

體外成熟 牛卵胞卵의 體外受精과 發達에 관한 研究
V. Hyaluronic acid 와 Chondroitin Sulfate 및 Heparin 이
牛卵胞卵의 體外成熟에 미치는 影響

朴世必 · 鄭炳敏 · 吳鍾曠 · 李勳澤 · 鄭吉生

建國大學校 畜產大學

Studies on *In Vitro* Fertilization and Development of
Bovine Follicular Oocytes Matured *In Vitro*
V. Effect of Hyaluronic acid, Chondroitin Sulfate, and
Heparin on *In Vitro* Maturation of Bovine Follicular Oocytes

Park, S.P., H.M. Chung, J.H. Oh, H.T. Lee, and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were designed to investigate the effects of glycosaminoglycans(GAGs), which maybe produced by cumulus cells, on *in vitro* maturation process of bovine follicular oocytes. The rates of *in vitro* maturation of bovine oocytes were examined after incubating with the various concentrations of a hyaluronic acid, chondroitin sulfate, or heparin for 26 hours.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. When the cumulus-enclosed or removed oocytes treated with hyaluronic acid(200, 400, 800 and 1,600 μ g/ml), the maturation rates of cumulus-removed oocytes were 48.6, 59.4, 68.4 and 61.3% respectively. Especially, at a concentration of 800 μ g/ml, the maturation rates(68.8%) of cumulus-removed oocytes were slightly lower than that(78.3%) of cumulus-enclosed oocytes. However, the treatment of hyaluronic acid showed significantly higher maturation rates compared to that(48.4%) of control group of cumulus-removed oocytes($p < 0.05$). Therefore, these results suggest that hyaluronic acid has a beneficial effect on maturation of bovine follicular oocytes.
2. The maturation rate of cumulus-free oocytes treated with chondroitin sulfate(200, 400, 800 and 1,600 μ g/ml) was 52.3, 56.1, 55.9 and 52.2% respectively. These rates were not different from those(52.9%) of control group. However, these rates in cumulus-free oocytes were significantly lower than that(79.0%) in cumulus-enclosed oocytes($p < 0.01$). Therefore, these results suggest that chondroitin sulfate do not affect on the maturation of oocytes.
3. In cumulus-free oocytes cultured with different heparin concentration, the maturation rates were ranged from 48.5 to 52.1%, showing no differencies from that(50.7%) of control group. However, these rates were significantly lower than 80.0% in cumulus-enlosed oocytes($p < 0.01$).
4. The nuclear maturation of oocytes was increased by treatment of each of three

본 연구는 건국대학교 동물자원연구센터 연구비에 의하여 수행되었음.

glycosaminoglycans(hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and heparin). In addition, the treatment of mixed together showed the significant additive effect. Hyaluronic acid was more effective than chondroitin sulfate and heparin were.

I. 緒論

卵母細胞의 減數分裂 再開은 卵丘細胞의 代謝活性에 의해 이루어지며(Gilula 등, 1978; Dekel과 Beers, 1980; Dekel 등, 1981), 卵母細胞와 卵胞細胞사이의 homologous 나 heterologous gap junction을 통하여 卵子の 成熟에 필요한 營養物質 공급이 일어나 卵母細胞가 성장된다(Eppig, 1979a, b; Heller 등, 1981; Brower와 Schultz, 1982).

그러나 卵丘細胞는 gonadotropin의 영향으로 成熟하면서 에너지원인 pyruvate와 lactate를 생산하여 卵母細胞의 成熟과 雄性前核의 形成 및 受精卵의 發生에 필요한 蛋白質을 合成하도록 하며(Donahue와 Stern, 1968; Leibfried와 First, 1979; Fukui와 Sakuma, 1980), 卵丘細胞는 FSH와 LH의 영향을 받아 상호결합된 細胞와 細胞, 卵母細胞와 透明帶間의 결합이 느슨해지면서(Anderson 등, 1976; Eppig, 1982; Hensleigh와 Hunter, 1985) Glycosaminoglycans(GAGs)를 分泌하여 精子의 acrosome 반응을 유기시키기도 한다(Moor 등, 1980; Ball 등, 1982; Handraw 등, 1982; Lenz 등, 1983a, b).

