

개 난자의 체외성숙에 대한 LH, FSH, EGF 및 Cysteine의 효과

송혜진 · 강은주 · 옥선아 · 전병균 · 노규진 · 최상용[†]

경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

Influences of LH, FSH, EGF and Cysteine on *In Vitro* Canine Oocyte Maturation

Hye-Jin Song, Eun-Ju Kang, Sun-A Ock, Byeong-Gyun Jeon, Gyu-Jin Rho and Sang-Yong Choe[†]

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

Despite many efforts to improving canine *in vitro* maturation (IVM), the efficiency is still low compared to that of other mammalian species. The present study investigated the effects of gonadotropin, epidermal growth factor and cysteine supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured in basic medium (TCM-199 containing 10% FBS, 0.11 mg/ml sodium pyruvate supplemented with or without 10 µg/ml LH, 10 µg/ml FSH, 10 ng/ml EGF and 0.57 mM cysteine) for 72 hr at 38.5°C in humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After culture, oocytes were stained with Hoechst 33342 (10 µg/ml) for 30 min at 4°C, and assessed their nuclear status (GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle break down, MI: metaphase I, MII: metaphase II, UK: unknown stage). No differences were observed in GV, MI and MII rate except GVBD rate between with and without gonadotropins addition respectively (6.7% vs. 17.2%). Supplementation of 10 ng/ml of EGF in hormones added IVM medium resulted in significantly ($p < 0.05$) higher MII rate (4.54% vs. 7.06%). Although there are no significantly difference, total of MI and MII rates were increased by adding cysteine. In conclusion, the present study indicates that supplementation of 10 µg/ml LH and FSH, 10 ng/ml EGF and 0.57 mM cysteine in canine IVM medium show a positive influence on the progression of maturation to MII at 72 hr.

(Key words : Canine oocyte, *In vitro* maturation, LH, FSH, EGF, Cysteine)

요 약

개 난자의 체외성숙율을 높이기 위하여 다양한 방법들이 시도되고 있지만 여전히 그 효율성은 낮다. 본 연구는 개 난자의 체외성숙 시, 성선 자극 호르몬인 황체형성호르몬(LH)과 난포자극호르몬(FSH), 상피세포성장인자(Epidermal growth factor, EGF) 그리고 시스테인(cysteine)을 각각 첨가하여 72시간 동안 체외성숙시킨 후 핵성숙율(GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle break down, MI: metaphase I, MII: metaphase II, UK: unknown stage)을 확인하였다. LH와 FSH를 첨가하였을 때 첨가하지 않은 군과 GV, MI 및 MII율에는 유의적인 차이는 없었다. 하지만 GVBD율은 첨가군이 유의적으로($p < 0.05$) 높았다. 성선 자극 호르몬을 첨가한 배지에 10 ng/ml의 EGF를 첨가하였을 때 MII율이 첨가하지 않은 군보다 유의적으로($p < 0.05$) 높았다(4.54% vs. 7.06%). cysteine을 첨가하였을 경우, 핵성숙율에 유의적인 차이는 보이지 않았지만 전반적으로 핵성숙율이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 개 난자의 체외성숙 시, 10 µg/ml의 LH와 FSH, 10 ng/ml의 EGF 그리고 0.57 mM의 cysteine을 첨가하는 것이 핵성숙율을 향상시키는 것으로 사료된다.

서 론

개의 번식 생리는 일반 가축과 상당히 다른 특징을 보이고 있다. 개의 난자는 과량의 지방 과립 침착으로 돼지나 소에 비하여 짙은 색을 나타내며, 난구세포가 2~3겹

이상으로 매우 조밀하게 붙어 있다. 배란 시 난자의 상태는 제1 감수분열 전기의 상태의 배아 소포(germinal vesicle, GV) 단계이다. 배란 후 바로 수정이 일어나는 일반 가축과 달리 난관에서 2~3일간 머무르면서 감수분열을 완성한 후 수정이 일어난다. 또한, 배란이 일어나기 전에 프로그스테론 농도의 증가 양상을 보인다(Reynaud 등,

