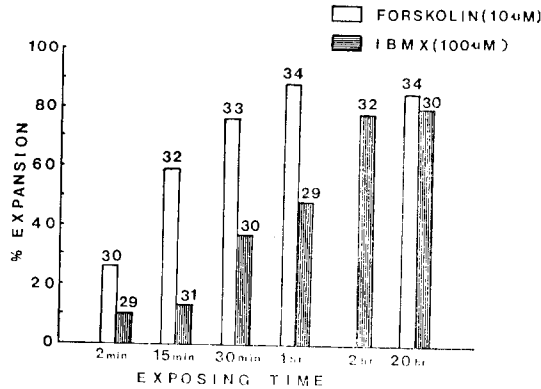
적으로 세포내 cAMP의 농도를 높여 주어 난구세포의 분산을 유도하고 동시에 난자의 성숙제개를 억제하였다는 것을 보여 주는 것이다. 이 결과에서 매우 흥미있는 점은 IBMX, 1~10 μM의 구간이다. 이 구간에서 IBMX는 난구세포의 분산을 충분히 유도하면서도 난자의 핵 붕괴에 전혀 영향을 미치지 않았다. 이것은 *in vitro*에서 생식소자극 호르몬(FSH or LH)이 cAMP를 통하여 난구세포의 분산을 유도하면서도 난자의 성숙제개를 방해하지 않는 것과 매우 유사한 현상이라 볼 수 있겠다.

**HCG, FSH, forskolin 및 IBMX가 난구세포의 분산을 유도하는데 필요한 최소 자극기간**

난구세포가 분산을 일으키려면 얼마동안 높은 농도의 cAMP를 유지해야 하는지 혹은 생식소자극 호르몬의 자극기간과 cAMP의 농도를 높이는 효소들의 자극 기간 사이에 어떠한 차이가 있는지를 보기 위해서 난자-난구 복합체들을 2분에서 2시간동안 HCG (10 IU), FSH



**Fig. 4.** Length of exposure to hormone required to stimulate cumulus expansion of mouse COC's *in vitro*. Mouse COC's were preincubated in medium containing HCG (10 IU/ml) or FSH (0.01 IU/ml) for different times (0~2 hr) and then transferred to plain medium and cultured further for up to 20 hr. The number of COC's tested was indicated at the top of each bar. The results were obtained by pooling of three repeated experiments.



**Fig. 5.** Length of exposure to forskolin or IBMX required to stimulated cumulus expansion of mouse COC's *in vitro*. Mouse COC's were preincubated in medium containing forskolin (10 μM) or IBMX (100 μM) for different times and then transferred to plain medium and cultured further for up to 20 hr. The number of COC's tested was indicated at the top of each bar. The results were obtained by pooling of three repeated experiments.

(0.01 IU), forskolin (10 μM) 혹은 IBMX (100 μM)에 노출시킨 후 즉시 보통 배양액으로 옮겨서 계속 20 시간 배양하여 보았다. 난자-난구 복합체들은 LH의 유사체인 HCG (10 IU)에 단 2분 동안 노출되었어도 20 시간까지 계속 노출되어 자극을 받았던 난구세포들처럼 최대의 분산을(90%) 일으키었으며 FSH (0.01 IU)는 15분에서 61%, 30분에서 80% 이상의 분산을 유도하였다(Fig. 4). 세포내 adenylyate cyclase를 촉진하는 forskolin은 FSH와 비슷한 pattern을 보여 주어 15분에서 59%, 30분 이후에서 부터 약 80%에 가까운 분산을 유도하였다(Fig. 5). cAMP의 분해를 막는 IBMX는 한시간에 48%의 분산율을 나타내다 2시간 이상에서야 효과적인 분산(80%)을 유도할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과들은 생식소자극 호르몬이 매우 짧은 시간에 (30분 이내) 세포내 cAMP의 농도를 높이며 한번 cAMP의 peak가 생긴 후엔 난구세포의 분산을 trigger하기에 충분하다는 것을 보여주고 있다. IBMX의 자극기간이 최소 한시간 이상으로 호르몬이나 forskolin에 의한 것 보다 오래 걸리는 것은 cAMP의 분해를 막음으로 해서 cAMP의 농도를 높이는 것이 cAMP의 생성을 직접 촉진하는 것 보다 시간이 걸린다는 것을 의미하는 것 같다.

