

卵丘, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞와의 共同培養이 소 卵胞卵의 體外受精 및 分割率에 미치는 影響에 관한 研究

金相根 · 福井 豊*

忠南大學校 獸醫科大學

Studies on the Effects of Co-Culture with Cumulus Cells, Oviduct Epithelial Cells and Uterine Endometrial Cells on *In Vitro* Fertilization and Cleavage Rate of Bovine Oocytes

Kim S.K. and Y. Hukui*

College of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.

SUMMARY

This studies were carried out to investigate the effects of co-culture with cumulus cells, oviduct epithelial cells and uterine endometrium cells on the *in-vitro* fertilization and cleavage rate of bovine follicular oocytes. The ovaries were obtained from slaughtered Korean native cows. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluids from the visible follicles of diameter 3~5 mm. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones and 10% FCS for 24~48 hrs in a incubator with 5% CO₂ in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 12~18 hrs with motile capacitated sperm by preincubation.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes co-cultured with cumulus cells in TCM-199 medium were 64.0~74.1% and 40.0~58.6% respectively. And *in-vitro* fertilization rate of cumulus-enclosed oocytes(55.4%) were significantly(p<0.05) higher than cumulus-denuded oocytes(23.1%).
2. The *in-vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes co-cultured with 1×10^4 cells/ml, 1×10^6 cells/ml, 1×10^8 cells/ml and 1×10^{15} cells/ml oviduct epithelial cells in TCM-199 medium were 59.3% and 40.7%, 64.0% and 48.0%, 58.3% and 37.5%, 52.0% and 32.0%, respectively.
3. The *in-vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes co-cultured with 1×10^4 cells/ml, 1×10^6 cells/ml, 1×10^8 cells/ml and 1×10^{15} cells/ml uterine endometrium cells in TCM-199 medium were 56.0% and 36.0%, 60.7% and 42.9%, 59.3% and 37.0%, 52.0% and 36.0%, respectively.
4. When the *in-vitro* fertilized oocytes were co-cultured with cumulus cells, oviduct epithelial cells and uterine endometrium cells, the development rate to be blastocyst was 12.2%, 15.

* 日本 帶廣畜産大學(Obihiro Univ. of Agr. & Vet. Med.)

6% and 11.7%, respectively and rates were higher than that of control, 2.1%($P < 0.05$).

I. 緒 論

初期胚와 卵丘細胞, 또는 卵管 上皮細胞와의 共同培養에 의해 8~16 세포의 block stage 현상의 극복과 체외수정율의 개선 및 胚盤胞로의 발생율도 향상시킬 수 있다(Crister 등, 1986; Eystone 등, 1987; Kajihara 등, 1987; Lu 등, 1987, 1988; Eystone과 First, 1989).

Goto 등(1988)은 난구세포와 共同培養하여 胚盤胞까지 발생된 수정란을 이식하여 송아지생산에 성공하였으며, Eystone과 First(1989)는 수정후 1~8세포기의 胚를 卵管 上皮細胞와 共同培養하였을 때 배반포로의 발생율이 높다고 하였으며, Gandolfi와 Moor(1987)는 난관 단층세포가 분비한 물질에 의해, Robert 등(1975)은 난관 분비 단백질에 의해 胚發生이 촉진된다고 보고하였다. 卵丘細胞는 progesterone과 estradiol-17 β 의 2종류와 steroid hormone(Hamberger 등, 1978; Henderson 등, 1987)과 pyruvic acid(Donahue와 Stern, 1968)나 특이적 단백질(Landefeld 등, 1978)을 분비하며 卵丘細胞의 대사에 의해 배양액 중에 포함된 胚의 발육억제물질이 제거된다.