또한, 쥐의 경우 卵丘細胞의 intercellular matrix에는 多量の hyaluronic acid가 존재하며(Eppig, 1979a, b), 소에 있어서도 hyaluronic acid가 존재하는데(Ball 등, 1982) 특히 排卵前 卵子(pre-ovulatory)를 둘러싸고 있는 卵丘細胞로부터 分泌되는 glycoprotein(Ball 등, 1982; Lenz 등, 1983a, b) 및 生化學的 役割이 아직 규명되지 않은 다양한 非스테로이드 系列의 物質들(Tesarik, 1988)은 精子의 尖體反應(Lenz 등, 1983a, b) 및 前核 形成率(Ball 등, 1983)을 향상시키며 精子侵入과 細胞質成熟을 促進시킨다(Vanderhyden과 Armstrong, 1989). 한편, 朴等(1992)은 牛 卵丘細胞로부터 분비되는 物質이 GAGs成分中 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate 및 heparin과 두종의 未知因子라는 것을 앞서 확인한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 牛 卵胞卵의 體外成熟時 GAGs의 성분중 본 研究室에서 朴等(1992)에 의해 확인된 Hyaluronic acid와 Chondroitin sulfate 및 Heparin을 첨가함으로써 이들 첨가제가 卵成熟에 미치는 效果를 검토해 보고자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

卵胞卵은 屠畜場(宇星農場)에서 屠殺된 Holstein 成牝牛로부터 回收하였다.

2. 卵子 處理用 培養液

卵子の 回收, 體外成熟을 위해서는 TCM-199(Gibco Co.)에 Na-pyruvate(0.11 g/l)와 Gentamycin(0.2mg/ml)을 添加한 것을 基礎培養液으로 使用하였다.

한편, 卵子の 回收과 體外成熟에 사용된 배양액은 朴等(1992)의 방법에 準하여 제작된 것을 각각 사용하였다.

이들 모든 培養液은 pH 7.2~7.4, 滲透壓 285~290mOsmol/kg으로 調整하였으며 使用直前에 0.22 μ m의 membrane filter를 사용하여 除菌한 다음 10ml씩 分注하여 4°C에서 保管하면서 使用하였다.

3. 卵胞卵의 回收

난포란의 회수방법으로서 20 gauge 주사침이 부착된 10ml 주사기를 사용 朴等(1992)의 방법에 따라 회수하였다.

4. 卵胞卵의 生死鑑別

卵丘細胞에 둘러싸인 卵母細胞의 生存性 與否를 確認하기 위하여 卵子 回收用 培養液에 同量의 0.4% trypan blue液(Gibco Co.)을 混合한 다음 卵母細胞를 15分間 培養한 後, 實體顯微鏡(Kyowa Co.)下에서 50%이상 染色된 卵母細胞와 細胞質이 凝縮 또는 破片化된 異狀 卵母細胞 등을 除去하고 染色이 되지 않은

것과 細胞質 狀態가 正常的인 卵母細胞만을 體外成熟에 供試하였다.

5. 卵胞卵의 體外成熟 및 成熟度 判定

1) 卵胞卵의 體外成熟

前述한 體外 成熟用 培養液 100 μ l 小滴을 流動 paraffin oil 로 被覆한 다음 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 및 95% 空氣條件의 培養器內에서 5~6時間 平衡시킨 후 이 培養液 小滴에 回收된 卵胞卵을 浸漬하여 24~26時間 培養하였다.

한편, 이때 사용된 첨가제로서는 商業的으로 市販되고 있는 Glycosaminoglycans(GAGs)의 構成成分中 Hyaluronic acid(Grade I, Sigma Co., M.W. > 50,000), Chondroitin sulfate(Grade III from whale or shark cartilage, Sigma Co., M.W. 40,000~50,000) 및 Heparin(Grade I from porcine intestinal mucosa, Sigma Co., M.W. 6,000~30,000)을 使用하였고 첨가농도는 각각 200~1,600 μ g/ml 이었다.

