

포유류의 난자성숙과 성숙과정에서 Ca^{2+} 의 영향과 그 작용시기

성신여자대학교 생물학과

배 인 하

The Effect of Ca^{2+} and Its Specific Time in the Maturation of Mammalian Oocyte

In-Ha Bae

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sungshin Women's University, Seoul, Korea

= Abstract =

Follicular oocytes were released from the graafian follicles of ovaries from 3-4 weeks old mice. The spontaneous maturation of these follicular oocytes was inhibited by the treatment of dbcAMP and progesterone and these oocytes were cultured for 2-8hr in the Modified Hank's balanced salt solution(MHBS).

Ethylendiaminetetraaceticacid(EDTA) and calmodulin antagonist, trifluoperazine(TFP) were treated to the culture medium in order to investigate whether these chemical agents inhibit calcium uptake into the oocyte and oocyte maturation.

$^{45}Ca^{2+}$, 10-20 μ Ci/ml was added to the culture medium during the culture period. $^{45}Ca^{2+}$ uptake into the oocytes was examined whether and when various kind of oocyte maturation inhibiting agents inhibit or stimulate the influx of calcium into oocytes.

Dibutyryl cAMP and progesterone decrease $^{45}Ca^{2+}$ uptake into the oocytes and synergistic inhibiting effect of dbcAMP and progesterone was prominent at much lower dosages.

Calcium uptake into oocytes seems to be higher during first 2 hour culture period rather than next 4hr culture. After 8hr culture, calcium uptake level of the oocytes which GVBD already took place gradually approached to the level of those which were maintained at GV by the treatment of dbcAMP and progesterone.

However, $^{45}Ca^{2+}$ uptake into the GV maintained oocytes did not change at all even after 8hr culture period.

In addition, calcium chelating agent, EDTA inhibited calcium uptake into oocytes as well as nuclear maturation of oocytes. Lower dosage used in the present study did not inhibit calcium uptake as well as oocyte maturation.

서 론

포유류의 성체에서 난자의 성숙(oocyte maturation)이 일어나는 것은 주기적인 홀몬

본 연구는 성신여자대학교 학술연구조정비의 보조로 이루어졌음.

분비로 난소내 난자의 성숙이 이루어지거나 교미로 인한 유도배란을 하는 동물(induced ovulator)의 경우, 교미로 인해 황체형성홀몬(luteinizing hormone) 분비가 뇌하수체에서 일어나서 난자성숙을 일으키고 있다. 그러나 난자에서의 이런 성숙기작과 여포에서 배란기작이 처음에 어떻게 유도되는지는 아직 확실

한 정설이 없다. 난자의 성숙기작을 연구하는 방법은 난소에서 여포를 적출하여 생체외에서 조직배양하여 기작을 규명하거나 아니면 여포로부터 난자-난자세포복합체(oocyte-cumulus complex; OCC)를 꺼내어 자동적인 성숙과정을 방해하는 처리물질을 배양액에 가해서 성숙과정을 억제시킨 상태에서 여러가지 chemical agent 및 hormone 등을 처리함으로써 난자의 성숙기작을 밝히는 방법을 사용하고 있다.

첫째의 여포배양을 통한 방법은 난소에서 여포 조직을 분리한 다음 조직배양방법으로 배양하면서 hormone(LH 및 hCG; human chorionic gonadotropin) 처리를 하지 않으면 난자의 성숙이 일어나지 않으므로 in vivo system과 거의 같다. 즉, 홀몬처리가 있어야만 성숙하는 생체에서의 성숙작용과 똑같은 모형으로 연구할 수 있는 장점이 있으나 여포조직의 분리에 과다한 시간이 소모되어 실험상의 애로가 많은 방법이다.

또다른 방법은 포유동물에서 난자의 성숙기작을 연구하는 방법으로 여포내 난자-난구복합체를 꺼내어 적당한 배양액에 넣고 여기에 다 난자의 자동성숙과정(spontaneous maturation)을 억제시키는 홀몬이나 화학적 성분을 처리하여 자동성숙을 억제시킨 상태에서 성숙기작을 연구하는 것으로 많은 수의 난자를 취급할 수 있으나 난자의 생육환경을 무시한다는 단점이 있다.

포유류에서 여포내 난자가 성숙하기 전의 상태는 제 1감수분열 전기의 복사기(diplotene stage of 1st meiosis)에 정지되어 있으며 홀몬을 처리하거나 성숙을 억제시키고 있는 chemical agent를 중화시키거나 제거하는 방법으로 성숙을 유도할 수가 있다.

여포내의 난자-난구세포복합체를 적당한 배양액 속으로 끌어내어 배양하면 홀몬처리 없이도 자동적인 성숙을 하지만 이 배양액에 Ca^{2+} 의 존재가 반드시 요구되고 있는 점으로 보아 Ca^{2+} 이 난자성숙에 중요한 구실을 하고 있다는 것이 많은 사람들에 의해 밝혀졌다. (Bae, 1981; Paleos & Powers, 1981; Powers & Paleos, 1982; De Felici & Siracusa, 1982; Maruska et al., 1984; Bae & Channing, 1985)

그러나 여포를 분리하여 조직배양을 할 때 LH나 hCG 처리없이 난자가 성숙되지 않고 있던 것이 어찌서 여포를 바늘로 찔러 홀몬이 없는 배양액속으로 꺼내기만 하면 난자의 자

동성숙(난자의 핵막붕괴과정)이 유도되고 있느냐 하는 문제에 대해 여러가지 학설이 대두되어 왔다. 여포속의 steroid hormone이 난자성숙을 억제하고 있다던가(McGaughey, 1977) 여포액내 난자성숙억제물질(oocyte maturation inhibitor, small peptide)의 존재(Tsafri et al., 1976), 난자-난구세포 복합체내의 cAMP의 농도증가(Cho et al., 1974), 혹은 여포액내에 hypoxanthine이 다량 존재하고 있으며(2-4mM) adenosine(0.35-0.70mM)도 존재하고 있어 이들 purine계열이 난자성숙에 주요한 억제물질이라고 주장하고 있다(Downs et al., 1985; Eppig & Downs, 1987; Sirad & First, 1988; Warikoo & Bavister, 1989; Tornell et al., 1990; Downs, 1993). 이외에도 LH나 hCG가 여포의 permeability를 증가시켜줌으로써 이로인해 적절한 ion의 influx가 난자세포내로 일어나 membrane potential을 변화시켜주는 것이 주원인이라고 하는 여러학자들의 주장들이 있다(Bae & Cho, 1982, review).