卵胞卵의 배양에 있어서 난구세포와의 共同培養은 수정율의 향상과 胚發生率 증진에 기여하며 (Crister 등, 1986; Lu 등, 1987, 1988), 卵丘細胞의 첨가농도는 1×10^6 cells/ml(Lutterbach 등, 1987), $5 \sim 7 \times 10^6$ cells/ml(Lu 등, 1987), 3×10^6 cells/ml(Xu 등, 1987), 5×10^6 cells/ml(Fukui와 Ono, 1988, 1989)로 다양하다. 한편, Motlik과 Fulka(1981)는 난구세포의 첨가가 핵성숙을 3시간 정도 지연시킨다고 하였으며, Sirard와 Bilodeau(1990)는 25×10^6 cell/ml의 첨가에서는 난포란의 성숙을 억제하며 $5 \sim 10 \times 10^6$ cell/ml 농도에서는 억제작용이 적고 25×10^6 cells/ml 농도에서는 성숙억제작용이 강하다고 보고하였다.

난포란과 子宮 上皮細胞 및 卵丘細胞와의 子宮 上皮細胞와의 共同培養은 성숙율과 수정율의 증가 및 胚盤胞로의 발생율의 향상을 가져온다고 하며, 共同培養한

胚를 이식했을때 유의하게 수태율이 높았다고 보고하였다(Kajihara 등, 1991).

이들의 보고들을 살펴보면 研究者간에 論旨가 일치하지 않을 뿐만 아니라 소 난포란과 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞의 농도에 따른 공동배양에 대한 결과는 접할 수 없었다.

이에, 본 연구는 소 卵胞卵을 이용한 體外成熟 및 受精에 있어서 배양액에 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞의 첨가가 체외성숙율과 수정율 및 배반포로의 발생율에 미치는 영향을 구명하고자 본 시험을 수행하였다.

II. 材料 및 方法

1. 卵胞卵의 回收

屠殺 韓牛의 卵巢를 摘出하여, 100IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38 $^{\circ}$ C의 生理食鹽水에 浸漬하여 2시간 이내에 옮겨, 注射器로 卵胞液을 흡입하여 watch-glass에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40 \times)하에서 卵胞卵을 回收하여 배양액으로 3회 洗滌하였다. 卵胞卵의 體外成熟 및 受精을 위한 基本培養液은 TCM-199(Whitaker, M.A., Bioproducts Co. USA)로 10%(v/v)의 FCS와 1 μ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 2 IU/ml의 HCG, 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, USA), 100 IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 培養液을 이용하였다.

2. 卵胞卵의 體外成熟 및 體外受精

卵胞卵의 체외성숙은 胚養液 50 μ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 培養 2~3시간전에 CO₂ 培養器내의 (5% CO₂, 95% air, 48.5 $^{\circ}$ C)에서 5~6시간 平衡시킨 후 小滴當 5개의 卵胞卵을 浸漬하여 24시간 培養에 의해 성숙시켰다. 體外受精은 成熟 卵胞卵을 3회 세척 후, 주위의 卵丘細胞를 pipetting에 의하여 일부 제외한 다음 mineral oil로 비복한 45 μ l의 小滴에 5개의 卵胞卵을 주입한 후, 受精用 TCF액 1 ml에 精液 0.2 ml를 혼합하여 CO₂ 培養器에서 swin-up 처리후, 上層液을 2,000 rpm으로 10分間 2回

遠心分離하여 세척하고 精子塊를 同量의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 희석하여 15分間 CO_2 培養器에서 受精能獲得을 誘起시킨 精子浮遊液 2 μl ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$)로 媒精하였다.

3. 成熟, 受精 및 發生의 判定

卵胞卵의 媒精후 24시간에 0.1% hyaluronidase (Sigma, USA)에 의해 卵丘細胞를 제거한 후 slide glass에 滴下하여 25% acetic acid에 24~48시간 固定한 다음 1% acetic-orcein으로 染色하여 成熟과 受精 與否를 判定하였으며, 또한 受精卵은 배양을 계속 하면서 12~24시간 간격으로 割球數 또는 形態學的 관찰에 의해 胚 發生을 判定하였다(Shea 등, 1976; Ball 등, 1984).

III. 結果 및 考察

1. 卵丘細胞의 添加에 따른 體外成熟 및 受精率

소 난포란의 10%의 FSH와 成熟 卵丘細胞를 첨가한 배양액에서 共同培養하였을 때 體外成熟率과 受精率은 Table 1에 나타난 바와 같다.