2) 卵胞卵의 成熟度 判定

체의성숙이 유도된 난포란의 경우 난포란에 부착된 난구세포를 0.1% hyaluronidase 용액으로 제거한 후 aceto-orcein 染色法으로 실시한 다음 위상차 현미경 하에서 卵胞卵의 核分裂狀態를 관찰하여 卵核胞期, 卵核胞崩壞期, 1次 減數分裂 中期, 後期, 末期 및 2次 減數分裂 中期 卵胞卵으로 구분하고 난포란의 차지하는 비율을 조사하였다.

III. 結果 및 考察

1. Glycosaminoglycans(GAGs)의 添加가 牛卵胞 卵의 體外成熟에 미치는 影響

1) Hyaluronic acid, Chondroitin sulfate 및 Heparin 의 單獨 添加

卵丘細胞가 卵胞卵의 體外成熟에 미치는 效果를 具體的으로 檢討하기 위하여 앞서 보고된 朴等(1991)의 結果를 토대로 해서 GAGs의 成分中 商業的으로 市販되고 있는 Hyaluronic acid, Chondroitin sulfate 및 Heparin 을 添加劑로 使用하였다. 이때 使用된 添加濃度は 公히 200~1,600 μ g/ml 이었고, 卵丘細胞가 人爲的으로 除去된 卵胞卵에 各各의 添加劑를 處理함으로써 다음과 같은 結果를 얻었다.

Table 1은 Hyaluronic acid를 添加劑로 使用하였을 때 卵胞卵의 核成熟度를 調査한 것이다(Fig. 1). 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 경우 最終成熟段階인 Metaphase-II (M-II)까지의 成熟率은 78.3%로써 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵에 있어서 對照區의 成熟率 48.4%보다 有意하게 높은 成熟率을 보여($p < 0.01$) 卵丘細胞가 卵胞卵의 成熟에 關與하고 있음을 確認하였다. 그러나 卵丘細胞 除去 卵胞卵에 200, 400, 800 및 1,600 μ g/ml 의 濃度を 添加했을 때의 核成熟率은 各各 48.6, 59.4, 68.8 및 61.3%로써 卵丘細胞 附着 卵胞卵의 成熟率 78.3%보다는 낮았지만 卵丘細胞가 除去된 對照區의 成熟率 48.4%와 比較해 볼 때 높거나 有

Table 1. Effect of hyaluronic acid on the maturation of cumulus-free bovine oocytes in vitro

Oocytes	Conc. (μ g/ml)	No. of oocytes examined	Nuclear stages				
			Met I(%)	Ana I(%)	Tel I(%)	Met II(%)	Deg.(%)
With cumulus cell	0	60	—	8(13.3)	5(8.3)	47(78.4) ^c	—
	0	62	11(17.7)	10(16.1)	8(12.9)	30(48.4) ^a	3(4.8)
Without ^{a)} cumulus cell	200	74	8(10.8)	22(29.7)	7(9.5)	36(48.6) ^a	1(1.4)
	400	64	4(6.3)	10(15.6)	12(18.8)	38(59.4) ^{ab}	—
	800	64	2(3.1)	10(15.6)	8(12.5)	44(68.8) ^{bc}	—
	1,600	62	2(3.2)	8(12.9)	13(21.0)	38(61.3) ^{ab}	1(1.6)

a) : Cumulus cell removed with pipetting

a,b,c : Means in the same row without common superscripts are different. $p < 0.05$