난자성숙이 일어나는 가장 첫 징후는 난자의 핵막붕괴과정(germinal vesicle breakdown; GVBD)이다. 어떻게 핵막붕괴과정이 유도되느냐 하는 것이 난자성숙기작을 연구하는 제일 첫 과제이며 이것이 유발되고 나면 난자는 제 2감수분열의 중기까지 감수분열이 계속된다.

이중 여포의 투과도 증가로 인한 난자-난구세포복합체에서의 Ca^{2+} 의 증가현상이 처음으로 발견된 이후(Batta & Knudson, 1980) 난자의 투과도 증가로 인한 Ca^{2+} 의 influx가 난자의 핵막붕괴를 유도하는 가장 첫 징조가 아닌가 하는데에서 연구가 시작되었다. 한편 이보다 이전 포유류가 아닌 양서류에서의 Ca^{2+} 에 의한 핵막붕괴과정에 대한 연구가 있었다(Kostellow & Morrill, 1980).

Ca^{2+} 의 중요성은 De Felici & Siracusa (1982)에 의해 배양액에 Ca^{2+} 이 없으면 생쥐 난자는 2시간 정도에서 퇴화하기 시작한다고 한 보고에서 더욱 중요시되고 있다.

이와같이 Ca^{2+} 은 난자의 성숙과도 관련이 있고 난자의 생존에까지 지대한 영향을 미치고 있다는 점에서 Ca^{2+} 에 대한 연구가 많이 진척되었다.

Batta and Knudson(1980)은 쥐에서 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin) 주사후 50시간에서 oocyte-cumulus complex에서의 Ca^{2+} 농도증가현상을 관찰하였으며 이 시간은

여포내에서 난자의 GVBD가 일어나는 시간과 일치하고 있다. 이와같은 결과로 보아 In Vivo에서 LH에 의한 난자성숙 및 배란과정 초기의 변화는 LH에 의한 세포벽의 투과도 변화에 이어 난자-난구세포복합체에서 Ca^{2+} 의 증가(Carroll & Swaan, 1992)로 인한 난자의 membrane depolarization(막 탈분극)이 일어나(Powers, 1982) 난자내 Ca^{2+} 증가현상이 나타나고 이것이 핵막붕괴과정을 유도하는 것이 아닌가 하는 추정이 가능하다. 이러한 점으로부터 보아 난자내 Ca^{2+} 증가현상과 핵막붕괴과정이 밀접한 관계에 있음은 부인할 수가 없으며 난자성숙과정에서 Ca^{2+} 의 역할은 규명해 볼 가치가 충분히 있다. 또한 난자뿐 아니라 모든 세포는 세포질내 free- Ca^{2+} 의 증가현상이 있음다음 세포분열이 일어나고 있으며(Boynton et al., 1977, Chafouleas et al., 1984) hormone의 signal transduction과정에서 phospholipid specific phospholipase C의 작용으로 inositol triphosphate가 유리되어 calcium저장고인 소포체(endoplasmic reticulum)에 작용하여 Ca^{2+} channel을 열어주고 cytoplasmic Ca^{2+} 증가를 유도하여 Ca^{2+} 농도가 높아질 때 Ca^{2+} -activated K^+ channel이 open되어 K^+ 의 유출로 membrane은 depolarization을 나타내는 것이 아닌가 추정하고 있다(Powers, 1982).

이와같이 Ca^{2+} 은 난자성숙에 분명히 관련이 있으며 본 연구에서는 Ca^{2+} 이 어떤 시기에 작용하여 어떤 기작으로 난자성숙에 관여하고 난자의 viability를 유지하고 있는지를 규명코자 하였다.

재료 및 방법

1. 난자수집

생후 21일된 ICR계 생쥐암컷을 경추골 파열방법으로 도살시킨 후 복강을 열고 난소를 제거한 후 양쪽 난소를 dbcAMP 100 μ g/ml이 들어있는 MHBS(Modified Hank's Balanced Salt Solution) 배양액(pH 7.3-7.4; osmolarity 280mOsm, Bae & Foote, 1980)에 넣어 난소주위의 지방조직과 혈액응고성분을 제거한 후 다시 2-3회 세척과정을 거친다. 세척이 끝난 난소는 해부현미경(Wild M5A, Swiss) 200 \times 하에서 graafian follicle만을 미세한 바늘로 찢어 여포속의 난자-난구세포 복합체를 여포밖의 기본배양액으로 꺼낸다.

이렇게 여포로부터 배양액속으로 꺼낸 난자-난구세포복합체를 가늘게 뽑은 pasteur pipette(내경 80 μ m정도)으로 기본 배양액내에서 몇번 흡입과 내뿜기를 반복하여 난자주위의 난구세포를 전부 제거한다. 이렇게 난구세포를 제거한 난자에서 건강한 난자(healthy germinal vesicle을 갖고 있는 난자)만을 선택하였다. 이렇게 선정된 난자는 새로운 기본배양액이 들어있는 시계접시에서 세척한 다음 난자는 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO_2 와 95% 공기가 공급되며 100% 습도가 유지되는 배양기에서 2-8시간동안 35 \times 10mm Falcon 플라스틱 petri 접시에 2ml의 지정된 배양액이 들어있는 배양액이나 50 μ l의 배양액이 들어있는 mineral oil 층 밑에서 배양하였다.

2. 배양액

배양액은 MHBS(Bae & Channing, 1985)을 기본배양액으로 하였고 최근에 다시 pH를 고정시키기 위해 phosphate buffer를 Henderson-Hasselbalch식에 넣어 다시 교정하였고 $NaHCO_3$ 의 양도 25mM로 증가시켰다. 난자의 자동성숙을 방지하기 위해(Cho et al, 1974) dbcAMP 100 μ g/ml을 넣은 배양액을 난소로부터 여포를 터뜨릴 때의 operation medium으로 사용하였다.

배양액은 대체로 280mOsm에서 조정하여(μ Osmette, Mass, U.S.A.) 사용하였다.