## 고 찰

본 실험에서 난구세포내 cAMP의 생성을 촉진하거나 분해를 억제하는 시약들이 (forskolin or IBMX) *in vitro*에서 난구세포의 분산을 유도할 수 있는 것으로 보아 생쥐의 난구세포내에는 활성을 가진 adenylyate cyclase와 phosphodiesterase가 존재하며 두 효소가 cAMP의 농도를 조절하는데 중요한 역할을 한다는 것을 알았다. 또한 호르몬이나 시약들에 단기간 노출되었어도 난구세포의 분산이 유도되는 것으로 보아 분산을 trigger하는데 지속적인 높은 농도의 cAMP가 필요치 않다는 것을 알았다. 따라서 *in vivo*에서 생식소자극 호르몬(LH)의 peak가 생기면 이것이 여포내 난구세포에 cAMP의 peak를 유발하고 결과적으로 난구세포의 분산을 trigger함과 동시에 steroid를 분비할 수 있는 세포로 분화가 되도록 한다고 생각된다. 여포난자 내에 cAMP가 난자의 성숙억제기작에 중요하다는 것은 *in vitro* 실험을 통하여 이미 잘 알려진 사실이다. *in vitro*에서 난자내 cAMP의 농도를 높이든지 cAMP의 분해를 막아 안정화시키면 예외없이 난자의 자발적 성숙을 억제하게 된다(Cho *et al.*, 1974; Magnusson and Hillensjo, 1977; Sato and Koide, 1984).

본 실험에서도 forskolin 과 IBMX 모두 난자의 성숙을 억제함으로 이 사실을 뒷받침 해 주고 있다. 여포난자의 세포질에는 phosphodiesterase 가 비교적 높은 활성을 갖고 있다는 사실이 (Bornslaeger *et al.*, 1984; Jung and Cho, 1986) 이미 밝혀진 바 있다. 생쥐의 난구 세포에서도 또한 두 효소가 모두 상당한 활성을 띄고 있는 것으로 보인다. 이는 본 결과에서 forskolin이 불과 0.01  $\mu\text{M}$ 의 낮은 농도에서 부터 난구세포의 분산을 일으킬 수 있으며 (74%) IBMX 도 0.1  $\mu\text{M}$ 에서 이미 54%의 난구세포 분산율을 나타내고 있기 때문이다 (Figs. 2 and 3). 배양액내의 IBMX 가 0.1~10  $\mu\text{M}$ 의 농도구간에서는 효율적으로 난구세포 분산을 일으키지만 난자의 성숙에는 아무 영향을 미치지 않았고 forskolin 도 역시 0.01~10  $\mu\text{M}$  사이에서는 난구세포의 분산을 유도하면서 난자의 성숙을 억제하지 않았다(Figs. 2 and 3). 이러한 결과들은 난구세포의 cAMP system이 난자의 그것보다 민감하다는 것을 의미하는 것 같다. 난구세포의 분산을 trigger 하는데 필요한 호르몬의 자극기간이 HCG 는 2분, FSH 는 30 분이던 충분하고 forskolin 의 자극기간도 FSH 와 같은 것으로 보아 생식 소자극 호르몬이 일차적으로 adenylate cyclase를 통하여 cAMP 의 농도를 높인 것으로 생각되며 IBMX 가 없으면 cAMP 가 곧 세포내 phosphodiesterase에 의해 분해될 것이므로 (Salustri *et al.*, 1985), 비교적 단 기간에 생긴 cAMP 의 peak 가 분산을 유도했다고 볼 수 있겠다. IBMX 에 노출된 시간이 차차 길어질수록 (2 시간까지) 난구세포의 분산율이 비례 하여 증가하는 현상은 IBMX 가 cAMP 의 분해를 막음으로써 서서히 cAMP 의 농도를 높이었다는 것을 의미하며 호르몬이나 (FSH, HCG) forskolin 의 자극이 없이도 basal level 로 cAMP 가 세포내 adenylate cyclase 에 의해 계속 만들어지고 있다는 것을 의미한다(Fig. 5). Eppig(1980)는 생쥐 난자-난구 복합체를 FSH (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 분산을 trigger 하는데 *in vitro* 에서 2 시간의 노출기간이 필요하다고 보고하였으며 Dekel and Kraicer(1978)는 LH 로 rat 의 난구세포를 분산시키는데 15분 자극기간이 필요하다는 것을 보고한 바 있다. 본 실험 실에서도 pig 의 난구세포 분산을 유도할 때 FSH의 자극기간(노출시간)을 조사한 결과 4 시간이 필요하다는 것을 알았으며 IBMX는 분산을 유도하지 못한다는 것을 알았다(Kwon *et al.*, 1986). 따라서 분산을 trigger하는데 필요한 최소노출 시간이 종에 따라 혹은 hormone 의 종류에 따라 다르며 cAMP의 농도를 높이는 기작이 다르다는 것을 알 수 있었다. 난구 세포의 분산이 cAMP 의 peak 에 의해서 유도될 수 있는 때 반하여 난자의 성숙을 억제할 때에는 지속적으로 일정농도 이상의 cAMP 가 유지 되어야 하는 것 같다. 이는 forskolin 이나 IBMX 에 의해 감수분열이 억제되어 있는 난자들을 보통배양액으로 옮기면 즉시 분열이 재개되는 것으로 부터 알 수 있다(Sato and Koide, 1984; Schultz *et al.*, 1983). 이러한 사실은 배란이 일어날때 생식소자극호르몬이 난구세포의 cAMP 를 높이면서 난자의 성숙제거를 억제하지 않는 현상을 설명할 수 있을 것 같다. 본 실험에서는 세포내 cAMP의 농도를 직접 측정할 것은 아니므로 앞으로 정밀한 cAMP assay 를 통하여 인접한 두세포내의 cAMP 의 농도변화를 측정하고 이 변화가 난자-난구 복합체의 생분학적 기능을 조절하는데 어떻게 작용하는가를 구명하는데 많은 인구가 있어야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

생쥐의 난자-난구 복합체를 인공배양하면서 adenylate cyclase 의 촉진제인 forskolin 과

phosphodiesterase의 저해제인 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 배양액에 첨가하여 이들이 난구세포의 분산과 난자의 성숙(핵 붕괴)에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음과 같았다.