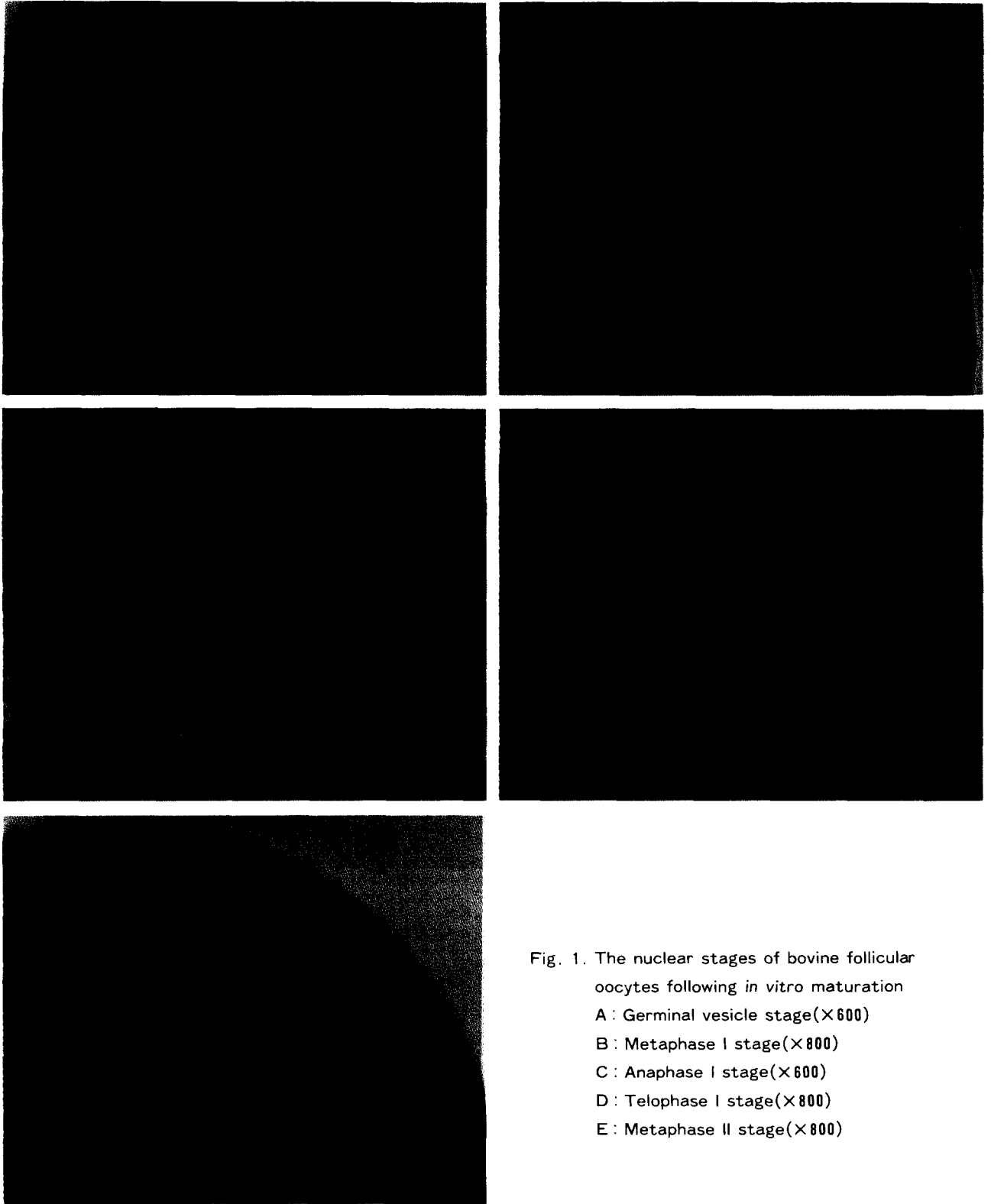


Fig. 1. The nuclear stages of bovine follicular oocytes following *in vitro* maturation
A: Germinal vesicle stage($\times 600$)
B: Metaphase I stage($\times 800$)
C: Anaphase I stage($\times 600$)
D: Telophase I stage($\times 800$)
E: Metaphase II stage($\times 800$)

Table 2. Effect of chondroitin sulfate on the maturation of cumulus-free bovine oocytes in vitro

Oocytes	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of oocytes examined	Nuclear stages				
			Met I(%)	Ana I(%)	Tel I(%)	Met II(%)	Deg. (%)
With cumulus cell	0	62	5 (8.1)	4 (6.5)	4 (6.5)	49(79.0)*	—
	0	68	15(22.1)	9(13.2)	8(11.8)	36(52.9)	1(1.5)
Without cumulus cell	200	65	10(15.4)	15(23.1)	6(9.2)	34(52.3)	—
	400	66	8(12.1)	12(18.1)	8(12.1)	37(56.1)	1(1.5)
	800	68	12(17.6)	10(14.7)	8(11.8)	38(55.9)	—
	1,600	67	15(22.4)	12(17.9)	5(7.5)	35(52.2)	—

* $p < 0.01$

의하게 높은 成熟率을 보였다($p < 0.05$). 특히 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 添加區에서 얻어진 가장 높은 成熟率 68.8%는 卵丘細胞가 附着된 경우의 成熟率 78.3%보다는 약간 낮은 것이었지만 卵丘細胞가 除去된 對照區의 成熟率 48.4%보다는 有意하게 높은 成熟率으로써 ($p < 0.05$) Hyaluronic acid가 成熟에 關與하고 있음을 示唆해 준다.