10% FCS와 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 의 성숙 卵丘細胞를 배양액에 첨가하여 공동배양하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 71.4%와 53.6%였으며, $1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 成熟 卵丘細胞를 첨가하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 72.4%와 58.6%였다. 또한, $1 \times 10^8/\text{ml}$ 및 $1 \times 10^{15}/\text{ml}$ 의 성숙 卵丘細胞를 첨가하여 공동배양하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 74.1%와 55.6%, 64.0%와 40.0%로서 난구세포를 $1 \times 10^{15}/\text{ml}$ 로 많이 첨가했을 때 체외수정율은 감소하였다.

한편, 24시간 배양후 媒精한 난자의 형태에 따른 체외수정율은 Table 2에 나타난 바와 같이 卵丘細胞 附

Table 1. Effects of a various concentration of cumulus cell added to culture media in *in-vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes

No. of cumulus cells /ml	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)
1×10^4	28	20(71.4)	15(53.6)
1×10^6	29	21(72.4)	17(58.6)
1×10^8	27	20(74.1)	15(55.6)
1×10^{15}	25	16(64.0)	10(40.0)

* : The number of oocytes matured to the second metaphase

Table 2. Effects of cumulus-enclosed and denudes oocytes co-cultured with cumulus cell added to culture media on *in-vitro* fertilization rate of bovine oocytes

Oocytes	Cumulus cells ($\times 10^6/\text{ml}$)	No. of examined oocytes	No. of ova fertilized(%)		
			Total	Normal	Abnormal
Cumulus-enclosed	0.0	21	19(90.5)	8(38.1)	11(52.4)
	1.0	24	21(87.5)	17(70.8)	4(16.7)
	5.0	20	19(95.0)	11(55.0)	8(40.0)
	Total	65	59(90.8)	36(55.4) ^a	23(35.4)
Cumulus-denuded	0.0	22	19(86.4)	4(18.2)	15(68.2)
	1.0	20	16(80.0)	5(25.0)	11(55.0)
	5.0	23	18(78.3)	6(26.1)	12(52.2)
	Total	65	53(81.5)	15(23.1) ^b	38(58.5)

a, b : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly($p < 0.05$)

着卵子和 裸化卵子的 体外 수정율은 각각 55.4%와 23.1%로서 유사한 증가결과를 나타냈으며($P < 0.05$), 또한 卵丘細胞 附着卵자의 体外 수정율이 높게 나타났다. 卵丘細胞 附着卵자에 대해 난구세포의 첨가는 무첨가에 비해 비교적 높은 수정율을 나타냈다.

이러한 결과는, 胚養液에 成熟 卵丘細胞를 첨가했을 때 体外成熟率 및 受精率이 향상된다고 한 Ball 등(1983) 및 Crister 등(1986)과 난구세포 부착 난자는 나화난자에 비해 성숙율과 수정율이 높다는 Leib-Fried와 First, 1979; Fukui와 Sakuma, 1980; Sirard 등, 1988) 보고와 일치하였다. 그러나, Tsafiriri 등(1976)과 Hillensjo 등(1976, 1981)은 卵胞液내에는 卵胞卵의 成熟 抑制物質이 있어 卵胞卵의 성숙을 억제한다고 報告하였으나, Nekola와 Smith(1974) 및 Jegiello 등(1977)은 卵丘細胞와 共同培養하였을 때 卵胞卵의 成熟를 억제하지 않는다고 報告하였다. 난구세포 附着卵자에 난구세포를 첨가한 배양액으로 共同培養하였을 때 体外 수정율이 향상 됨이 인정되었다.

2. 卵管 上皮細胞의 첨가에 따른 体外成熟 및 受精率

난포란의 FCS와 成熟 卵管 上皮細胞를 첨가한 배양액에서 共同培養하였을 때 体外成熟率과 受精率은 Table 3에 나타난 바와 같다.

10%의 FCS와 1×10^4 cells/ml의 卵管 上皮細胞를 첨가하여 공동배양하였을 때 体外成熟率과 受精率은 각각 59.3%와 40.7%였으며, 1×10^6 cells/ml의 卵管 上皮細胞를 첨가하여 공동배양하였을 때 体外成熟率과 受精率은 각각 64.0%와 48.0%였다. 또한, 1×10^8 cells/ml 및 1×10^{15} cells/ml의 난관 상피세포를 첨가하여 공동배양하였을 때 体外成熟率과 受精率은 각각 58.3%와 37.5%, 52.0%와 32.0%였다.