3. 첨가성분

첨가성분으로는 $^{45}Ca^{2+}$ (NEN, Specific activity 4-50mCi/mg, Boston, Mass, U.S.A.)를 10-20 μ Ci/ml로 첨가하였으며 MHBS에서 $^{45}Ca^{2+}$ 의 흡착을 막기 위하여 BSA대신 Ficol(MW 400,000, Sigma, St Louis, Mo, U.S.A.)를 1mg/ml 농도로 BSA대신 사용하였다.

$^{45}Ca^{2+}$ 가 들어가지 않는 배양액에는 0.4% BSA를 사용하였다. 또한 progesterone stock sol.은 progesterone 1mg/ml(Sigma)를 ethanol(100%)에 녹여서 휘발시킨 후 체적으로 0.1%가 되지않게 조정하였고 dbcAMP(2mg/ml)의 stock sol.을 PBS(phosphate buffer sol.)에 녹여서 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다가 실험직전에 녹여 첨가하였다. Progesterone stock sol.은 멸균시 millipore filter에 흡착되는 것을 방지하기 위하여 millipore filtration으로 멸균된 배양액에 직접 첨가하여 20 μ g/ml이 되게 하였

다. 한편 dbcAMP의 첨가는 dbcAMP stock sol.을 기본배양액에 넣은 다음 100 μ g/ml로 하였다.

Calmodulin의 antagonist인 trifluoperazine은 바로 stock solution으로 만들어 희석하는 방법으로 사용하였고(역시 calmodulin antagonist인 phenothiazine은 oil soluble한 성질이 있어 배양액의 cover로 mineral oil을 사용하기 때문에 사용하지 않았음) EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)는 1.71mM 농도의 stock solution으로부터 희석하여 사용하였다.

4. 배양후 난자회수 및 scintillation counting

배양후 난자회수는 난자성숙억제제의 처리로 핵막붕괴과정이 억제되어 핵막을 지닌 난자와 자동적으로 성숙한 대조군의 그룹에서 똑같은 수의 난자만을 회수하였다. 난자회수시 난자의 소실이 어느 그룹의 한쪽에서 있었던 그룹은 실험상의 손실로 처리하였다.

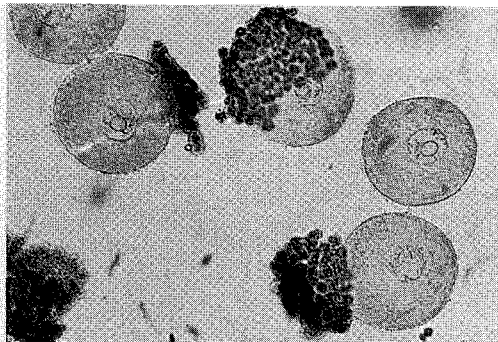


Fig. 1. 3-4주된 생쥐여포에서 분리한 난자와 난구세포, GV가 뚜렷이 보이고 있다.

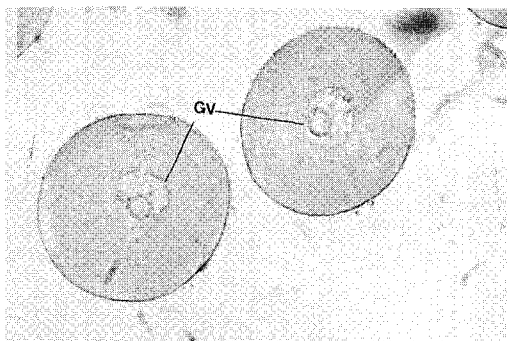


Fig. 2. EDTA 1.71mM이 함유된 배양에서 4시간 배양후 난자 GV가 여전히 뚜렷이 보이고 있다.

배양후 이렇게 회수된 난자는 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 가 들어 있지 않은 새로운 기본배양액으로 3회 세척하였으며 이때 난자회수시 함께 회수되는 기본배양액은 5 μ 를 넘지않게 극히 세심한 주의를 해서 회수하였다. 이렇게 회수된 난자를 scintillation vial에 blowing out방법으로 넣은 후 1ml의 D.W.(distilled water)를 넣은 후 sonicator(U.S.A.)로 1분간 sonication하였으며 다시 2-3분후 다시 sonication하였다. 2회의 sonication과정으로 난자의 막과 세포질내의 세포내 미세기관이 완전히 break-down되었다. 다음 sonication된 난자는 liquid scintillation counting(Packard, Model 3385, Downersgrove, Ill. U.S.A., 연세대 의대 중앙연구소)을 5분간 행하였으며 이를 8회 반복하여 counting하였다. 총 8회의 scintillation counting의 평균치를 구하여 counting per minute(cpm)를 다음과 같이 산출하였다. Blank counting은 기본배양액에서 난자를 3회 세척한 기본배양액을 5분간 약간씩 흔들면서 방치한 후 이 마지막 세척액인 기본배양액에서 5 μ 를 취하여 이것을 Blank counting으로 사용하였다.

8회의 scintillation counting에서 평균치와 Blank counting에서 얻은 역시 8회의 scintillation counting 결과의 평균치를 이용하여 난자당 cpm은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Cpm/oocyte} = \frac{\text{cpm of experimental group} - \text{cpm of } 5\mu \text{ of final washing medium}}{\text{number of oocytes}}$$

Cpm/oocyte는 난자당 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake의 값으로 사용하였다. 이와같은 방법은 Bae & Kang (1991)의 방법을 원용한 것이다.

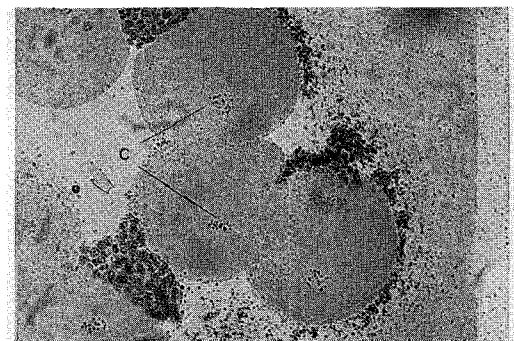


Fig. 3. MHBS배양에서 4시간 배양된 난자 및 난구세포, GVBD가 일어났으며 diakinesis 시기에 있는 난자. C:chromosomes.