[†] Corresponding author : Phone: +82-55-751-5824, E-mail: sychoe@gsnu.ac.kr

2005). 개는 계절발정동물이며 주로 봄에 발정이 오며, 발정기는 대략 9일이고, 배란 후 황체기는 최대 75일에 이른다. 또한, 발정 휴지기는 2개월에서 10개월로 개체 별 차이가 크다(Wanke 등, 2006). 이러한 개체의 다양성과 번식생리 특성 때문에 여전히 개 난자 채취 성숙율 및 수정율은 낮은 편이다(de Matos 등, 1997; Otoi 등, 2002; Rodriguez-Gonzalez 등, 2003; Gall 등, 2005; Reynaud 등, 2005; Wanke 등, 2006; Otoi 등, 2007).

황체 형성 호르몬(Luteinizing Hormone, LH)과 난포 자극 호르몬(Follicle Stimulating Hormone, FSH)은 체내에서 난포와 난자를 발달시켜 난자 성숙을 돕는 중요한 펩타이드 호르몬으로써 소, 돼지, 마우스 및 토끼 난자의 체외성숙 시에도 일반적으로 사용되고 있다(Choi 등, 2001; Liu 등, 2002; Fu 등, 2007; Silvestre, 2007; Wu 등, 2007). FSH는 과립막세포에 있는 수용체를 통하여 작용을 하며, 과립막세포의 증식을 유도한다. 이는 LH 수용체의 증가를 가져와 난포의 발육과 배란을 촉진시키고, LH는 androgen의 생성을 자극하여 estradiol의 합성을 증가시킨다. 많은 연구 결과들이 LH와 FSH의 첨가가 난자의 체외성숙과 체외배양에 효과적이라고 보고하였다(Chian 등, 1999; Choi 등, 2001; Liu 등, 2002; Fu 등, 2007; Silvestre 등, 2007; Wu 등, 2007).

상피세포 성장인자(Epidermal growth factor, EGF)는 53개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드(polypeptide)이다(Cohen 1962). EGF는 세포의 분화, 성장 및 분열에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, EGF 수용체를 통하여 신호를 전달한다고 알려져 있다. EGF의 전달 자극은 난자의 성숙과 난구세포의 팽창에 관여하며, 감수분열의 재개에도 영향을 미친다고 보고되고 있다(Ding와 Foxcroft 1994; Lonergan 등, 1996; Gall 등, 2005; Cui 등, 2006).

기본 아미노산에서 유일하게 thiol 기를 가지고 있는 cysteine은 황 함유 아미노산의 일종으로 강력한 항산화 물질인 glutathione 생성의 중요한 전구체이다. 또한, 여러 연구 결과에서 난자의 체외성숙시 cysteine을 첨가하면 난자 내 glutathione 농도가 높아져 세포질 성숙을 유도한다고 보고되고 있다(de Matos 등, 1997; Rodriguez-Gonzalez 등, 2003).

최근 복제 동물, 형질 전환 동물의 생산에 많은 관심과 집중적인 투자가 이루어지고 있다. 이를 위하여 체외성숙된 난포란의 활용이 필히 동반되어야 한다. 이미 소 및 돼지 등의 체외성숙에 있어서 LH, FSH, EGF 및 cysteine의 효과가 입증되었으나(Ding와 Foxcroft 1994; Park 등, 1997; de Matos 등, 1997; Abeydeera 등, 2000; Choi 등, 2001; Liu 등, 2002; Ali 등, 2003; Accardo 등, 2004; Cotichio 등, 2004; Wu 등, 2007), 개 난자의 체외성숙에 대한 연구는 미진한 상태이다. 따라서 본 연구의 목적은 개 난자의 체외성숙율을 높이기 위하여 이러한 LH, FSH, EGF 및 cysteine을 각각 첨가하여 그 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 배양액과 시료는 Sigma(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

