

돼지 난모세포의 성숙과정에서 Phosphatidylinositol 대사의 기질 및 억제인자의 영향

강승률[†] · Tsujii Hirota¹ · 양보석 · 조인철 · 이성수 · 정진관 · 김영훈² · 강만종³
제주농업시험장

Influence of the Substrate and Inhibitors Related to Phosphatidylinositol Metabolism in the Maturation Processes of Porcine Oocytes

S. Y. Kang[†], H. Tsujii¹, B. S. Yang, I. C. Cho, S. S. Lee, J. K. Jung,
Y. H. Kim² and M. J. Kang³

National Jeju Agricultural Experiment Station, RDA

SUMMARY

We evaluated the effects of the substrate and inhibitors related to phosphatidylinositol metabolism on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Cumulus-oocyte complexes were cultured in mTLP-PVA medium supplemented with or without inositol (250 mM) for 46 h. Subsequently, these oocytes were inseminated with fresh boar semen in mTALP-PVA medium for 6 h. At 6h after insemination, oocytes were cultured for further 12 h in TCM-199 supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum). The higher percentage of oocytes in inositol-supplemented medium reached metaphase of the second meiotic division compared to those in control (81.4% vs. 67.3%; $P < 0.05$). Following 18 h of insemination, more number of male pronuclei were formed in the oocytes matured in inositol-supplemented medium than in those of control experiment (42.0% vs. 27.3%; $P < 0.05$). When oocytes were cultured in medium with 10mM LiCl (chloride lithium) or 0.5mM dbcAMP (dibutyl cyclic adenosine monophosphate) to determine the role of inositol on the maturation of oocytes, these two drugs inhibited the meiotic division of oocytes ($P < 0.05$). However, addition of inositol to the culture medium did overcome the inhibitory effect of these drugs on the oocyte maturation. DbcAMP and verapamil supplemented synergistically arrested the meiotic division of oocytes. Addition of verapamil did not inhibit germinal vesicle breakdown, but it severely inhibited the second meiotic division of oocytes. These results suggest that inositol exert its improving effects on maturation, by activating the PI (phosphatidylinositol) cycle and causing beneficial changes in both cytoplasm and membrane of oocytes.

(Key words : porcine oocytes, inositol, cAMP, verapamil, IVF)

¹ 일본 신주대학 생물자원학과(Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University Japan)

² 제주도축산진흥원(Jeju Provincial Institute for Livestock Promotion)

³ 전남대학교 동물자원학부(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chonnam National University Korea)

[†]Correspondence : 제주농업시험장(National Jeju Agriculture Experiment Station, RDA)

서론

최근, 세포의 증식 및 정보전달과정에서 PI (phosphatidylinositol)의 대사계가 중요한 역할을 하고 있다는 것이 여러 연구에서 구명되었다. 이 PI정보는 Ca^{2+} , PKC (protein kinase C)활성을 높여 세포 증식 등 세포반응을 유기시킨다(Nishizuka, 1986). 또한 일반 체세포에서 inositol은 세포용적 및 삼투압을 제어하는 기능이 알려져 있다(Kleinzeller와 Ziyadeh, 1990; McConnel과 Goldstein, 1990; Strange 등, 1991). 한편, 난소에 있어서도 PI대사계가 존재한다는 것이 밝혀졌는데, 즉 LH는 난소세포에 Ca^{2+} 유입을 유도하고(Veldhuis와 Klase, 1982), 돼지 및 쥐의 난소 과립층세포에서 LH의 작용으로 phosphoinositide가 생성(Davis 등, 1984, 1986; Dimino 등, 1987)되며, Ca^{2+} 는 스테로이드호르몬 생성에 관여(Tsang과 Carnegie, 1984; Veldhuis 등, 1984)하는 등 다수의 연구결과가 보고되었다. 그리고 자궁 및 난관액 중에도 고농도의 inositol이 함유되어 있다고 보고(Gregoire 등, 1962; Lewin 등, 1982)되었고, 배의 체외배양 연구에서 inositol은 토끼 배반포배의 성장 및 햄스터 배반포배의 hatching을 촉진한다는 연구보고가 있다(Kane, 1988; Kane과 Bavister, 1988). 그러나 돼지 난모세포의 성숙 및 수정에 미치는 inositol의 영향에 대한 연구보고는 없다.