한편, Chondroitin sulfate를 添加劑로 使用했을 때 卵胞卵의 核成熟度는 Table 2에 提示한 바와 같다.

卵丘細胞 除去 卵胞卵의 경우 200, 400, 800 및 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 의 添加區에서 核成熟率은 각각 52.3, 56.1, 55.9 및 52.2%로써 無添加區의 成熟率 52.9%와 類似한 成熟率을 보였으며 이러한 成熟率은, 卵丘細胞 附着 卵胞卵의 成熟率 79.0%보다는 有意하게 낮은 成績이었다($p < 0.01$)

이러한 結果를 미루어 볼 때 卵胞卵의 體外成熟時 添加된 Chondroitin sulfate는 成熟에 影響을 미치지 못하는 것으로 여겨진다.

또한 Table 3은 卵胞卵의 體外培養時 Heparin의 添加效果를 檢討한 成績이다.

Table 3에 提示된 바와 같이 卵丘細胞 除去 卵胞卵에 있어서 各各의 Heparin 添加區의 成熟率은 48.5~52.1%로써 對照區의 成熟率 50.7%와 類似한 成績이었고 卵丘細胞 附着 卵胞卵의 成熟率 80.0%보다 有意하게 낮은 것으로 ($p < 0.01$), 添加된 Heparin은 成熟에 影響을 미치지 못하는 것으로 判斷된다.

以上の 結果를 綜合하여 檢討해 볼 때 卵胞卵의 體外成熟時 商業적으로 市販되고 있는 GAGs의 成分中 Hyaluronic acid, Chondroitin sulfate 및 Heparin을 添加했을 때, 添加된 이들 중 Hyaluronic acid가

Table 3. Effect of heparin on the maturation of cumulus-free bovine oocytes in vitro

Oocytes	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	No. of oocytes examined	Nuclear stages				
			Met I(%)	Ana I(%)	Tel I(%)	Met II(%)	Deg. (%)
With cumulus cell	0	60	3 (5.0)	5 (8.3)	4 (6.7)	48(80.0)*	—
	0	67	10(14.9)	12(17.9)	8(11.9)	34(50.7)	3(4.5)
Without cumulus cell	200	71	15(21.1)	10(14.1)	9(12.7)	37(52.1)	—
	400	68	12(17.6)	12(17.6)	10(14.7)	33(48.5)	1(1.5)
	800	65	10(15.4)	16(24.6)	5(7.7)	33(50.8)	1(1.5)
	1,600	66	10(15.2)	15(22.7)	9(13.6)	32(48.5)	—

* $p < 0.01$

卵成熟에 效果的이었으며 특히 800 μ g/ml의 添加區에서의 成熟率 68.8%는 卵丘細胞가 除去된 모든 處理區보다 有意하게 높은 成熟率을 나타내 卵丘細胞로부터 分泌되는 分泌物中 Hyaluronic acid가 卵成熟에 影響을 미친다는 것을 間接적으로 確認할 수 있었다.

그러나 이러한 成績은 Hyaluronic acid, Chondroitin sulfate 및 Heparin을 單獨으로 添加했을 때의 成熟率을 나타낸 것이므로 이들을 併用했을 때 卵成熟에 미치는 影響을 檢討해 볼 必要가 있다고 생각된다.

2) Hyaluronic acid, Chondroitin sulfate 및 Heparin의 併用

따라서 Table 4는 添加劑로서 Hyaluronic acid, Chondroitin sulfate 및 Heparin을 使用目的에 따라 併用했을 때 卵成熟에 미치는 效果를 檢討한 것이다. 이때 使用된 各各의 濃度는 Table 1, 2, 3을 根據로 하여 800 μ g/ml의 Hyaluronic acid, 400 μ g/ml의 Chondroitin sulfate 및 200 μ g/ml의 Heparin을 添加하였다.