난포란의 수송 및 채취

동물 병원에서 난소 적출술을 시행한 무발정기의 개(1~3년생) 난소를 회수하여 실험에 공시하였다. 난소는 6시간 안에 30°C의 1%(v/v) penicillin-streptomycin(10,000 IU and 10,000 µg/ml, respectively; Pen-Strep; GIBCO)이 첨가된 Phosphate Buffered Saline(PBS)에 담아서 수송하였다. 난소주위를 둘러싸고 있는 난소 주머니를 제거한 후, 10 mM HEPES, 14 mM sodium bicarbonate, 1% (v/v) Pen-Strep, 6 µg/ml heparin 및 0.1% poly poly-vinyl alcohol(PVA)이 첨가된 Ham's F10 배양액을 이용하여 세척한 후, 페트리 디쉬에 Ham's F10을 넣고 난소 세척법을 이용하여 난포란을 채취하였다. 실제 현미경하에서 난자의 세포질이 짙고 균질하며, 난구세포가 3겹 이상 붙어 있으며, 난자의 직경이 110 µm 이상인 난자만을 회수하여 실험에 공시하였다.

체외 성숙

기본 배양액으로는 2.5 mM sodium pyruvate, 1%(v/v) Pen-Strep 및 10% (v/v) fetal bovine serum(FBS)가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액(실험실계 참조)을 사용하였다. 4-well dish(Nunc, Roskilde, Denmark)에 500 µl의 성숙배양액(실험실계 참조)을 넣고 50개의 난구세포 난자 복합체를 넣은 후, mineral oil을 도포하여 배양하였다. 배양조건은 5% CO₂ 및 38.5°C의 환경에서 72시간 동안 성숙시켰으며, 24시간마다 신선한 배양액으로 교체하였다.

난자의 핵 상태 검사

72시간 체외성숙 후 난자의 핵 상태를 관찰하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA 용액에 10분간 처리 후 5분간 분쇄(vortexing)하여 난구세포를 제거하였다. 난구세포가 제거된 난자를 0.1% Poly-vinylpyrrolidone(PVP)가 첨가된 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(D-PBS)에 3번 세척한 후, 1% triton X-100이 첨가된 3.7% formaldehyde 용액으로 1시간 고정된 다음, 세척액으로 3번 세척하였다. 세척된 난자를 10 µg/ml의 Hoechst 33342 염색액으로 형광 염색하였다. 형광현미경(Nicon, Tokyo, Japan) 하에서 난자의 핵 상태를 관찰하였으며, germinal vesicle(GV), germinal vesicle breakdown(GVBD), metaphase I(MI) or metaphase II(MII) 및 unknown stage(UK)로 분류하였다(Fig. 4).

실험 설계

실험 1은 성선 자극 호르몬의 효과를 확인하고자, 기본 배양액에 10 µg/ml의 LH와 FSH를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 72시간 배양 후 핵상태를 관찰하였다. 실험 2에서는 EGF의 영향을 관찰하고자 실험 1에서 얻은 결과를 바탕으로 LH와 FSH가 첨가된 배양액에서 10 ng/ml의 EGF의 첨가와 무첨가에 따른 난자의 핵 상태를 확인하였다. 실험 3은 항산화제인 cysteine이 체외성숙 난자의 핵 상태에 미치는 영향을 확인하고자, LH, FSH 및 EGF가 첨가된 체외성숙 배양액에 0.57 mM의 cysteine을 첨가하여 그 효과를 알아보았다.

통계 처리

첨가물에 따른 각 처리군 간 평균에 대한 유의성은 SPSS

(SPSS, Chicago, Illinois, USA)를 사용하여 분석하였고, 각각의 항목은 평균 ± 표준오차(mean±SE)로 표시하였다. 자료의 유의차는 $p < 0.05$ 수준에서 Independent Sample *t*-test를 사용하여 검정하였다.

결 과

실험 1 : 체외 성숙에 대한 성선 자극 호르몬의 영향

기본 배양액에 LH와 FSH를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군을 72시간 동안 배양한 후 핵 발달율에 대한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 성선 자극 호르몬을 첨가하였을 경우, GV, MI 및 MII율은 유의적인 차이는 없었지만(GV: 9.4%, 8.9%; MI: 16.9%, 22.9%; MII: 3.2%, 4.6%), GVBD율의 경우 LH와 FSH를 첨가한 군이 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였다(6.7%, 17.2%).