체세포의 증식과정에 있어서 LiCl (chloride lithium)은 PI대사를 저해한다(Berridge 등, 1989; Hanson, 1991; Navidi 등, 1991). 즉, LiCl은 phosphoinositide의 분해효소를 저해하여 inositol의 생성(Gee등, 1988; Majerus 등, 1988; Berridge 등, 1989)과 난모세포의 성숙과정에서 LiCl은 불가사리 및 마우스의 난모세포의 성숙을 억제한다(Picard와 Dore'e, 1983; Pondaven과 Mejier, 1986; Pesty 등, 1994). 따라서 inositol이 결손되거나 부족하면 IP_3 , DAG와 같은 제 2차 정보전달물질의 생산이 저하되어 세포증식, 생식세포의 성숙과정 등이 지연 또는 억제된다고 생각된다.

이를 뒷받침해 주는 여러 연구결과를 보면, 마우스에 있어서 IP_3 (inositol triphosphate)의 작용에

의한 Ca^{2+} 의 상승이 난모세포의 성숙분열이 촉진되고 (Peres 등, 1991; Carroll과 Swann, 1992), 소에서는 cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 분해효소 억제제인 IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine)로 성숙이 정지되어 있는 난모세포에 IP_3 를 미세주입하면 성숙이 진행된다(Homa 등, 1991). 마우스에 있어서 Ca^{2+} -channel 저해제인 verapamil은 dbcAMP (dibutyryl cyclic adenosine monophosphate)와 상승작용을 하여 난모세포의 성숙을 완전히 억제한다(Powers와 Paleos, 1982). 이와 같은 연구보고를 미루어볼 때, cAMP에 의한 성숙정지가 IP_3 또는 Ca^{2+} 에 의해 해제된다는 것을 의미한다. 따라서, inositol첨가에 의해 PI대사계가 활성화되면 이로부터 IP_3 및 Ca^{2+} 가 생성되어 이들 제 2차 정보전달물질이 난모세포의 성숙을 촉진하거나 또는 성숙관련 다른 대사물질을 활성화시킨다고 사료된다.

돼지 난포세포에 있어서 PI대사가 일어난다는 보고가 있고(Dimino 등, 1987), PI대사과정에서 IP_3 와 DAG (diacylglycerol)이 생성된다 (Nishizuka, 1986). 따라서, 난포체세포를 대체하여 PI의 기질인 inositol을 성숙배지에 사용함으로써 체외배양한 난모세포의 성숙율을 개선하는 것이 가능하다고 사료된다.

본 연구에서는 inositol이 난모세포의 성숙에 미치는 영향과 작용을 구명할 목적으로, 실험 1은 inositol이 난모세포의 성숙·수정에 미치는 영향, 실험 2는 inositol첨가가 LiCl 및 dbcAMP에 의한 난모세포의 성숙억제에 미치는 영향, 실험 3은 난모세포의 성숙에 있어서 dbcAMP와 verapamil의 영향, 실험 4에서는 verapamil이 난모세포의 GVBD (germinal vesicle breakdown) 및 M II 비율에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 공시한 난소는 식육센터에서 도축된 9~12개월령의 돼지(랜드레이스×대요크셔)에서 채취하여 37~39°C의 kanamycin첨가 생리식염수 (0.9% NaCl + 100mg kanamycin sulfate/L, Sigma)에 침지하여 연구실로 운반한 후, 생리식염수로 3회

세척한 것을 사용하였다.