Table 4에 제시된 바와 같이 卵丘細胞가 除去된 卵胞卵의 경우 最終 成熟段階인 Mataphase-II (M-II)까지의 成熟率은 50.0%로써 卵丘細胞 附着 卵胞卵의 成熟率 79.7%보다는 낮았지만 對照區의 成熟率 50.0%보다는 높거나 有意하게 높은 것이었다($p < 0.05$).

이러한 成績은 Table 1, 2, 3의 成績과 比較해 볼 때 添加劑가 單獨으로 添加했을 때보다 併用했을 때 모든 處理區에서 높은 成熟率을 나타냈다.

특히 세가지 添加劑가 모두 添加된 區에서 69.5%의 높은 成熟率을 보였지만 Table 1에서 提示되었듯이 Hyaluronic acid가 單獨으로 添加된 경우의 成熟率 68.8%와 類似한 成績이었다. 이러한 結果로 미루어 볼 때 卵成熟에는 Hyaluronic acid가 Chondroitin sulfate와 Heparin보다 效果的인 作用을 나타냈는데, 이는 卵丘細胞로부터 分泌되는 glycosaminoglycans(GAGs)中 Hyaluronic acid가 卵胞卵의 體外成熟時 重要な 役割을 遂行하고 있음을 間接적으로 確認하는 것이며 그밖에도 아직까지 그 特性이 糾明되지 않고 있는 非스테로이드系의 物質이 關與하고 있는 것으로 思料된다.

IV. 摘要

本 研究에서는 牛卵胞卵의 體外成熟時 卵丘細胞에서 분비되는 GAGs의 성분중 Hyaluronic acid, Chondroitin sulfate 및 Heparin을 첨가했을 때 이들 첨가제가 卵成熟에 미치는 影響을 검토하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 卵丘細胞가 附着되었거나 除去된 卵胞卵에 Hyalur-

Table 4. Effect of glycosaminoglycans(GAGs) on in vitro maturation of bovine follicular oocytes

Oocytes	Conc. (μ g/ml)	No. of oocytes examined	Nuclear stages				
			Met I(%)	Ana I(%)	Tel I(%)	Met II(%)	Deg. (%)
With cumulus cell	0	64	9(14.0)	-	4(6.3)	51(79.7) ^c	-
	0	78	24(30.8)	12(15.4)	-	39(50.0) ^a	3(3.8)
Without cumulus cell	Hy+Ch	76	10(13.2)	10(13.2)	6(4.8)	50(65.8) ^{bc}	-
	Ch+He	80	22(27.5)	14(17.5)	-	44(55.0) ^a	-
	Hy+He	78	8(10.2)	12(15.4)	8(10.3)	50(64.1) ^{ab}	-
	Hy+Ch+He	82	5(6.1)	15(18.3)	6(6.1)	57(69.5) ^{bc}	-

Hy : Hyaluronic acid(800 μ g/ml)

Ch : Chondroitin sulfate(400 μ g/ml)

He : Heparin(200 μ g/ml)

^{a,b,c} : Means in the same row without common superscripts are different, $p < 0.05$

onic acid를 첨가한 실험에서, 卵丘細胞 除去群에 200, 400, 800 및 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 첨가하였을 때의 核成熟度는 각각 48.6, 59.4, 68.8 및 61.3%이었다. 특히 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 68.8%는 卵丘細胞가 附着된 경우의 成熟率 78.3%보다는 약간 낮았지만 卵丘細胞 除去群에 있어서 對照區 成熟率 48.4%보다는 유의하게 높은 것으로서 ($p < 0.05$), Hyaluronic acid가 核成熟에 관여하고 있음을 示唆해 준다.