5. 난자의 핵상관찰

난자의 핵상관찰은 2.5시간 및 4시간 배양 그룹으로 나누었으며 배양후 2-3회의 세척과정후 slide glass위에 wax로 정사각형의 구석에 cone모양을 만들고 소량의 세척액과 난자를 얹어놓고 25mm cover glass로 난자가 약간 찌그러지도록 누른다음 고정액(acetic acid: ethanol=3:1)에서 2시간 이상 고정시킨다. 고정후 0.1% acetoorcein염색액으로 염색하여 nail manicure로 sealing하여 간섭위상차도립현미경(interference phase contrast microscope:Leitz, Germany)하에서 핵상을 관찰하였다.

6. 통계처리

Calcium uptake data는 student t-test를 사용하여 유의성검정을 하였으며 표 4와 5의 검정방법은 ANOVA방법을 사용하여 검정하였다.

결 과

표 2는 생쥐난자에서 progesterone 및 dbcAMP에 의한 난자성숙억제과정과 이들의 복합적 작용을 본 것이다. 4시간 배양에서 대조군에서는 모두 GVBD가 일어났다. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake는 난자당 1.46 ± 0.15 로 나왔으며 난자

성숙억제제로 사용한 progesterone과 dbcAMP 처리군과 이들의 상승작용을 본 progesterone 및 dbcAMP를 각 1/10의 농도로 처리한 그룹에서는 난자당 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 각각 0.62 ± 0.09 ; 0.89 ± 0.18 및 0.84 ± 0.09 로 나타났으며 이들의 t-test 결과는 대조군과 유의한 차이가 있음을 보여주고 있다(대조군에 비하여 43%, 60% 및 58%만이 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake를 나타내었다).

표 2에서 표시하지는 않았지만 대조군에서는 4시간 배양후 90%의 GVBD과정을 나타내었다. 그러나 실험군에서는 progesterone 처리 그룹이나 dbcAMP 처리그룹 및 두가지 억제제의 상승작용을 본 그룹에서 10%미만이 난자만이 GVBD를 나타내었으며 나머지는 완전한 핵막을 가지고 있었다.

실험군에서 progesterone 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서는 난자퇴화현상이 아주 다양하게 나타났다. 이들 억제제를 복합적으로 처리한 그룹에서도 억제제 각각의 처리군과 비슷하여 상승작용은 관찰되지 않았다.

난자의 성숙이 일어난 난자와 난자성숙 억제제의 처리로 난자성숙이 억제된 난자에서의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake를 시간별로 관찰한 결과 난자배양의 4시간까지는 GVBD가 일어난 대조군과 GV상태로 유지된 실험군과 현저하게 유의한 차이가 있었다. 즉 대조군에서의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ up-

Table 1. New modified Hank's balanced salt solution

| Component(M.W.) | Amount(g/l) | mM | mOsm |
|--|-------------|--------|--------|
| NaCl (58.54) | 5.7690 | 98.7 | 197.4 |
| KCl (74.55) | 0.4 | 5.3655 | 10.731 |
| MgSO ₄ (120.4) | 0.0977 | 0.8118 | 0.6236 |
| Na ₂ HPO ₄ (142.0) | 0.0477 | 0.3358 | 0.6716 |
| KH ₂ PO ₄ (136.09) | 0.0209 | 0.1533 | 0.3066 |
| NaHCO ₃ (84.01) | 2.101 | 25.009 | 50.018 |
| CaCl ₂ (110.99) | 0.1899 | 1.711 | 5.133 |
| Glucose (180.16) | 1.0 | 5.551 | 5.55 |
| Sodium lactate (112.07) | 0.2802 | 2.5 | 5.0 |
| Sodium pyruvate (110.00) | 0.033 | 0.3 | 0.6 |
| Phenol red | 0.01 | | |
| Penicillin G. Potassium salt | 0.064 | | |
| Streptomycin sulfate | 0.052 | | |
| BSA | 4.0 | | |

277.0338

BSA: Bovine Serum Albumin.

Table 2. ^{45}Ca uptake by mouse oocytes whose maturation were inhibited¹⁾

| Treatment | Stage of oocytes | No. of oocytes | cpm per oocyte \pm SEM |
|---|------------------|----------------|--------------------------|
| Control | GVBD | 49 | 1.46 \pm 0.15 |
| dbcAMP(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) | GV | 49 | 0.62 \pm 0.099** |
| Progesterone(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) | GV | 49 | 0.89 \pm 0.18* |
| dbcAMP(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + progesterone(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) | GV | 49 | 0.84 \pm 0.09* |

1) Total culture period is 4 hours. Oocytes which underwent GVBD were selectively collected after a 4-hour culture. Oocytes with GV were selectively collected after a 4-hour culture.
*, **: significantly different from the control value, $p < 0.05$, $0.05 < p < 0.01$.

Table 3. ^{45}Ca uptake by mouse oocytes exposed to isotope at different times during the culture period

| Treatment of dbcAMP(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + progesterone (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) | Culture period(hrs)(a) | | | Stage of oocytes | No. of oocytes | cpm per oocytes \pm SEM |
|--|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|------------------------------|
| | Total | - $^{45}\text{Ca}^{2+}$ | + $^{45}\text{Ca}^{2+}$ | | | |
| - | 2 | 0 | 2 | GVBD | 35 | 1.78 \pm 0.29 |
| + | 2 | 0 | 2 | GV | 35 | 1.37 \pm 0.17* |
| - | 3 | 1 | 2 | GVBD | 29 | 1.18 \pm 0.22 |
| + | 3 | 1 | 2 | GV | 29 | 0.88 \pm 0.05* |
| - | 4 | 2 | 2 | GVBD | 33 | 1.22 \pm 0.14 |
| + | 4 | 2 | 2 | GV | 33 | 0.94 \pm 0.04** |
| - | 4 | 0 | 4 | GVBD | 46 | 1.91 \pm 0.22 |
| + | 4 | 0 | 4 | GV | 46 | 1.30 \pm 0.14** |
| - | 8 | 4 | 4 | GVBD | 20 | 1.20 \pm 0.11 |
| + | 8 | 4 | 4 | GV | 20 | 1.22 \pm 0.05 |

(1); The concentration of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ is 20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ in culture medium, (b); *, $p < 0.05$, **, $0.05 < p < 0.01$.