1. 난모세포의 체외성숙

1) 난모세포 채취

21G추사침(Terumo Co., Tokyo, Japan)을 부착한 5 ml주사기(Nipro, Osaka, Japan)를 사용하여 직경 2~5 mm의 난포로부터 난포내용물을 10 ml 시험관에 흡인채취하였다. 시험관의 상층액은 난포액(pFF) 조제용으로 사용하였고, 침전물은 Hepes TALP-PVA액으로 희석하여 현미경하에서 난모세포를 2회 세척하면서 난구세포층이 3층 이상이며 세포질이 균일한 난모세포만을 체외성숙 배양에 공시하였으며, 배양전에는 난모세포를 성숙배지로 2회 세척한 후 15~20개를 1군으로 하여 배양하였다.

2) 체외성숙 배양

성숙배양은 Yoshida 등(1993)의 방법에 따라 mTLP-PVA배지에 10IU PMSG(Teikoku Zoki Co., Tokyo)/ml, 10IU hCG(Sankyo Co., Tokyo)/ml, 1 µg E₂(Sigma)/ml, 10%(v/v) FBS(JRH. Biosciences) 및 10%(v/v) pFF를 첨가하여 플라스틱 dish(35×13mm, Iwaki Glass, Japan)를 사용하여 38°C, 5% CO₂-95%공기의 기상조건에서 난모세포를 46시간 배양하였다. 실험구인 경우 inositol(Nakarai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)은 농도검정 결과 250 µM, LiCl 농도는 Pesty 등(1994)의 보고에 준하여 10mM, dbcAMP 및 verapamil은 농도검정 결과에 따라 각각 0.5mM, 0.3mM을 사용하였다.

3) 난모세포의 성숙판정

성숙배양이 완료된 일부의 난모세포를 고정액(ethanol : acetic acid = 3 : 1)으로 약 48시간 고정한 후, 1% orcein액으로 염색하여 위상차현미경으로 핵상을 관찰하여 제 2성숙분열중기(M II)에 있는 것을 성숙난자로 판정하였으며 나머지 난모세포는 체외수정에 공시하였다.

2. 난모세포의 체외수정

1) 정액 및 정자처리

체중 약 200kg의 랜드레이스에서 채취한 사출정액을 이용하였다. 원심분리로 정장을 제거한 정자를 BSA(100mg/L) 및 kanamycin sulfate(100mg/L)를 첨가한 생리식염수로 500g, 5분간 원심분리로 2회 세척한 후, 5×10^7 /ml이 되도록 생리식염수로 희석하여 수정에 공시하였다.

2) 체외수정

BSA(3mg/ml) 및 caffeine(2mM)을 첨가한 mTALP-PVA액을 수정배지로 사용하였다. 성숙배양이 완료된 난모세포를 수정배지로 2회 세척한 후, 수정배지 소적(0.1ml)에 10~15개의 난모세포를 넣어 최종 정자농도가 $2.5 \sim 5 \times 10^4$ /ml(Yoshida 등, 1994)이 되도록 매정하여 난모세포의 성숙배양과 같은 배양조건하에서 6시간 체외수정시켰다. 체외수정후 6시간째에 난모세포의 표면에 부착한 정자 및 난구세포를 유리피펫으로 제거한 후, 수정난자를 발생배지(mTCM-199 + 10% FBS)로 2회 세척하여 12시간 동안 배양하였다.

3) 수정판정

체외수정 후 18시간째에 난모세포를 고정액으로 2~3일간 고정하여 1% orcein으로 염색한 후 현미경 관찰을 하였다. 성숙한 난자내에 팽창된 정자두부 또는 정자미부가 일치하는 응성전핵이 관찰되었을 때 정자침입난(penetration), 단정자침입란(monospermy)은 난자내 1개의 정자 또는 응성전핵이 관찰되었을 때, 성숙한 난자내에 1개의 정자만 침입하여 전핵이 형성된 것을 응성전핵(male pronucleus)이 형성된 난자로 판정하였다.

3. 실험구

1) Inositol이 돼지 난모세포의 체외성숙·수정에 미치는 영향

체외 성숙 및 수정에 각각 189, 167개의 난모세포를 공시하여 5회 반복실험을 하였다.

2) LiCl 및 dbcAMP의 성숙억제작용에 대한 inositol의 성숙억제 해제효과

384개의 난모세포를 공시하여 4회 반복실험을

하였다.