2. 卵丘細胞가 附着되었거나 除去된 卵胞卵에 Chondroitin sulfate를 첨가한 실험에서 200, 400, 800 및 1,600 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 첨가했을 때의 核成熟率은 각각 52.3, 56.1, 55.9 및 52.2%로써 對照區의 核成熟率과 유사한 성적을 보였으나 卵丘細胞가 附着된 卵胞卵의 核成熟率 79.0%보다는 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$). 이러한 점으로 미루어 보아 Chondroitin sulfate는 核成熟에 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다.
3. 卵丘細胞가 附着되었거나 除去된 卵胞卵에 Heparin을 첨가한 결과, 난구세포 제거군에 있어서 각각의 Heparin 첨가의 成熟率은 48.5~52.1%로써 對照區의 成熟率 50.7%와 유사한 성적이었고, 난구세포가 附着된 난포란의 成熟率 80.0%보다는 유의하게 낮은 것으로 ($p < 0.01$), 첨가된 Heparin은 卵成熟에 영향을 미치지 않는 것으로 判斷된다.
4. 卵丘細胞가 附着되었거나 除去된 卵胞卵에 Hyaluronic acid(800 $\mu\text{g/ml}$), Chondroitin sulfate(400 $\mu\text{g/ml}$) 및 Heparin(200 $\mu\text{g/ml}$)을 併用했을 때, 세가지 添加劑를 單獨添加했을 때보다 併用했을 때 공히 높은 成熟率을 보였으며, 특히 Hyaluronic acid가 併用된 경우 높은 成熟率을 나타내었다.

V. 引用文獻

1. Anderson, E. and D.F. Albertini. 1976. Gap junctions between the oocytes and the companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.*, 71: 680-688.
2. Ball, G.D., M.E. Bellin, R.L. Ax, and N. L. First. 1982. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocytes complex: morphology and chemistry. *Mol. Cell Endocrinol.*, 28: 113-122.
3. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister, and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28: 717-725.
4. Brower, P.T. and R.M. Schultz. 1982. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Develop. Biol.*, 90: 144-148.
5. Dekel, N. and W.H. Beers. 1980. Development of the rat oocyte *in vitro*: inhibition and induction of maturation in presence or absence of the cumulus oophorus. *Develop. Biol.*, 75: 247-252.
6. Dekel, N., T.S. Lawrence, N.B. Gilula, and W.H. Beers. 1981. Modulation of cell-to cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Develop. Biol.*, 86: 356-362.
7. Donahue, R.P. and S. Stern. 1968. Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 17: 395-398.
8. Eppig, J.J. 1979a. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature(London)*, 281: 483-484.
9. Eppig, J.J. 1979b. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 208: 111-120.
10. Eppig, J.J. 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion,

- Develop. Biol., 89 : 268-274.
11. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro* : relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod., 22 : 669-673.
 12. Gilula, N.B., M.L. Epstein, and W.H. Beers. 1978. Cell-to-cell communication and ovulation, a study of the cumulus-oocyte complex. J. Cell Biol., 78 : 58-75.
 13. Handrow, R.R., R.W. Lenz, and R.L. Ax. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochemical and Biophysical Research Communications, 107(4) : 1326-1332.
 14. Heller, D.T., D.M. Cahill, and R.M. Schultz. 1981. Biochemical studies of mammalian oogenesis : metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. Develop. Biol., 84 : 455-461.
 15. Hensleigh, M.A. and A.G. Hunter. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavag. J. Dairy Sci., 68 : 1456-1462.
 16. Leibfried-Rutledge, M.L. and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci., 48 : 76-86.
 17. Lenz, R.W., G.D. Ball, M.L. Leibfried, and N.L. First. 1983a. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-depement processes. Biol. Reprod., 29 : 173-179.
 18. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, N. L. First, and R.L. Ax. 1983b. Chondroitin sulfate facilitates on acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. Biol. Reprod., 28 : 683-690.
 19. Moor, R.M., C. Polge, and S.M. Willadsen. 1980. Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization mammalian oocytes. J. Embryo. Exp. Morphol., 56 : 319-324.
 20. Vanderhyden, B.C. and D.T. Armstrong. 1989. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. Biol. Reprod., 40 : 720-728.
 21. 朴世必, 鄭炯敏, 李勳澤, 鄭吉生. 1991. 體外成熟牛卵細胞의 體外受精과 發達에 關한 研究. IV. 卵丘細胞의 生化學的 特性檢討. 韓國家畜繁殖學會誌. 16(1) : 1-6.