

사람 난자-난구 복합체 ECM의 Gelatinase

이인선 · 나경아 · 김해권[†]

서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과

Gelatinases of Extracellular Matrix of Human Oocyte-Cumulus Complex

Insun Lee, Kyoung-Ah Na and Haekwon Kim[†]

Department of Biotechnology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

요 약 : 포유동물의 난포내 난자의 성숙 시에는 난자를 둘러싸고 있는 난구세포의 확장 현상이 일어나는데 이 현상에는 hyaluronic acid 뿐만 아니라 다른 성분도 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 조직 재구성 과정에서 중요한 역할을 하는 matrix metalloproteinase(MMP)가 사람의 성숙한 난자-난구 복합체의 extracellular matrix(ECM)에 존재하는지의 여부를 알아보고자 하였다. 체외수정 시술 시에 얻어지는 사람의 난자-난구 복합체를 재료로 zymography와 western blotting 방법으로 조사한 결과 난자-난구 복합체의 ECM에는 300kDa, 240kDa, 200kDa, 180kDa, 116kDa, 97kDa, 그리고 84kDa의 분자량을 갖는 적어도 7종류의 gelatinase들이 존재하는 것이 관찰되었다. 이들 gelatinase가 MMP인지를 확인하기 위해 zymography 동안에 ethylenediaminetetraacetic acid 혹은 phenanthroline 등의 MMP 억제제를 처리한 결과 7종류 모두의 gelatinase 효소활성이 사라졌다. 또한 MMP의 활성제인 aminophenylmercuric acetate를 zymography를 시행하기 전에 ECM에 처리한 결과 200kDa, 180kDa, 97kDa, 84kDa의 gelatinase 활성이 사라지고, 대신에 80kDa, 65kDa, 60kDa의 분자량을 갖는 새로운 gelatinase 단백질의 효소활성이 나타났다. 이로 미루어 사람 난자-난구 복합체의 ECM에는 여러 종류의 gelatinase들이 있으며 이들 중 일부는 MMP-2와 MMP-9의 동위효소들인 것으로 여겨진다.

ABSTRACT : When mammalian oocytes undergo maturation, cumulus cells surrounding the oocyte exhibit remodeling of their structure known as cumulus expansion. Many molecules including hyaluronic acid participate in this remodeling. The present study aimed to investigate a possible existence of matrix metalloproteinases(MMPs) in the extracellular matrix(ECM) of human oocyte-cumulus complex. ECM was extracted from the human oocyte-cumulus complex. Gelatin gel zymogram of ECM exhibited 7 gelatinases having molecular weight of 300kDa, 240kDa, 200kDa, 180kDa, 116kDa, 97kDa, and 84kDa. This gelatinase profile was very different from that of ovarian mural granulosa cell extract or white blood cell extract, indicating that the oocyte-cumulus complex donating ECM was free from other than cumulus cells. When ethylenediaminetetraacetic acid or 1', 10'-phenanthroline was added to the reaction buffer during zymographic development, almost gelatinase activities were abolished, suggesting that they were MMPs. Following incubation of ECM in the presence of aminophenylmercuric acetate, an activator of proMMPs, 4 gelatinases of 240kDa, 180kDa, 97kDa, and 84kDa disappeared with the concomitant appearance of 80kDa, 65kDa, and 60kDa gelatinases. Based upon these observation, it is suggested that ECM of the human oocyte-cumulus complex consists of gelatinases, presumed to be MMP-2 and MMP-9 isoforms.

Key words : Gelatinase, Human, Oocyte-cumulus complex, ECM.

서 론

포유류의 난포내 난자의 성장은 각각 한 층으로 이루어진 난포 과립세포와 mesenchymal thecal cells로 구성된 원시 난포

이 연구는 2000년도 서울여자대학교 교내학술연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

[†]교신저자: 서울시 노원구 공릉 2동, 서울여자대학교 자연과학대학 생명공학과. (우) 139-774, (전) 970-5665, (팩) 970-5669, E-mail: hwkim@swu.ac.kr

에서부터 시작된다. 원시난포가 난포세포의 유사분열에 의해 성장하면 동시에 난자의 성장도 함께 이루어진다. 난포가 충분히 성장하면 난포내에는 혈액의 여과물과 난포세포의 분비물로 이루어진 난포액으로 채워지는 antrum이 형성되고 이 때 체적은 400~500배 정도 증가하는 성숙난포(Graafian follicle)가 된다. 성숙난포내에는 성장이 완료된 난자가 몇 개의 층으로 이루어진 난구세포에 둘러싸여 난포의 한쪽 가장 자리에 위치하게 된다. LH 호르몬에 의해 난포내 난자가 성숙이 될 때 이 난구세포의 대부분은 hyaluronic acid를 분비하여 난자 주위에 확장된 상태 즉 corona radiata를 형성하며 대

부분의 포유동물의 경우 성숙난자가 배란될 때에는 이 난자-난구 복합체가 난포액의 일부와 함께 수란관내로 들어가게 된다(Hunter et al., 1988).