3) 난모세포의 성숙에 있어서 dbcAMP와 verapamil의 영향

597개의 난모세포를 사용하여 4회의 반복실험을 하였다.

4) Verapamil이 난모세포의 성숙분열재개 (GVBD) 및 제 2성숙분열중기로의 성숙을 (MII)에 미치는 영향

650개의 난모세포를 공시하여 4회의 반복실험을 하였다.

4. 통계처리

결과는 4~5회의 평균치±표준오차로 나타났다. Data는 t-test에 의해 비교하고, 분산은 Cochran-Cox 검정법을 이용하여 비교하였다.

결 과

Inositol이 돼지 난모세포의 체외성숙·수정에 미치는 영향(실험 1)에 대한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 대조구(67.3%)에 비해 inositol(81.4%)첨가에 의해 난모세포의 성숙율이 유의($P < 0.05$)하게

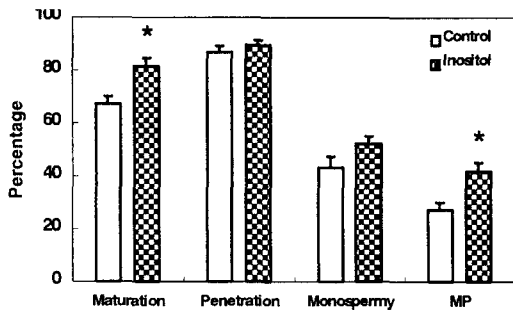


Fig. 1. Effect of inositol on the maturation and fertilization of porcine oocytes. Oocytes matured in medium with or without inositol(0.25mM) for 46h were inseminated for 6h and further cultured for 12h(5 replicates, 10~20 oocytes/replicate). MP; male pronucleus. Asterisks indicate significant difference from control($p < 0.05$).

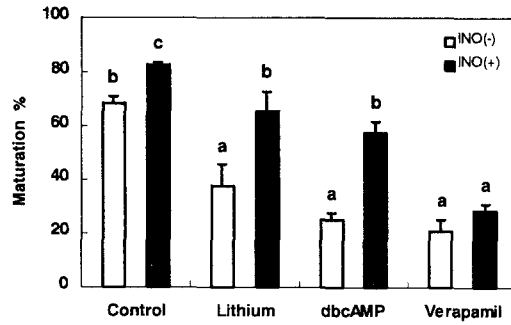


Fig. 2. Influence of inositol on the inhibitory effect of lithium, dbcAMP and verapamil in oocyte maturation. Oocytes were cultured for 46h in medium containing lithium dbcAMP or verapamil with or without inositol(3~4 replicates, 10~20 oocytes/replicate). ^{a,b,c} Means with different superscript letters are significantly different from each other($P < 0.05$).

높았다. 정자침입율은 대조구(86.9%)와 inositol 첨가구(89.5%)간에 유의차는 인정되지 않았다. 단정자수정율은 대조구(43.3%)와 비교해서 inositol 첨가구(52.2%)가 높았으나 유의차는 없었다. 그러나 응성전핵형성율은 inositol 첨가구(42.0%)가 대조구(27.3%)보다 유의($P < 0.05$)하게 높았다.

LiCl 및 dbcAMP의 성숙억제 작용에 대한 inositol의 성숙억제 해제효과(실험 2)에 대해 Fig. 2에 나타났다. 성숙율은 대조구(68.0%)보다 inositol 첨가구(82.6%)가 유의($P < 0.05$)하게 높았다. LiCl, dbcAMP, verapamil첨가구의 성숙율은 각각 37.5, 25.0, 21.0%로 대조구보다 유의하게 낮았다. 그러나 LiCl(65.1%), dbcAMP(57.4%)에 inositol을 첨가함으로써 성숙율이 개선되어 이들 억제물질을 첨가하지 않은 대조구와 비교하였을 때 유의차가 인정되지 않았다. 그러나 verapamil인 경우 여기에 inositol을 첨가하여도 성숙율은 개선되지 않았다.