이러한 결과는 卵胞卵의 体外 수정에 있어서 卵管 上皮細胞를 첨가한 배양액에서 배양하였을 때 대조군보다 다소 증가하였으나, 난구세포의 첨가시 수정율의 증가에 비해 큰 차가 인정되었다. Eyestone과 First(1989)는 卵胞卵과 卵管 上皮細胞와 共同培養했을 때 대조군에 비해 体外 수정율이 다소 증가하였으며 体外 발생율이 높다는 보고와 다소 일치하였다. 卵管 單層細胞가 初期胚의 体外 발생 기전은 명확하게 알려져 있지 않으나, 배양액내로 난관 단층세포에 의한 發生 刺戟因子가 분비되거나 또는 배양액내의 發生抑制物

Table 3. Effects of a various concentration of oviduct epithelial cells added to culture media on *in-vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes

No. of cumulus cells/ml	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)
1×10^4	27	16(59.3)	11(40.7)
1×10^6	25	16(64.0)	12(48.0)
1×10^8	24	14(58.3)	9(37.5)
1×10^{15}	25	13(52.0)	8(32.0)

* : The number of oocytes matured to the second metaphase

Table 4. Effects of a various concentration of uterine epithelial cells added to culture media on *in-vitro* maturation and fertilization rate of bovine oocytes

No. of cumulus cells/ml	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)
1×10^4	25	14(56.0)	9(36.0)
1×10^6	28	17(60.7)	12(42.9)
1×10^8	27	16(59.3)	10(37.0)
1×10^{15}	25	13(52.0)	9(36.0)

* : The number of oocytes matured to the second metaphase

Table 5. Effects of co-culture with cumulus cells, oviduct epithelial cells and uterine endometrial cells on development rate of *in-vitro* fertilized bovine oocytes

Co-culture system	No. of oocytes	No. of oocytes developed to			
		2-4 cells	5-8 cell	9-16 cells	Blastocyst(%)
Control	143	4	18	23	3(2.1) ^a
Cumulus cells	148	10	8	18	18(12.2) ^b
OEC*	154	13	16	27	24(15.6) ^b
UEC**	145	11	12	21	17(11.7) ^b

* : Oviduct epithelial cells

** : Uterine endometrium cells

a, b : percentage followed by different letters within the same column differ significantly (p<0.05)

質을 제거함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 고찰하고 있다.

3. 子宮 內膜細胞의 添加에 따른 體外成熟率 및 受精率

난포란과 10% FCS와 子宮 內膜細胞를 첨가한 배양액에서 共同培養하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 Table 4에 나타난 바와 같다.

10%의 FCS와 1×10^4 cells/ml 子宮 內膜細胞를 첨가하여 난포란과 공동배양하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 56.0%와 36.0%였으며, 1×10^6 cells/ml의 자궁 내막세포를 첨가하였을 때의 體外成熟率과 受精率은 각각 60.7%와 42.9%였다. 또한 1×10^8 cells/ml 및 1×10^{15} cells/ml의 자궁 내막세포를 첨가하여 공동배양하였을 때 체외성숙율과 수정율은 각각 59.3%와 37.0%, 52.0%와 36.0%였다.

卵胞卵과 子宮 內膜細胞를 첨가한 胚養液에서 공동배양하였을 때 體外成熟率과 受精率은 대조군에 비해 미미한 증가를 나타냈으나 큰 차이는 인정되지 않았다. Kajihara 등(1991)은 난구세포를 이용한 體外培養系에 子宮 內膜細胞를 첨가한 경우 체외수정후 2일째에 첨가하는 것이 체외발생율에 유효하다고 보고하였다.

4. 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞의 첨가의 따른 體外發生率

난포란의 10%의 FCS와 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가한 胚養液에서 共同培養하였을 때 體外發生率은 Table 5에 나타난 바와 같다.