실험 2 : 체외 성숙에 대한 EGF의 영향

실험 1을 바탕으로 기본 배양액에 LH와 FSH를 첨가한 후, 10 ng/ml EGF의 효과를 72시간 성숙시킨 후 알아본

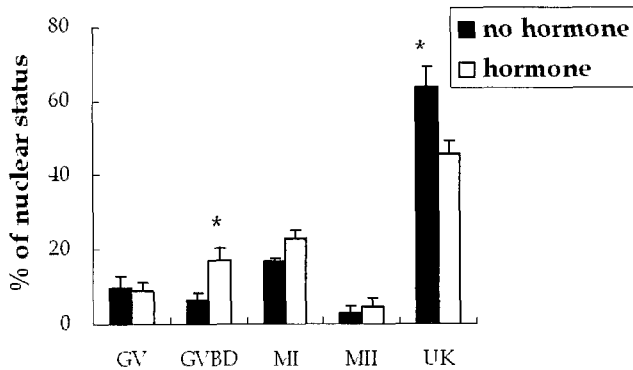


Fig. 1. Meiotic status of canine oocytes cultured for 72 hr in IVM medium with or without 10 µg/ml LH and FSH (GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle break down, MI: metaphase one, MII: metaphase two, UK: unknown stage). Values with different perscript are significantly different ($p < 0.05$).

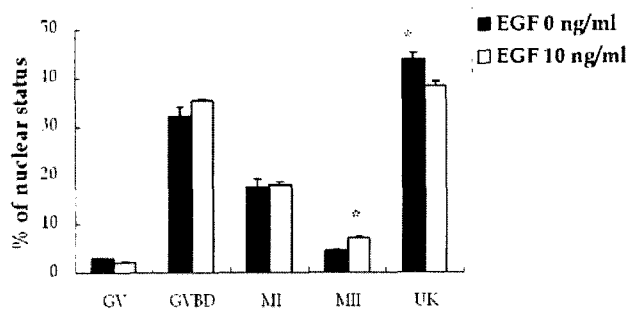


Fig. 2. Meiotic status of canine oocytes cultured for 72 hr in hormones added IVM medium with or without EGF (GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle break down, MI: metaphase one, MII: metaphase two, UK: unknown stage). Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

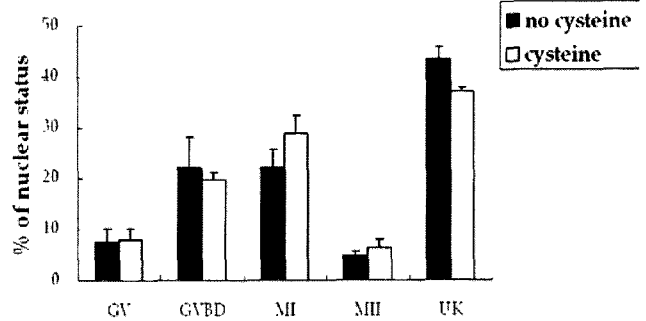


Fig. 3. Meiotic status of canine oocytes cultured for 72 hr in hormones and EGF added IVM medium with or without 0.57 mM cysteine (GV: germinal vesicle, GVBD: germinal vesicle break down, MI: metaphase one, MII: metaphase two, UK: unknown stage). Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$).

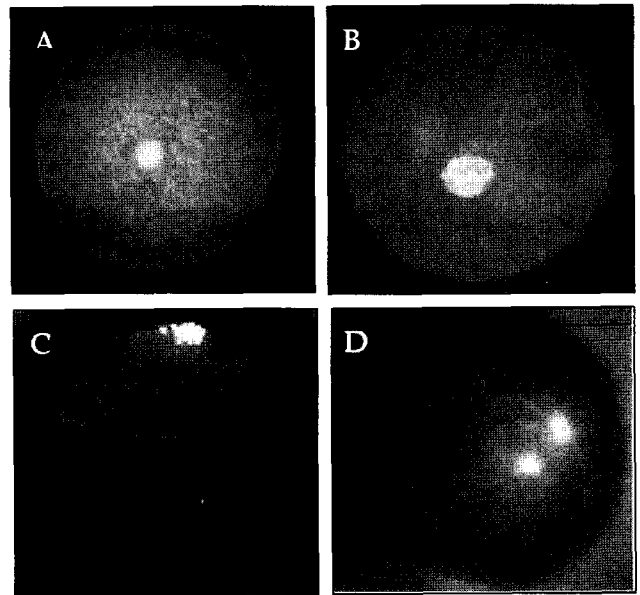


Fig. 4. Oocytes stained with Hoechst 33342 and observed its nuclear status at 200x. (A) GV: germinal vesicle, (B) GVBD: germinal vesicle break down, (C) MI: metaphase one, (D) MII: metaphase two.