난모세포의 성숙에 있어서 dbcAMP와 verapamil의 영향(실험 3)에 대한 결과를 Fig. 3에 나타났다. 대조구(71.2%)에 비해 dbcAMP를 0.5mM 이상 첨가(38.5% 이하)하거나 verapamil을 0.3mM 첨가(27.6% 이하)하였을 때, 성숙율은 유의($P < 0.05$)하게 낮았으며, dbcAMP첨가 배지에 verapamil을

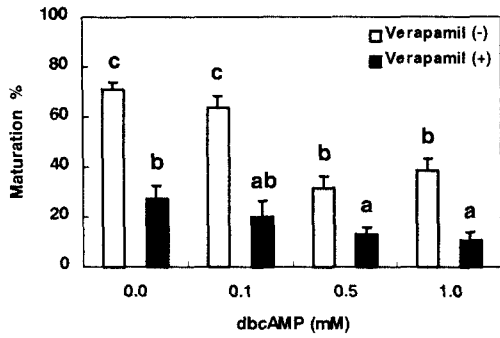


Fig. 3. Effect of dbcAMP and verapamil on the maturation of oocytes. Oocytes were cultured for 46h(4 replicates, 10~20 oocytes/replicate). ^{a,b,c} Means with same superscript letters are not significantly different from each other(p<0.05).

추가 첨가하였을 때, dbcAMP 첨가농도가 증가할수록 난모세포의 성숙이 유의(P<0.05)하게 억제되어 이들 2물질은 돼지 난모세포의 성숙과정에서 상승작용을 나타냈다.

Verapamil이 난모세포의 성숙분열재개(GVBD) 및 제 2성숙분열중기(MII)에 미치는 영향(실험 4)에 대한 결과를 Fig. 4에 제시하였다. 난모세포의

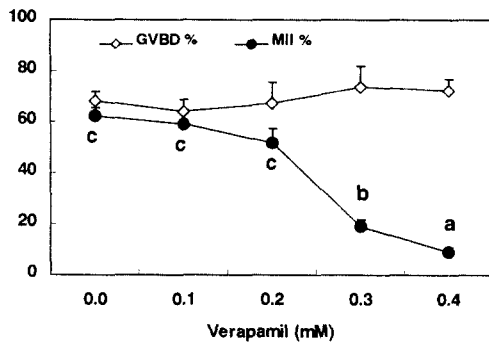


Fig. 4. Effect of verapamil on the rates of GVBD and MII of oocytes. Oocytes were cultured for 24h(GVBD evaluation) or 46h (MII evaluation) in verapamil-containing medium(4 replicates, 10~20 oocytes/replicates). ^{a,b,c} Means with different letters are significantly different from each other(p<0.05).

성숙분열재개(GVBD)는 대조구와 verapamil첨가구간에 유의차가 없었으나, 제 2성숙분열중기로의 성숙율은 대조구 및 verapamil 0.1, 0.2mM 첨가구에 비교해서 0.3, 0.4mM첨가구가 유의(P<0.05)하게 낮아 verapamil의 첨가농도가 높을수록 난모세포의 성숙이 억제되었다.

고찰

실험 1에 있어서, 성숙배양시에 무첨가구에 비해 inositol 첨가에 의해 난모세포의 성숙율 및 체외수정후의 응성전핵 형성율이 유의하게 높았다. 이 결과는 Pesty 등(1994)이 마우스 난모세포의 성숙배양에 inositol을 사용하여 성숙율이 대조구에 비해 높아졌다는 보고와 일치하였으며, 응성전핵 발달에 대해서는 본 연구에서 성숙배양시에 inositol을 첨가함으로써 난모세포의 세포질성숙이 향상되어 이 결과로 인해 응성전핵형성율이 높은 것으로 사료된다. Inositol은 PI cycle에 있어서 중요한 기질이며 돼지에 있어서도 난포체세포에서 LH 작용에 의해 phosphoinositides(IP, IP₂, IP₃)가 생성(Ben-Yosef 등, 1992)되어 IP₃는 난모세포내의 Ca²⁺수준을 높인다. 이 결과 Ca²⁺에 의해 cAMP 등에 의한 성숙억제가 해제되어 성숙분열이 재개되어 제 1성숙부열중기를 거쳐 제 2성숙분열 중기로 성숙이 진행된다(Homa 등, 1991; Peres 등, 1991; Carroll과 Swann, 1992). 따라서, 본 연구의 결과로부터 성숙배지에 inositol을 첨가함으로써 난모세포-난모세포 복합체에서 PI대사가 활성화되어 생성된 제 2차 정보전달물질의 관련에 의해 성숙 및 응성전핵 형성율이 높아진 것으로 추정된다.