Table 4. Effect of EDTA concentration on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in mouse follicular oocytes cultured for 2.5 hours^a

| Experimental group | No. of oocytes | Mean \pm SE |
|--------------------|----------------|---------------------|
| Control | 92 | 0.2473 \pm 0.0186 |
| EDTA 1.71mM | 106 | 0.094 \pm 0.0056* |
| EDTA 0.855mM | 86 | 0.2177 \pm 0.0680 |
| EDTA 0.428mM | 82 | 0.181 \pm 0.0271 |
| EDTA 0.214mM | 93 | 0.3043 \pm 0.0333 |

a; $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$) was treated. ANOVA, *, P Value = 0.0001 $p < 0.0001$.

take는 현저하게 높았다. 표 3에서 GVBD가 일어나는 시간인 2시간 배양에서 보면 대조군에서 현저한 uptake증가가 나타났으며 이런 경향은 3시간 배양에서 줄어들었다가 다시 4시간 배양에서 다시 증가하는 양상을 보이고 있다. 그러나 배양시작후 처음 1-2시간에서 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -free에서 배양하다 다시 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 이 포함

Table 5. Effect of EDTA concentration on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in mouse follicular oocytes cultured for 4 hours^a

| Experimental group | No. of oocytes | Mean \pm SE |
|--------------------|----------------|----------------------|
| Control | 202 | 0.2594 \pm 0.00769 |
| EDTA 1.71mM | 212 | 0.0529 \pm 0.0043* |
| EDTA 0.855mM | 190 | 0.2064 \pm 0.0241 |
| EDTA 0.428mM | 175 | 0.3083 \pm 0.0490 |
| EDTA 0.214mM | 190 | 0.3044 \pm 0.0587 |

a; $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$) was treated. ANOVA, *, P Value = 0.0245 $p < 0.05$.

된 배양액으로 이전시켜줄 경우 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 이 줄어드는 경향을 보이고 있다. 8시간 배양의 경우 대조군과 실험군 사이에 아무런 차이가 없다. 즉 GVBD가 일어나는 2시간에서 실험군과 대조군의 비교에서 유의한 차이도 있기는 하지만 실험군에서도 상당량의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 일어나고 있다. 배양시작후 처음 1시간 및

Table 6. Effect of EDTA concentration on maturation of mouse follicular oocytes cultured for 2.5 hours

| Nuclear phase | Experimental groups | | | | |
|---------------|---------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | Control | EDTA 1.71mM | EDTA 0.855mM | EDTA 0.428mM | EDTA 0.214mM |
| GV | 42(75) | 46(60) | 41(65) | 31(55.4) | 29(35.4) |
| Diak | 12(21.4) | 28(36.4) | 17(27) | 24(42.9) | 39(47.6) |
| MI | 1(1.8) | 2(2.6) | 4(6.3) | 1(1.8) | 6(7.3) |
| Deg | 1(1.8) | 1(1.3) | 1(1.6) | | 8(9.8) |
| Total | 56 | 77 | 63 | 56 | 82 |

() ;percentage, GV;germinal vesicle, Diak;diakinesis, MI;metaphase I, Deg;degeneration.

Table 7. Effect of EDTA concentration on maturation of mouse follicular oocytes cultured for 4 hours

| Nuclear phase | Experimental groups | | | | |
|---------------|---------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | Control | EDTA 1.71mM | EDTA 0.855mM | EDTA 0.428mM | EDTA 0.214mM |
| GV | 20(34.5) | 36(78.3) | 32(53.3) | 54(57.4) | 56(59.6) |
| Diak | 36(62.1) | 10(21.7) | 24(40) | 22(23.4) | 24(25.5) |
| MI | 2(3.4) | | 4(6.7) | 18(19.1) | 14(14.9) |
| Total | 58 | 46 | 60 | 94 | 94 |

() ;percentage, GV;germinal vesicle, Diak;diakinesis, MI;metaphase I.

Table 8. Effect of trifluoperazine on maturation of mouse oocytes cultured for 4hr

| Nuclear phase | Experimental groups | | | | | |
|---------------|---------------------|--------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|
| | Control | dbcAMP | 0.1 μ M TFP | 1 μ M TFP | 10 μ M TFP | 100 μ M TFP |
| GV | 6(10) | 93(82) | 6(6) | 9(13) | 15(38) | 6(13) |
| Diak | 51(85) | 18(16) | 42(88) | 57(83) | 24(62) | 39(87) |
| MI | | 3(3) | | | | |
| Deg | 3(5) | | | 3(4) | | |
| Total | 60 | 114 | 48 | 69 | 39 | 45 |

() ;percentage, GV;germinal vesicle, Diak;diakinesis, MI;metaphase I, Deg;degeneration.

2시간에서 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -free 배양액에서 배양하다 다시 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 을 포함한 배양액으로 이전시켜 배양할 경우 uptake가 다소 떨어지고 있지만 4시간 배양은 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 가 포함된 배양액에서 계속할 경우 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake는 다시 올라가 2시간 배양후 maturation inhibitor를 처리했을 때의 실험군 정도로 올라가고 있다. 이것은 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 을 포함하지 않은 배양액에서 1-2시간 배양할 경우 해당되는 시간만큼 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake는 일어나지 않는다는 결과가 된다. 즉 maturation inhibitor를 처리할 때 2시간 배양이나 8시간 배양에서의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 유의한 차이를 나타내지 않고 있다는 것은 maturation inhibitor

자체가 calcium uptake를 저지하고 있다는 결과가 된다.

표 4에서 EDTA의 농도를 서로 달리한 상태에서 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 uptake는 2.5시간 배양했던 group에서 볼 때 대조군에 비해 현저히 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 줄어들고 있다. 그리고 이러한 uptake가 줄어드는 경향은 EDTA의 농도감소에 따른 차이를 나타내지 않는다. EDTA 0.855mM처리 이하는 실제로 대조군과 유의한 차이가 없다(p value=0.0245).

한편 배양시간을 4시간으로 연장하였던 표 5에서도 EDTA 1.71mM 처리에서는 대조군에 비해 현저한 차이가 있으나 EDTA 0.855mM

처리 이하에서는 대조군과 큰 차이가 없이 나타나고 있다(p value=0.0001).