결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. EGF를 배양액에 첨가하였을 경우 GV, GVBD 및 MI율은 유의적인 차이를 보이지 않았지만(GV: 3.3%, 2.16%; GVBD: 32.03%, 35.41%; MI: 17.68%, 18.18%), MII율은 4.54%에서 7.06%로 유의적($p < 0.05$)으로 증가함을 확인하였다.

실험 3 : 체외성숙에 대한 Cysteine의 영향

기본 배양액에 LH, FSH, EGF를 첨가한 후, 0.57 mM의 cysteine의 첨가가 개 난자의 체외성숙에 미치는 효과를 알아본 결과는 Fig. 3과 같다. Cysteine의 첨가가 핵 상태의 변화를 유의적으로 보이지는 않았지만, 전반적으로 핵 발달율은 증가하고 UK율은 감소함을 확인할 수 있었다(GV: 7.58%, 8.04%; GVBD: 22.19%, 19.74%; MI: 24.08%, 28.85%; MII: 4.84%, 6.55%; UK: 43.32%, 36.83%).

고찰

개 난자의 체외성숙율을 높이기 위하여 본 실험에서는 무발정기의 난소에서 난자를 채란한 후, 성선 자극 호르몬, EGF 및 cysteine이 핵성숙에 미치는 영향을 알아보았다.

TCM199 배양액에 FBS와 sodium pyruvate를 첨가하여 기본 배양액을 만든 후, 실험 1에서는 성선 자극 호르몬인 LH와 FSH를 기본 배양액에 첨가하였을 때 난자의 핵 성숙에 미치는 영향을 알아보았다. 실험 결과 호르몬을 첨가하였을 경우, 첨가하지 않은 군에 비하여 GVBD율이 증가하여 전체 감수분열 재개율(GVBD + MI + MII)이 높아졌다. 이는 다른 가족의 보고와 유사한 결과를 보였다(Accardo 등, 2004; Liu 등, 2002; Choi 등, 2001). 그러나 무발정기 개의 난소에서 회수한 난자를 1 IU/ml의 FSH와 hCG가 첨가된 배양액에서 체외성숙 후 핵 발달을 조사한 바 핵 성숙율은 증가하지 않았다는 보고와는 상이한 결과를 보였다(Kim 등, 2007). 이러한 차이는 실험에 사용된 배양액 조성의 차이에 기인한 것으로 사료되며, 특히 본 연구의 경우 10%의 FBS를 사용하였지만 Kim 등(2007)은 1%의 FBS를 사용하였다. Chian 등(1999)에 따르면 7,500 IU/ml의 LH와 FSH가 첨가된 배양액에 FSB의 효과를 조사하고자, 사람의 난구세포를 48시간 배양한 후, 배양액내의 프로게스테론의 양을 확인해 본 결과, 20%의 FBS를 첨가하였을 경우 프로게스테론의 양은 평균 1,000 nM/l 이상 수준이었으나, FBS를 첨가하지 않은 군의 경우 평균 100 nM/l보다 낮은 수준을 보였다(Chian 등, 1999). 개의 경우, 배란이 일어나기 전부터 혈중 프로게스테론 농도의 증가를 보인다. 따라서 혈중 프로게스테론 농도와 난자의 성숙 간에는 다른 동물에 비하여 더 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다. 따라서 이러한 결과들을 바탕으로 낮은 혈청 농도에 기인하여 난구세포에서의 프로게스테론의 분비량 역시 낮아져 난자의 발달을 저해하여 성선 자극 호르몬의 효과가 낮게 나타난 것으로 사료된다.