실험 2에서 cAMP의 analogue인 dbcAMP 및 PI 대사 저해제인 LiCl과 inositol의 상호 관련성을 조사한 결과, dbcAMP 또는 LiCl을 첨가하면 난모세포의 성숙이 억제되지만 inositol을 추가로 첨가하면 성숙율은 대조구의 수준까지 향상되었다. 마우스(Peres 등, 1991; Carroll과 Swann, 1992)와 소(Homa 등, 1991)에서 cAMP에 의한 난모세포의 성숙정지는 Ca²⁺에 의해 해제된다. 본 실험에서 inositol첨가에 의해 dbcAMP에 의한 성숙억제가 해제

되어 성숙분열이 재개된 것으로 판단되며 이 결과는 마우스와 소에서 보고한 결과와 일치한다. 사실 Fujihara 등(1993)은 마우스를 이용한 연구에서 난모세포에 PI대사계가 존재한다고 보고하였다. 이런 결과들과 본 연구 결과에 대하여 종합적으로 미루어 볼 때, 돼지 난모세포의 성숙과정에 있어서도 체세포에서와 마찬가지로 PI대사계가 존재하고 이것이 성숙과정에 관여하는 것으로 사료된다. 즉, Inositol의 효과는 inositol 첨가에 의해 PI대사계가 활성화되어 여기에서 생성된 IP_3 , Ca^{2+} 등에 의해 성숙분열이 재개된다고 본다.

LiCl은 PI대사계를 억제(Berridge 등, 1989; Hanson, 1991; Navidi 등, 1991)하여 inositol의 생성을 저해한다(Majerus 등, 1988; Gee 등, 1988; Berridge 등, 1989). 본 실험에서 LiCl첨가에 의해 난모세포의 성숙율이 떨어졌지만 여기에 inositol을 첨가하면 성숙율은 대조구 수준까지 개선되었다. 즉, 이 결과에서도 돼지 난모세포의 성숙에는 inositol이 중요하게 관여한다는 것이 시사되었다. 또한 포유류의 난모세포에서는 연구보고된 결과가 없지만, 개구리 배세포에서 inositol이 LiCl을 착화(chelation)하여 그 작용을 억제함으로써 배의 발생을 촉진시킨다고 Busa와 Gimlich(1989)가 보고한 바와 같이 본 연구에서 사용한 inositol의 기능으로서 금속이온 등에 대한 착화작용도 있을 것으로 생각할 수 있다.

실험 3에서는 inositol의 효과가 PI대사계에서 생성된 IP_3 및 Ca^{2+} 작용에 의한 것인지에 대해 간접적으로 조사할 목적으로, cAMP의 analogue인 dbcAMP 및 Ca^{2+} -channel 저해제인 verapamil의 난모세포의 성숙에 미치는 영향에 대해 검토하였다. dbcAMP의 단독첨가구에 비해 여기에 verapamil을 추가로 첨가하였을 때, 난모세포의 성숙은 3배 이하로 떨어졌다. 또한 dbcAMP의 농도가 높을수록 난모세포의 성숙율은 저하되었다. 이런 결과로부터 본 실험에서의 inositol의 효과는 inositol첨가에 따른 PI대사계의 활성화 및 이 대사계에서 생성된 IP_3 및 Ca^{2+} 의 작용에 의한 것으로 간접적인 추측이 가능하다.