난자의 핵상관찰로는 표 4 및 5에서 GVBD가 일어나는 시간이 2시간을 기준으로 하여 2.5시간 배양결과와 4시간의 배양결과를 보았다(표 6, 7). 핵상변화를 2.5시간 배양에서 볼 때는 대조군과 실험군과의 특별한 차이가 없는 것 같았으나 4시간 배양결과에서는 EDTA 1.71mM군과 대조군과의 사이에 현저한 차이가 있어 보였으나 그외의 실험군과 대조군 간에는 차이가 없어 보였다. 이와같은 경향에서 calmodulin inhibitor인 trifluoperazine 처리에는 4시간 배양만을 택하여 핵상 관찰하였다(표 8). 배양결과를 보면 대조군과 별 차이가 없어보이며 농도에 따른 차이도 전혀 없다. 그러나 maturation inhibitor를 처리한 dbcAMP 그룹의 성숙도는 대조군과 현저한 차이를 보이고 있다.

고 찰

포유동물의 여포내 난자를 여포밖으로 꺼내어 적당한 배양액에서 배양할 경우 자동적인 성숙이 일어나지만 여포를 배양할 경우 적절한 홀몬처리 없이는 난자의 성숙이 일어나지 않는다. 이와같이 난자를 여포밖으로 꺼내어 배양할 경우 일어나는 난자의 자동적인 성숙은 난자의 cAMP release로 인해 난자내의 cAMP농도가 감소된다는 가설에서(Tsafirri et al., 1973) 출발하여 cAMP와 유사한 구조를 갖고 있는 dbcAMP를 배양액에서 처리함으로써 처음으로 자동적 성숙과정을 억제시킬 수 있음을 발견하였다(Cho et al., 1974).

본 연구의 표 2에서 볼 때 대조군과 dbcAMP 처리군에서 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake에 현저한 차이가 있음을 볼 수 있다. dbcAMP가 난자성숙과정을 어떠한 기작으로 억제하고 있는지는 잘 알려져 있지 않지만 본 연구에서 보면 분명히 calcium의 uptake를 방해하고 있으며 이와같은 calcium uptake를 방해하는 작용이 통계처리결과 아주 유의한 차이를 나타내고 있어 dbcAMP가 난자성숙을 억제하는 것이 난자내로의 calcium influx 자체를 막음으로 하여 난자성숙억제의 첫 과정을 나타내고 있다고 확인되었다. cAMP가 난자성숙에 필요한 Ca^{2+} 의 influx 자체를 막음으로 하여 LH의 난자성숙분열 재개를 triggering 하기전에는 GV arrest의 주원인

이 되고 있으나 LH에 의한 여포막세포 난구세포등의 투과도 증가에 따라 Ca^{2+} influx가 일어남으로써, 아니면 hypoxanthine등의 난자억제환경의 여포로부터 벗어남으로써 자동적인 Ca^{2+} influx가 일어날 때(Carroll & Swann, 1992) GV arrest를 벗어날 수 있을 것이라는 추론이 가능하다. 물론 난자에서 hypoxanthine 처리로 Ca^{2+} influx를 방해하는 현상은 early 2-cell mouse embryo에서 adenosine이나 hypoxanthine 처리로 2-cell block을 유지하고 있는 생쥐배에 cytoplasmic Ca^{2+} elevation을 유도하고 있는 Ni^{2+} 처리로 2-cell block이 overcome된다(Bae & Yoon, et al., 1993; Bae, 1994)는 사실은 2-cell block에만 해당되는 것이 아니라 난자에도 해당되는 것으로 보여진다. 단 hypoxanthine 처리로 Ca^{2+} 의 influx가 방해되고 있다는 증명은 앞으로의 계획으로 진행해야 할 과제이다.

또 한편으로 농도의 hypoxanthine이 GV arrest를 하고 있는 여포내 환경에서 난자를 여포밖으로 꺼내면 난자성숙을 억제하고 있는 환경으로부터 벗어남으로써 홀몬처리 없이도 자동성숙이 일어나는 기작으로 설명할 수가 있다고 추정된다. Powers(1982)는 생쥐난자에서 난자가 성숙하고 있지 않을 때인 GV상태 때의 membrane potential이 -46mV 이며 GVBD(germinal vesicle breakdown)가 일어날 때 -31mV 로 증가했다가 제 1감수분열을 끝내고 극체를 형성할 때 -17mV 로 증가한다고 하고 있다. 난자에서 Membrane potential이 polarization에서 depolarization으로 변할 때의 차이는 경우 30mV 정도 차이 밖에 없다. 또한 dbcAMP $100\mu\text{g/ml}$ 의 처리로 난자성숙을 억제시키고 있는 GV상태의 난자의 membrane potential은 hyperpolarization상태(-51mV)를 나타내고 있으며 난자의 배양시간과는 무관하다고 하고 있다. 즉 dbcAMP처리로 8시간을 배양한다 하더라도 핵막붕괴가 일어나지 않아 GV상태를 여전히 계속하고 있는 난자의 membrane potential은 hyperpolarization상태를 유지하고 있다고 추정된다. 본 연구의 표 3에서도 분명히 8시간 배양후에도 난자성숙이 억제되어 남아있는 난자나 2시간 배양후 난자성숙이 억제되어 GV상태로 남아있는 난자의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake에 별다른 차이가 없는 것은 Powers(1982)의 견해와 일치하고 있다.