원래 체적의 20배에 달하는 난구세포의 확장 현상은 종에 따라 다르지만 FSH 혹은 PMSG 호르몬과 혈청 혹은 난포액 성분(Salustri et al., 1999)이 필요하며 소나 돼지의 난자(Ralph et al., 1995; Nagyova et al., 1999)와는 달리 생쥐의 경우에는 이외에 난자로부터 분비되는 분비물이 필요하다(Buccione et al., 1990; Vanderhyden, 1993). 그리고 확장을 일으킨 난자-난구세포의 복합체는 hyaluronic acid를 주성분으로 하여 여러 가지 물질이 extracellular matrix(ECM)를 이루는 것으로 알려져 있는데 이 ECM은 배란 시에 난포벽으로부터 난자-난구 복합체의 분리, 난포로부터의 탈출 특히 수란관에 의한 배란된 복합체의 포획을 용이하게 하는 것으로 여겨진다(Lam et al., 2000). 또한 ECM은 정자와의 수정을 도와주는 것으로 추측되고 있다(Tesarik et al., 1988; Hess et al., 1999).

대부분의 포유동물의 조직은 일생을 두고 조직재구성을 일으키며 이를 위해서는 조직의 주성분인 extracellular matrix(ECM)의 재구성이 반드시 수반되어야 한다. ECM의 분해는 주로 plasmin과 같은 단백질 분해효소와 대체로 기질특이성을 나타내는 matrix metalloproteinase(MMP)에 의해 분해된다. Plasmin/plasminogen/plasminogen activator(PA)는 현재까지 urokinase-type PA와 tissue-type PA의 두 종류가 알려져 있다(Hart & Rehemtulla, 1988). 흰쥐 및 돼지의 난자-난구 복합체는 체외에서 성숙 및 확장현상을 일으키는 동안 두 종류의 PA 모두를 합성 분비하는데 특히 흰쥐의 복합체의 체외배양 시에 FSH 호르몬을 투여하면 tissue-type PA의 활성이 현저하게 증가한다(Liu & Hsuch., 1987). 또한 소의 난자-난구 복합체도 체외에서 성숙하는 동안 두 가지 PA를 체외에서 합성 분비한다(Park et al., 1999). 비록 난자-난구 복합체의 확장 현상 시에 PA가 수행하는 구체적인 역할에 관해서는 아직 알려진 바 없으나 이러한 연구 결과들로 미루어 난구세포의 확장현상은 난자 및 난구세포 주위의 ECM의 재구성에 의해 이루어지는 것으로 여겨진다.

Matrix metalloproteinase는 현재 20종류 이상의 구조적으로 유사한 효소들이 알려져 있다. 이들은 collagenases, gelatinases, stromelysins, 그리고 membrane-associated metalloproteinases의 4가지로 구분되는데 이 중 gelatinase로는 MMP-2인 gelatinase A와 MMP-9인 gelatinase B가 알려져 있다. 이 두 gelatinase들은 모두 collagen fragment와 type IV collagen, laminin, fibronectin과 같은 basement membrane의 주요 구성성분을 분해한다(Zhu & Woessner, 1991). 포유동물 난소의 조직

재구성과 관련하여 MMP는 난포조직의 성장, 배란, 황체화 그리고 luteolysis를 포함하는 folliculogenesis에 있어서 중요한 역할을 수행하며 이는 여러 종의 동물들을 대상으로 한 실험에서 관찰된 바 있다(Curry & Osteen, 2001). 특히 사람(Kim et al., 2001a)과 소(Kim et al., 2001b)의 난포액 내에 존재하는 MMP 및 MMP의 isoform들의 종류가 서로 비슷하다는 사실은 두 종의 난포의 분화기작이 유사하다는 것을 간접적으로 시사한다. 그러나 난포세포와 난포액과는 달리 난자-난구 복합체 ECM의 MMP에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며 특히 사람의 난자-난구 복합체에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.