실험 4에서 verapamil은 성숙분열의 재개에는 영향이 없었지만 이후 제 2감수분열 중기까지의

성숙에는 유의하게 악영향을 미쳤다. 이런 결과는 GVBD 이후의 성숙단계에는 외부로부터의 Ca^{2+} 유입이 필요하는 것을 의미한다. 본 실험에서 난모세포의 성숙에 대한 verapamil의 영향은 난모세포내로 Ca^{2+} 유입이 차단되어 성숙이 억제된다고 보고한 Kaufman과 Homa(1993)의 결과와 일치한다.

이상 본 연구의 결과로부터, inositol첨가에 의해 난모세포의 성숙 및 체외수정 후의 응성전핵의 발달이 향상되었다는 것이 판명되었으며, 이것은 inositol첨가에 의해 난구세포에서의 PI대사가 활성화된 결과에서 비롯된 것으로 사료되었다.

적 요

본 연구는 phosphatidylinositol 대사의 기질 및 억제물질이 돼지 난모세포의 체외 성숙·수정에 미치는 영향에 대하여 실험을 하였다. 난모세포를 inositol (250 mM) 첨가 또는 무첨가한 mTLP-PVA 배양액에서 46시간 체외배양하였다. 성숙이 완료된 난모세포는 신선 돼지정액을 이용하여 6시간 동안 mTALP-PVA배양액에서 체외수정을 시켰다. 수정 후 6시간에 이들 난모세포를 10% 혈청을 첨가한 TCM-199배양액에서 추가로 12시간 배양하였다. 제 2성숙분열중기로 성숙한 난모세포의 비율은 대조구 (67.3%)에 비하여 inositol (81.4%)을 첨가하여 46시간 체외성숙시킨 난모세포에서 더 높았다 ($P<0.05$). 체외수정 후 18시간에 응성전핵형성율은 대조구의 27.3%보다 inositol (42.0%)을 첨가한 배지에서 성숙시킨 난모세포에서 더 높게 나타났다 ($P<0.05$). 난모세포의 성숙에 대한 inositol의 작용을 조사하기 위하여 LiCl (10 mM) 또는 dbcAMP (0.5 mM)를 첨가한 배지에서 난모세포를 배양하였을 때, 이들 두 약제는 난모세포의 성숙을 억제하였다 ($P<0.05$). 그러나 이 두 약제의 억제작용은 inositol첨가에 의해 해제되어 대조구 수준까지 성숙율이 개선되었다. DbcAMP와 verapamil은 상승작용을 하여 난모세포의 성숙을 억제하였다. Verapamil을 단독으로 첨가하였을 때, 난모세포의 성숙분열 개시에는 영향이 없었으나 제 2성숙분열중기로의 성숙은 억제되었다. 이상의 결과로부터, inositol첨가에 의해 PI-cycle이 활성화되

어 난모세포의 핵 및 세포질 성숙과 막의 변화가 유도되어 난모세포의 성숙이 inositol첨가에 의해 개선되었다는 것이 시사되었다.