1. Forskolin은 0.001  $\mu\text{M}$ 에서부터 난구세포의 분산을 유도하기 시작하여 (36%) 0.1~10  $\mu\text{M}$  구간에서 최대의 분산율을 나타내었고 (80~90%) 100  $\mu\text{M}$ 에서는 그 효과가 줄어들었다(60%). 이때 난자의 핵 붕괴는 10  $\mu\text{M}$ 까지 정상으로 일어난다(75~80%) 100  $\mu\text{M}$ 에서 부분적으로 억제되기 시작하였다(40%).

2. IBMX는 0.01  $\mu\text{M}$ 에서부터 난구세포의 분산을 유도하기 시작하여 (30%) 1~1,000  $\mu\text{M}$ 의 전 구간에서 최대의 분산율(81~89%)을 나타내었다. 난자들은 10  $\mu\text{M}$ 의 농도까지 정상적으로 핵 붕괴를 일으키었으나(90% 이상) 100  $\mu\text{M}$  이상에서 급격히 억제되었다(14%)

3. 난구세포의 분산을 유도하는데 필요한 최소의 자극기간을 조사해 본 결과 HCG는 2분, FSH와 forskolin은 15~30분, IBMX는 2시간이었다.

위 결과로 부터 생쥐 난구세포에서 cAMP의 농도를 높이는데 adenylylase와 phosphodiesterase의 두 효소가 모두 중요한 기여를 하며 난구세포는 단 기간에 생긴 cAMP의 peak로서 분산이 유도될 수 있으나 난자의 성숙억제 과정에서는 지속적인 cAMP의 존재가 필요하다는 것을 알았다.

#### REFERENCES

- Austin, C. R., 1961. The Mammalian Eggs. Blackwell, Oxford, pp.96.
- 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.
- Bornslaeger, E. A., M. W. Wilde, and R. M. Schultz, 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cAMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev. Biol.* 105:488-499.
- Brinster, R. L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.* 32:205-208.
- Cho, W. K., S. Stern, and J. D. Biggers, 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 187:383-386.
- Dekel, N., and W. H. Beers, 1978. Rat oocyte maturation *in vitro*: Relief of cyclic AMP inhibition with gonadotropins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4369-4373.
- 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.
- Dekel, N., P. F. Kraicer, D. M. Phillips, R. S. Sanchez, and S. J. Segal, 1978. Cellular associations in the rat oocyte-cumulus cell complex: Morphology and ovulatory changes. *Gamete Res.* 1:47-57.
- Eppig, J. J., 1979. Gonadotropin 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., 1980. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 23:545-552.
- Eppig, J. J., and S. M. Downs, 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 30:1-11.
- Hillensjo, T., and C. P. Channing, 1980. Gonadotropin stimulation of steroidogenesis and cellular



- dispersion in cultured porcine cumuli oophori. *Gamete Res.* 3:223-240.
- Jung, M. W., and W. K. Cho, 1986. Effects of inhibitors on the activity of cAMP phosphodiesterase in mouse oocytes, *Korean J. Zool.* 29:79-85.
- Kwon, H. B., W. K. Lee, N. J. Kim, M. K. Kim and C. H. Ra, 1986. Regulation of cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes *in vitro*: Involvement of cAMP and calcium. (Submitted to Kor. J. Zool.)
- Magnusson, C., and T. Hillensjo, 1977. Inhibition of maturation and metabolism of rat oocytes by cyclic AMP. *J. Exp. Zool.* 201:138-147.
- Pincus, G., and E. V. Enzmann, 1935. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* 62:665-675.
- Salustri, A., S. Petrunaro, M. De Felici, M. Conti, and G. Siracusa, 1985. Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell enclosed oocytes cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 33:797-802.
- Salustri, A., and G. Siracusa, 1983. Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured *in vitro* in the presence of FSH or dbcAMP, or stimulated *in vivo* by HCG. *J. Reprod. Fert.* 68:335-341.
- Sato, E. and S. S. Koide, 1984. Forskolin and mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 230:125-129.
- Schuetz, A. W., and W. J. Schwartz, 1979. Intrafollicular cumulus cell transformations associated with oocyte maturation following gonadotrophic hormone stimulation of adult mice. *J. Exp. Zool.* 207:399-406.
- Schultz, R. M., R. Montgomery, and J. Belanoff, 1983. Regulation of mouse 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. Cochbran, 1967. Statistical Methods. pp.220-221. The Iowa State Univ. Press.