또 Powers & Paleos(1982)의 결과는 본 실험

협의 dbcAMP로 성숙이 억제된 GV상태의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake와 GVBD가 일어난 난자의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake 결과와 일치하고 있다. dbcAMP는 calcium의 uptake를 저지하고 있으며 또한 dbcAMP의 존재하에서는 GVBD가 일어나려면 그만큼 높은 농도의 extracellular Ca^{2+} 이 요구되고 있다는 점을 증명하였다(Poweres & Paleos, 1982). 이점에서 난자의 자동성숙을 억제할 수 있는 dbcAMP의 농도는 난자내 Ca^{2+} 의 농도의 저하시킬 수 있는 농도라 할 수 있으며 이는 dbcAMP가 난자의 Ca^{2+} -pump를 자극시킴으로써 난자세포질내 Ca^{2+} 의 농도저하를 가져와 난자세포내 cytoplasmic free- Ca^{2+} 의 농도가 어느 한정선 이하로 머물고 있어 난자 성숙이 억제되고 있다고 해석할 수 있다. 즉 본 실험의 표 2 및 표 3에서 dbcAMP에 의해 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 감소하는 것은 난자막에서 influx 과정으로 들어오는 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 을 그만큼 많이 Ca^{2+} -pump가 efflux로 내보내기 때문이라고 설명할 수가 있다. 또한 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake를 시간상으로 살펴본 표 3에서 GVBD가 일어나는 최초 2시간에서 calcium influx가 가장 현저하게 나타나고 있는데 이와같은 현상은 Carroll & Swaan(1992)이 생쥐여포로부터 난자를 배양액으로 꺼내면 1-3시간동안 난자내에서 Ca^{2+} oscillation현상이 일어나며 이때 GVBD가 일어난다는 주장과 일치하고 있기도 하다. 배양 2시간 이후부터는 이러한 influx가 초기 2시간보다 그 속도가 느려지고 있음을 볼 수 있다. 이 현상도 Carroll & Swaan(1992)의 주장과 일치하고 있다. 그리고 배양 4시간 이후에서는 calcium uptake의 속도가 아주 느려져 배양 8시간 정도에서는 GVBD가 일어난 난자와 성숙이 억제되어 있는 GV상태의 난자의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 거의 같은 정도로 이루어지고 있다는 점에서도 알 수 있다. 이런 관점에서 관찰한다면 Ca^{2+} uptake는 GVBD가 일어나는 최초 2시간에서 가장 높으며 이때 GVBD가 일어날 준비가 되는 것으로 추정된다. 이렇게 해석할 때 난자배양시작후 Ca^{2+} 농도를 적정 농도 이하로 유지하던가 Ca^{2+} influx를 막는 Ca^{2+} channel blocker를 처음 2시간 동안 처리할 경우 난자의 핵막붕괴는 전혀 일어나지 않는다는 해석을 할 수 있다.

난자의 핵막붕괴과정에서 배양액내 Ca^{2+} 의 chelating agent로 EDTA나 EGTA등을 사용하여 핵막붕괴를 저해하는 작용을 설명하고

있지만(Knightbridge & Ralph, 1981) EDTA (acid form)는 Ca^{2+} 과 1:1로 chelating하기 때문에 배양액의 Ca^{2+} 의 농도저하를 난자의 핵막붕괴에 요구되는 농도 이하로 낮추어 주는 농도에서는 EDTA가 핵막붕괴를 저해할 수 있으나 만약 EDTA의 양이 난자의 핵막붕괴에 요구되는 Ca^{2+} 농도보다 적게 떨어뜨릴 수 없는 농도로 처리할 경우, EDTA는 핵막붕괴 저지효과를 나타내지 않는다. De Felici & Siracusa(1982)은 생쥐난자의 배양에서 난자의 생존을 유지하기 위해서는 배양액내 최소 0.5mM CaCl_2 의 존재가 필수적이라고 했는데 이것은 본 실험에서 EDTA농도가 1.71mM일 때는 배양액내 Ca^{2+} 을 전부 chelating 하지만 이것의 절반인 0.855mM EDTA는 0.855mM의 Ca^{2+} 만 chelating시키고 나머지 0.855mM의 Ca^{2+} 은 여전히 배양액에 존재하므로 난자의 생존에는 아무런 영향이 없으며 핵막붕괴를 억제시키지 못하고 있다(표 6, 7).

이것은 EDTA 처리로 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 uptake를 본 표 4 및 Table 5에서도 EDTA가 calcium influx를 방해하고 있는 것이 여실히 증명되고 있다. 한편 0.855mM EDTA처리로는 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 uptake에 하등의 영향이 없는 것처럼 나타나고 있다. Calmodulin antagonist인 trifluoperazine에 대한 연구는 개구리 난자에서 microinjection방법으로 난자 세포질에 주입될 때는 분명히 GVBD를 유도하지만(Hollinger & Alvarez, 1982, 1984) 배양액에 처리될 때는 그 효과가 다양하게 나타나고 있어 결론을 종잡을 수 없다고 보고하고 있다(Eckberg, 1988). 생쥐난자에서 Bornslaeger et al.(1984)은 calmodulin이 난자내 cAMP의 농도를 낮추어 주는 cAMP phosphodiesterase의 활성을 촉진하는 과정으로 GVBD를 유도한다고 하고 있으나 calmodulin의 antagonist가 세포질에서 작용할 때는 오히려 이의 반대과정이 일어나 GVBD를 억제하게 될 것이나 이런 결과가 나올 때는 양서류에서와는 정반대의 결과가 된다.

Bornslaeger et al.(1984)는 trifluoperazine이 40-80 μM 농도에서 분명히 GVBD를 억제하고 있으나 본 연구에서는 trifluoperazine 처리로 전혀 효과가 없이 나타나는 것은 결과가 서로 상치되고 있어 배양 system의 차이에서 오는 것인지 아니면 다른 원인에서 인지 앞으로 규명해 보아야 할 과제이다.

생쥐 여포난자를 배양하면서 난자의 자동성 숙억제제인 dbcAMP 및 progesterone, EDTA와 trifluoperazine을 처리하여 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake와 그 작용시기를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. dbcAMP 및 progesterone은 난자에서의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 의 uptake를 방해하며 dbcAMP와 progesterone을 함께 처리시에는 아주 낮은 농도(1/10)에서도 같은 효과를 나타내고 있다. 즉 이들 두가지 화학물질을 함께 처리시에는 상승작용이 아주 대단하다.

2. 난자내로의 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake는 배양 첫 2시간에서 아주 현저하였고 4시간 배양후부터는 실험군의 수준으로 떨어져 8시간 배양에서는 핵막붕괴가 일어난 대조군의 난자와 핵막붕괴가 아직 일어나지 않은 GV상태의 난자에서 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 아주 비슷한 수준으로 일어났다. 그리고 핵막붕괴가 일어나지 않은 GV상태의 난자에서는 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake가 배양시간과는 상관없이 거의 일정한 수준이었다. 환언하면 대조군의 핵막붕괴난자에서 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 가 배양개시 2시간에서 아주 현저한 uptake가 일어났지만 그후 시간이 지남에 따라 배양 8시간에서는 핵막붕괴가 일어나지 않은 실험군의 수준으로 떨어졌다.