참고문헌

- Ben-Yosef D, Galiani D, Dekel N and Shalgi R. 1992. Rat oocytes induced to mature by epidermal growth factor are successfully fertilized. *Mol. Cell Endocrinol.*, 88:135-141.
- Berridge MJ, Downes CP and Hanley MR. 1989. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell*, 59:411-419.
- Carroll J and Swann K. 1992. Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol triphosphate occur during *in vitro* maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.*, 267:11196-11201.
- Davis JS, West LA and Farese RV. 1984. Effects of luteinizing hormone on phosphoinositide metabolism in rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, 259:15028-15034.
- Davis JS, Weakland LL, West LA and Farese RV. 1986. Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol triphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. *Biochem. J.*, 238: 597-604.
- Dimino MJ, Snitzer J and Brown K. 1987. Inositol phosphates accumulation in ovarian granulosa after stimulation by luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 37:1129-1134.
- Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H and Miyazaki S. 1993. Development of inositol triphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev. Biol.*, 156:69-79.
- Gee NS, Reid GG, Jackson RG, Barnaby RJ and Ragan CI. 1988. Purification and properties of inositol-1, 4-biphosphatase from bovine. *Biochem. J.*, 253:777-758.
- Gregoire AT, Gongsakdi D and Rakoff AE. 1962. The presence of inositol in genital tract secretions of the female rabbit. *Fertil. Steril.*, 13:432-435.
- Hanson BA. 1991. The effects of lithium on the phosphoinositides and inositol phosphates of *neurospora crassa*. *Exp. Mycol.*, 15:76-90.
- Homa ST, Webster SD and Russell RK. 1991. Phospholipid turnover and ultrastructural correlates during spontaneous germinal vesicle break-down of the bovine oocytes : Effects of cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. *Dev. Biol.*, 146:461-472.
- Kane MT. 1988. The effects of water soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts. *J. Exp. Zool.*, 245:220-223.
- Kane MT and Bavister BD. 1988. Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 39:1137~1143.
- Kaufman ML and Hma ST. 1993. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *J. Exp. Zool.*, 265:69-76.
- Kleinzeller A and Ziyadeh FN. 1990. Cell volume regulation in epithelia with emphasis on the role of osmolytes and the cytoskeleton. In: Beyenbach, K.W. [eds.] *Cell Volume Regulation*, pp. 59-86. Karger, Basel.
- Lewin LM, Yannai Y, Melmed S and Weiss M. 1982. Myo-inositol in the reproductive tract of the female rat. *Int. J. Biochem.*, 14:147-150.
- Majerus PW, Connolly TM, Bansal VS, Inhorn RC, Ross TS and Lips DL. 1988. Inositol phosphates: synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.*, 263:3051-3054.
- McConnell F and Goldstein L. 1990. Volume regulation in elasmobranch red blood cells. In: Beyenbach, K. W. [eds.] *Cell Volume Regulation*, pp. 114-131. Karger, Basel.
- Navidi M, Yoa FG and Sun GY. 1991. Brief

- chronic effects of lithium administration on rat brain phosphoinositides and phospholipids. *J. Neurosci. Res.*, 28:428-433.
- Nishizuka Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233:305-312.
- Peres A, Bertollini L and Racca C 1991. Characterization of Ca^{2+} transients induced by intracellular photorelease of $InsP_3$ in mouse ovarian oocytes. *Cell Calcium*, 12:457-465.
- Pesty A, Lefevre B, Kubiak J, Geraud G, Tesarid J and Maro B. 1994. Mouse oocyte maturation is affected by lithium via the polyphosphoinositide metabolism and the microtubule network. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:187-199.
- Picard A and Doree M. 1983. Lithium inhibits amplification or action of the maturation-promoting factor (MPF) in meiotic maturation of starfish oocytes. *Exp. Cell Res.*, 147:41-50.
- Pondaven P and Meijer L. 1986. Protein phosphorylation and oocyte maturation. I. Induction of starfish oocyte maturation by intracellular microinjection of a phosphatase inhibitor, alpha-naphthyl-phosphate. *Exp. Cell Res.*, 163:477-488.
- Powers RD and P GA. 1982. Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 66:1-8.
- Strange K, Morrison R, Heilig CW, DiPietro S and Gullans SR. 1991. Upregulation of inositol transport mediates inositol accumulation in hyperosmolar brain cells. *American Journal of Physiology*, 260:784-790.
- Tsang BK and Carnegie JA. 1984. Calcium dependent regulation of progesterone production by isolated rat granulosa cells: Effects of the calcium ionophore A23187, prostaglandin E_2 , diisoproterenol and cholera toxin. *Biol. Reprod.*, 30:787-794.
- Veldhuis JD and Klase PA. 1982. Mechanisms by which calcium ions regulate the steroidogenic actions of luteinizing hormone in isolated ovarian cells *in vitro*. *Endocrinol.*, 111:1-6.
- Veldhuis FD, Klase PA, Demers LM and Chafouleas JG. 1984. Mechanisms subserving calciums modulation of luteinizing hormone action in isolated swine granulosa cells. *Endocrinol.*, 114:441-449.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigake K, Kojima T and Nagai T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 39:1303-1311.

(접수일: 2001. 6. 18 / 채택일: 2001. 7. 31)