체외성숙 후 媒精한 148개의 난포란을 난구세포와 共同培養하였을 때 2-4세포기, 5-8세포기, 9-16세포기 및 胚盤胞로 발달한 胚의 수는 각각 4, 18, 23 및 3개였으며, 매정후 154개 및 145개의 난포란을 卵管 上皮細胞와 子宮 內膜細胞와 共同培養했을 때는 각각 13개와 11개, 16개와 12개, 27개와 21개가 발달하였다. 胚盤胞로의 발달율은 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞와 共同培養하였을 때 각각 12.2%, 15.6% 및 11.7%로서 대조구의 2.1%에 비해 유의적으로 높았다.

이러한 결과는, 卵胞卵을 체외수정후 난구세포와 共同培養하였을 때 桑實胚 및 胚盤胞로의 발생율이 Goto 등(1988)은 21.1%와 15.1%, Nakao와 Nakatsuji(1990)는 7.5%와 17.2%라고 보고 하였으며, Goto 등(1989)과 Kajihara 등(1990)은 체외수정된 난자를 난구세포와 共同培養하였을 때 각각 12.6%와 25.9% 등에 비해 비교적 낮은 성적이었다. 한편, Shi 등(1990)은 난자의 體外受精 및 發生率은 정자를 제공한 숫소의 個體差가 크다고 하였으며, Kajihara 등(1987)은 배반포로의 발생에 난구세포가 필수적이라고 하였으나 Fukuda 등(1990)은 수정후 96시간 이후에는 그 존재가 필수적이지 아니며 난구세포가 初期胚 발생에 필요한 인자를 생산한다고 보고 하였다.

IV. 摘 要

본 연구는 소 卵胞卵과 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞와의 共同培養의 體外成熟과 受精 및 배

반포로의 발생율에 미치는 영향을 구명하고자 배양액에 10% FCS와 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가하여 난포란과 初期 胚와 共同培養하였을 때 체외수정율 및 발생율은 다음과 같다.

1. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 배양액에 卵丘細胞를 첨가하여 共同培養하였을 때 체외성숙율과 수정율은 각각 64.0~74.1%와 40.0~58.6%였으며, 또한 卵丘細胞의 첨가에 따른 체외방생율은 裸化卵子에 비해 卵丘細胞 附着卵子에 유의하게 높게 나타났다($P<0.05$).
2. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 배양액에 1×10^4 cell/ml, 1×10^6 cell/ml, 1×10^8 cell/ml 및 1×10^{15} cell/ml의 卵管 上皮細胞를 첨가하여 共同培養하였을 때 체외성숙율과 수정율은 각각 59.3%와 40.7%, 64.0%와 48.0%, 58.3%와 37.5% 및 52.0%와 32.0%였다.
3. 소 卵胞卵의 體外受精에 있어서 배양액에 1×10^4 cell/ml, 1×10^6 cell/ml, 1×10^8 cell/ml 및 1×10^{15} cell/ml의 子宮 內膜細胞를 첨가하여 共同培養하였을 때 체외성숙율과 수정율은 각각 56.0%와 36.0%, 60.7%와 42.9%, 59.3%와 37.0% 및 52.0%와 36.0%였다.
4. 소 受精卵의 체외발생에 있어서 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가한 胚養液에서 初期 胚와 共同培養하였을 때 胚盤胞로의 體外發生率は 각각 12.2%, 15.6% 및 11.7%로서 대조구의 2.1%에 비해 유의적으로 높았다($p<0.05$).

V. 引用文獻

1. 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. *Boil. Reprod.*, 28:717-725.
2. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.L. Ax and N. L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 67:2775-2785.
3. Crister, E.S. M.L. Leibfried-Rutledge, W.E. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmetal competence during maturation *in vitro*. *Therionogenology*, 25:150(abstr.)
4. Donahue, R.P. and S. Stern. 1968. Follicular cell support of oocyte maturation : Production of pyruvate *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 17:395-398.
5. Eyestone, W.H., J. Vignieri and N. L. First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Therionogenology*, 27:228(abstr.)
6. Eyestone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85: 715-720.
7. Fukuda, Y., M. Ichikawa, N. Naito and Y. Toyada. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42:114-119.
8. Fukui, Y. and H. One. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Res.*, 122:282.
9. Fukui, Y. and H. One. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 86:501-506.
10. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Maturation of bovine oocytes *in vitro* : Relation to ovarian activity, follicular size and the presence of absence of cumulus cells. *Boil. Reprod.*, 22:669-673.
11. Gandolfi, F. and R.M. Moor. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, 81:23-28.
12. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Preg-

- nancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83:753-758.
13. Goto, K., Y. Kajihara, M. Koba, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci., 67:2181-2185.
 14. Hamberger, L., T. Hillensjo and K. Ahren. 1978. Steroidogenesis in isolated cells of preovulatory rat follicles. Endocrinol., 103: 771-777.
 15. Henderson, K.M., K.P. McNatty, P Smith, M. Gibb, L.E. O'Keefe, S. Lun, D.a. Heath and M.D. Prisk. 1987. Influence of follicular health on the steroidgenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. J. Reprod. Fert., 79:185-193.
 16. Hillensjo, T., S. Baumingers and K. Ahren. 1976. Effect of LH on pattern of steroid production by preovulatory follicles of PMS-injected immature rats. Endocrinol., 99:996-1002.
 17. Hillensjo, T., S. Chari, C. Magnusson, D. Duame and G. Sterm. 1981. Inhibitory effects of low molecular weight fractions of human follicular fluid upon rat granulosa cells and oocytes *in vitro*. Excerpta Media in press 1-24.
 18. Jagiello, G., J. Graffeo, M. Ducayen and R. Prosser. 1977. Further studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocyte maturation. Fert. Steril., 28:476-481.
 19. Kajihara, Y., K. Goto, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1987. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. Japan J. of Anim. Reprod., 33: 173-180.
 20. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka, Y. Koshiba, K. Hishiyama, K. Shiraiwa and K. Goto. 1990. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. Theriogenology, 33:264(abstr.)
 21. Kajuhara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka and K. Goto. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus /uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. Japan J. of Anim. Reprod., 37:177-184.
 22. Landefeld, T.D., K.L. Campbell, and A.R. Jr. Midgley. 1978. Rapid changes in the synthesis of specific ovarian granulosa cell proteins induced by human chorionogonadotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5133-5157.
 23. Leibgried, L. and N.L. Frist. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci., 48:76-86.
 24. Lu, K.H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Res., 121:259-260.
 25. Lu, K.H. I. Gordon, H.B. Chen, M. Gallagher and H. McGovern. 1988. Births of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. Vet. Res., 122:539-540.
 26. Lutterbach, A., R.A. Koll and G. Brem. 1987. *In vitro* maturation of bovine oocytes in co-culture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development. Zschthygiene, 22:145-150.
 27. Motlik, J. and J. Fulka. 1981. Fertilization of rabbit oocytes co-cultured with granulosa cells. J. Reprod. Fert., 63:425-429.
 28. Nekola, M.V. and D.M. Smith. 1974. Oocyte

- maturation and follicle cell viability *in vitro*. Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol., 4:125-131.
29. Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. Theriogenology, 30:591-600.
 30. Robert. S., G.P., J.M. Paker and H.W. Symonds. 1975. Proteins from the luminal fluid of the oviduct. J. Reprod. Fert., 45:301-313.
 31. Shea, B.F., J.P.A. Latorur, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
 32. Shi, D.S., K.H. Lu and I. Gordon. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. Theriogenology, 33:24(abstr.)
 33. Sirard, M.A. and S. Bilodeau. 1990. Live granulosa cells can maintain meiotic inhibition of bovine oocytes *in vitro*. Biol. Reprod., 42(suppl. 1):90.
 34. Sirard, M.A., J.J. Parrish, C.B. Ware, M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biol. Reprod., 39:546-552.
 35. Tsafiriri, A., S.H. Pomerantz and C.P. Channing. 1976. Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluidipartical characterization of the inhibitor. Biol. Reprod., 14:511-516.
 36. Xu, K.P., T. Greve, J. Callesen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 81:501-504.