3. EDTA는 배양액의 calcium농도와 같은 1.71mM을 처리했을 때는 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake를 현저하게 억제시켰지만 그 이하의 1/2, 1/4, 1/8의 농도에서는 억제효과가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 그리고 EDTA가 난자성숙을 방해하는 것도 배양액의 calcium농도와 같은 1.71mM에서 가장 현저하였으나 그 이하의 1/2, 1/4, 1/8의 농도수준에서는 난자성숙을 전혀 방해하지 않았다.

4. Calmodulin antagonist인 trifluoperazine은 본 연구에서 사용한 농도(0.1 μM -100 μM)에서는 난자의 성숙을 전혀 방해하지 않았다.

5. 배양후 첫 2시간에서 calcium의 influx가 현저히 일어나며 이때 난자의 핵막붕괴과정이 일어나고 있으며 이 이후 calcium의 influx는 서서히 떨어지고 있으나 난자의 생존력을 유지하기 위해서는 분명히 Ca^{2+} 이 필요하다.

Bae I-H, Channing CP:Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian follicles. *Biol Reprod* 1985, 33, 79-87.

Bae I-H, Cho WK:Oocyte maturation in some vertebrates and mammals. *Korean J Fertil Steril* 1982, 9, 1-28(review).

Bae I-H, Foote RH:Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolarity. *J Reprod Fertil* 1980, 59, 11-13.

Bae I-H, Kang SH:Effect of gonadotropin on Ca^{2+} uptake in follicle-enclosed mouse oocytes cultured in vitro. *Korean J Fertil Steril* 1991, 18, 153-162.

Bae I-H, Yoon SY:Effect of Ca^{2+} on the In Vitro 2-cell block of the mouse. *Mol Biol Cell* 1993, 4, 250a.

Bae I-H:Role of calcium resumption to meiosis of cultured porcine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod* 1981, 24, 1, 92.

Bae I-H:The effect of Ni^{2+} in overcoming the 2-cell block in the mouse embryo. *Mol Biol Cell* 1994, 5, 354a.

Batta SK, Knudson JF:Calcium concentration in cumulus enclosed oocytes of rats after treatment with pregnant mares serum. *Biol Reprod* 1980, 22, 243-246.

Baxter DA, Byrne:Ionic conductance mechanisms contributing to the electrophysiological properties of neurons. *Curr Opin Neurobiol* 1991, 1, 105-112.

Bornslaeger EA, Wilde MW, Schultz RM:Regulation of mouse oocyte maturation:Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Devel Biol* 1984, 105, 488-499.

Boynton AL, Whitefield JF, Isaacs RJ, Tremblay R:The control of human W1-38 cell proliferation by extracellular calcium and its elimination by SV-40 induced proliferative transformation. *J Cell Physiol* 1977, 92, 241-248.

- Carroll J, Swann K: Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol triphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. *J Biol Chem* 1992, 267, 11196-11201.
- Chafouleas JG, Lagace WE, Bolton We, Boyd III AE, Means AR: Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of Quiescent(Go) cells into the cell cycle. *Cell* 1984, 36, 73-81.
- Cho WK, Stern S, Biggers JD: Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 1974, 187, 383-386.
- De Felici M, Siracusa G: Survival of isolated fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent on external Ca^{2+} . *Devel Biol* 1982, 92, 539-543.
- Downs SM, Coleman DL, Ward Bailey PF, Eppig JJ: Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Devel Biol* 1985, 82, 454-458.
- Downs SM: Purine control of mouse oocyte maturation: Evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Devel* 1993, 35, 82-94.
- Eckberg WR: Intracellular signal transduction and amplification mechanisms in the regulation of oocyte maturation. *Biol Bull* 1988, 174, 95-108.
- Eppig JJ, Downs SM: The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: Maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Devel Biol* 1987, 119, 313-321.
- Hollinger TG, Alvarez IM: The effects of trifluoperazine on maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *J Exp Zool* 1984, 230, 427-441.
- Hollinger TG, Alvarez IM: Trifluoperazine-induced meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 1982, 224, 461-464.
- Kostellow HB, Morill GA: Calcium dependence of steroid and guanine 3', 5'-monophosphate induction of germinal vesicle breakdown in *Rana pipiens* oocytes. *Endocrinol* 1980, 106, 3, 1012-1019.
- Knightbridge A, Ralph RK: The control of growth of mouse mastocytoma cells by N^6, O^2 -dibutyryl adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate. *Mol Cell Biochem* 1981, 23, 153-164.
- Maruska DV, Leibfried ML, First: Role of calcium and calcium-calmodulin complex in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complex. *Biol Reprod* 1984, 31, 1-6.
- McGaughey RW: The culture of pig oocytes in minimal medium and the influence of progesterone and estradiol-17 β on meiotic maturation. *Endocrinol* 1977, 100, 39-45.
- Paleos GA, Powers RD: The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. *J Exp Zool* 1981, 217, 409-416.
- Powers RD, Paleos GA: Combined effect of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *J Reprod Fertil* 1982, 66, 1-8.
- Powers RD: Changes in mouse oocyte membrane potential and permeability during meiotic maturation. *J Exp Zool* 1982, 221, 365-371.
- Sirard MA, First NL: In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod* 1988, 39, 229-234.
- Tornell J, Brannstrom M, Magnusson C, Billig H: Effect of follicle-stimulating hormone and purines on rat oocyte maturation. *Mol Reprod Devel* 1990, 27, 254-260.
- Tsafiriri A, Lieberman ME, Barnea A, Bauminger S, Lindner HR: Induction by luteinizing hormone of ovum maturation and of steroidogenesis in isolated graafian follicles of the rat: Role of RNA and protein synthesis. *Endocrinol* 1973, 93, 1378-1386.
- Tsafiriri A, Pomerantz, Channing CP: Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. *Biol Reprod* 1976, 14, 511-516.

Warikoo PK, Bavister RD: Hypoxanthine and cyclic adenosine 5-monophosphate maintain meiotic arrest in Rhesus monkey oo-

cytes in vitro. *Fertil Steril* 1989, 51, 886-889.