실험 1의 결과를 바탕으로 기본 배양액에 LH와 FSH를 첨가한 후, 10 ng/ml의 EGF의 효과를 알아보았다. EGF는 난구세포의 성장을 촉진하여 난포를 발육시키며, EGF를 성선 자극 호르몬과 함께 첨가하면 난구세포를 팽창시키고 극체의 방출을 촉진하며 핵성숙을 시킨다고 알려져 있다(Ding와 Foxcroft 1994; Lonergan 등, 1996; Park 등, 1997; Abeydeera 등, 2000; Cotichio 등, 2004; Gall 등, 2005; Cui 등, 2006; Farin 등 2007). 쥐, 고양이, 돼지 및 소 등에서 체외성숙 시 EGF를 첨가하였을 때 난자의 성숙율이 향상된다고 보고된 바 있다(Ding와 Foxcroft 1994; Lonergan 등, 1996; Cotichio 등, 2004; Farin 등, 2007).

난구세포를 제거한 후 EGF를 첨가하여 난자를 성숙시킨 경우에는 핵 성숙율이 향상되지 않았다는 보고를 바탕으로 EGF는 난구세포에 있는 EGFR를 통하여 이루어진다는 것이 알려졌다(Lorenzo 등, 1994). 본 연구 결과 EGF를 체외성숙 배양액에 첨가하였을 경우 4.5%에서 7.1%로 MII율이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 Cui 등(2006)과 유사한 결과로써 개의 체외성숙시 0.1% PVA가 첨가된 NCSU 배양액에 0, 10, 100 ng/ml,

1,000 ng/ml를 각각 첨가한 후, 72시간 성숙시킨 경우, 핵 성숙에는 유의적인 차이가 없었지만, 10% FBS가 첨가된 NCSU 배양액의 경우 100 ng/ml와 1,000 ng/ml의 EGF를 첨가한 군이 유의적으로 핵성숙율이 증가하였다(Cui 등, 2006).

난자를 20%의 산소 농도에서 배양하면 *in vivo* 배양 조건에 비하여 높은 산소 농도로 인하여 활성산소(Reactive oxygen tension: ROS)가 과다 생산되며, 미토콘드리아의 기능을 저해하며, DNA, RNA 및 단백질 등에 손상을 입혀 결과적으로 세포 사멸의 원인이 된다(Ide 등, 2001). 이러한 손상을 최소화하기 위하여 세포의 체외배양시 배양액 내에 다양한 항산화제를 첨가한다. Cysteine은 그 중 대표적인 항산화 물질이며(Ali 등, 2003), 특히 난자를 체외배양시 cysteine을 첨가하면 강력한 항산화물질인 glutathione 양이 난자 내에 증가하여 세포 내 ROS를 환원시킴으로써 난자의 체외성숙율 및 발달율의 향상을 가져온다(de Matos 등, 1997; Ali 등, 2003; Rodriguez-Gonzalez 등, 2003). 소나 돼지에 비하여 24시간 이상의 체외배양 시간이 요구되는 개 난자의 경우, ROS의 공격에 더 많이 노출되어 있으므로 항산화제의 첨가는 필수적이라고 사료된다. 따라서 본 실험에서는 성선 자극 호르몬과 EGF를 첨가한 배양액에 0.57 mM의 cysteine을 사용하여 그 효과를 확인한 바, cysteine을 첨가하였을 때 전반적으로 감수분열율이 증가함을 확인할 수 있었지만, 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 이는 선행 연구에서 밝혀진 바와 같이 난자의 체외성숙 시 cysteine의 첨가가 세포질 성숙을 유도하지만 핵 발달에는 영향을 미치지 않는다고 보고와 비슷한 결과이다(Yoshida 등, 1992; De La Fuente 등, 1999; Kishida 등, 2004). 그러나 이와 상이하게 100 μ M cysteamine이 첨가된 배양액에서 쥐 난자를 체외 성숙시킬 경우, 핵 성숙율이 유의적으로 증가를 보고하고 있다(Mohammadi 등, 2006). 따라서 본 실험 결과를 보충하기 위해서는 cysteine의 농도를 증가시킨 후 결과를 확인해 볼 필요성이 있을 것으로 생각한다.

본 실험 결과를 미루어 보아 개 난자의 체외성숙 시, 10 μ g/ml의 LH와 FSH, 10 ng/ml의 EGF, 0.57 mM의 cysteine을 첨가하는 것이 개 난자의 체외 성숙율을 향상시키는 것으로 사료된다. Cysteine이 난자의 성숙에 미치는 영향을 규명하기 위해 각기 다른 농도의 cysteine을 사용하였을 때의 효과를 알아볼 필요가 있을 것으로 생각된다. 또한, 개의 핵성숙을 뿐 아니라 세포질 성숙과 관련한 유전자 분석, 발현 단백질 분석 등과 같은 전반적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

인용문헌

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather RS, Day BN (2000): Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54:787-797.
2. Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P (2004): Effect of recombinant human FSH

- and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Anim Reprod Sci* 81:77-86.
3. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA (2003): Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59:939-949.
 4. Chian RC, Ao A, Clarke HJ, Tulandi T, Tan SL (1999): Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture *in vitro*. *Fertil Steril* 71: 61-66.
 5. Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE, Squire EL (2001): Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 56:661-670.
 6. Cohen S (1962): Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562.
 7. Cotichchio G, Rossi G, Borini A, Grondahl C, Macchiarelli G, Flamigni C, Fleming S, Ceccoli S (2004): Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion *in vitro* are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. *Hum Reprod* 19:2913-2918.
 8. Cui XS, Jin YX, Shen XH, Lee JY, Lee HS, Yin XJ, Kong IK, Kim NH (2006): Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. *Theriogenology* 66:267-274.
 9. De La Fuente R, O'Brien MJ, Eppig JJ (1999): Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod* 14:3060-3068.
 10. De Matos DG, Furnus CC, Moses DF (1997): Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biol Reprod* 57: 1420-1425.
 11. Ding J, Foxcroft GR (1994): Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol Reprod Dev* 39:30-40.
 12. Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herrick JR, Kennedy-Stoskopf S (2007): The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 98:97-112.
 13. Fu M, Chen X, Yan J, Lei L, Jin S, Yang J, Song X, Zhang M, Xia G (2007): Luteinizing hormone receptors expression in cumulus cells closely related to mouse oocyte meiotic maturation. *Front Biosci* 12:1804-1813.
 14. Gall L, Boulesteix C, Ruffini S, Germain G (2005): EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev* 71:489-494.
 15. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A (2001): Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88:529-535.
 16. Kim MK, Oh HJ, Jang G, Hong SG, Park JE, Kim HJ, Lee HS, Kim SC, Kang SK, Lee BC (2007): Effects of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin on the *in vitro* maturation of canine oocytes *Reprod Dev Biol* 31:7-13
 17. Kishida R, Lee ES, Fukui Y (2004): *In vitro* maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 62:1663-1676.
 18. Liu HC, He Z, Rosenwaks Z (2002): *In vitro* culture and *in vitro* maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertil Steril* 77: 373-383.
 19. Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P (1996): Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 54:1420-1429.
 20. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M (1994): Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1. *J reprod Fertil* 101: 697-701.
 21. Otoi T, Shin T, Kraemer DC, Westhusin ME (2007): Role of cumulus cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod Domest Anim* 42:184-189.
 22. Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westhusin M (2002): Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124:775-781.
 23. Park KW, Iga K, Niwa K (1997): Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically-defined medium. *Theriogenology* 48:1127-1135.
 24. Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, de Lesegno CV, Chastant-Maillard S (2005): *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 130:193-201.
 25. Rodriguez-Gonzalez E, Lopez-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT (2003): Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 65:446-453.
 26. Silvestre MA, Alfonso J, Garcia-Mengual E, Salvador I, Duque CC, Molina I (2007): Effect of recombinant human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on *in vitro* maturation of porcine oocytes evaluated by the subsequent *in vitro* development of embryos obtained by *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, or par-

- thenogenetic activation. *J Anim Sci* 85:1156-1160.
27. Wanke MM, Loza ME, Rebuelto M (2006): Progestin treatment for infertility in bitches with short interestrus interval. *Theriogenology* 66:1579-1582.
28. Wu J, Xu B, Wang W (2007): Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown *in vitro*. *J Assist Reprod Genet* (Online).
29. Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG (1992): Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 31: 68-71.
- (접수일자: 2007. 8. 2 / 채택일자: 2007. 9. 8)