본 연구에서는 사람의 난자-난구 복합체(oocyte-cumulus complex)의 ECM을 대상으로 MMP의 존재 여부를 zymography 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 준비

1) 사람 난자-난구 복합체의 ECM

체외수정 시술 시 과배란을 해서 얻은 난자-난구 복합체 중에서 세포질내 정자주입술(intracytoplasmic sperm injection)을 시행하는 경우의 난자-난구 복합체를 이용하였다. 난자-난구 복합체에서 난자와 난구세포를 분리하기 위해 난자-난구 복합체 한 개 당 20 μ l의 기본배양액(HTF + 10% SSS, Irvine Scientific, Santa Ana, CA)과 20 μ l의 0.05% hyaluronidase를 2~3분간 처리하여 난자로부터 난구세포 및 ECM을 분리하였다. 이 내용물을 300 \times g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 이를 사람 난자-난구 복합체의 ECM으로 사용하였다. 이 상등액을 Centricon-10(Millipore, Bedford, MA)을 이용하여 10배로 농축한 다음 이를 시료로 사용하였다. 한편 난자-난구 복합체 없이 위와 동일한 과정으로 준비한 기본배양액과 hyaluronidase가 들어있는 용액을 일부 취하여 대조군으로 사용하였다.

2) 난포과립세포(ovarian granulosa cell)와 백혈구의 추출물

체외수정 시술 시 얻은 난포액에서 과립세포를 분리한 후 ficoll(Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 blood를 제거하고 과립세포만 얻었다. 모아진 과립세포를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 2~3회 washing한 후 균질화하고 300 \times g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 분리하여 시료

로 사용하였다. 백혈구세포는 건강한 20대 여성의 혈액을 얻어 ficoll을 이용하여 분리한 다음 PBS로 2~3회 washing한 후 균질화하였다. 이를 $300 \times g$ 에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 분리하여 시료로 사용하였다. 각각의 세포들은 균질화하기 전 Markler chamber(Biointech, Lexington, KY)를 사용하여 세포의 수를 측정한 후 사용하였다.

2. 단백질 전기영동

단백질의 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 nondenaturing SDS-PAGE를 시행하였다. Resolving gel buffer로는 3.0M Tris-HCl buffer(pH 8.8)를 사용하였고, stacking gel buffer로는 0.5M Tris-HCl buffer(pH 6.8)를 사용하였다. Resolving gel과 stacking gel의 acrylamide 농도는 각각 8%와 4%가 되도록 하였다. Resolving gel은 200V로, stacking gel은 15mA로 Tris-glycine reservoir buffer(0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)를 사용하여 전개하였다. 실험을 통해 얻은 단백질들은 nonreducing sample buffer(0.125M Tris, 4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, pH 6.8)에 녹여 well당 $10 \mu\text{l}$ 씩 loading 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Switzer등(1979)의 방법에 따라 silver staining하였다.

3. Zymography

Gelatinase의 분석을 위해 zymography를 이용하였다. 즉, standard Laemmli acrylamide polymerization mixture(8%)에 1mg/ml의 gelatin을 첨가해 gel을 만든 후 non-reducing 조건으로 전기영동을 시행하였다(Kim et al., 2001a). 시료 단백질은 sample buffer(10% SDS, 4% sucrose, 0.25M Tris-HCl(pH 6.8), and 0.1% bromophenol blue)와 1:1로 섞은 후 well 당 $10 \mu\text{l}$ 의 sample(난자-난구 복합체 2.5개 분량)을 loading 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 detergent solution(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5% Triton X-100)을 15분간 두 번씩 처리하여 gel에 남아있는 SDS를 제거하였다. 그런 후 gel은 substrate buffer(50mM Tris-HCl(pH 8.0), 5mM CaCl_2 , NaN_3)로 37°C 에서 24시간 동안 반응시켰다. gel은 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-25 solution(acetic acid: isopropyl alcohol: water = 1:3:6)으로 30분 이상 염색한 후 증류수로 탈색시켰다. 그 결과 염색이 되지 않고 희게 나타나는 부분을 gelatinase 활성이 있는 것으로 간주하였다.

4. MMP의 활성제 및 억제제의 처리

MMP효소의 활성제로는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 100mM의 농도로 녹인 aminophenylmercuric acetate(APMA)를 사용하

였고 사용시에는 최종 농도가 1mM이 되도록 시료에 처리하였다. 예비실험의 결과 DMSO는 gelatinolytic activity에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. MMP 억제제로는 1,10-phenanthroline과 2가 이온 chelator인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 각각 DMSO와 증류수에 녹여 50mM stock solution이 되도록 한 후, 4°C 에 보관하고 사용시에는 최종농도가 5mM이 되도록 substrate buffer에 처리하였다.

5. 실험기구 및 시약의 준비

본 실험에 사용된 시약들은 특별한 언급이 없는 경우 이외에는 Sigma 제품(St. Louis, MO)을 사용하였다. 또한 모든 용액들은 사용 전 Millipore membrane 혹은 Whatman filter paper로 여과하여 사용하였다.

결 과

1. 사람 난자-난구 복합체의 ECM의 gelatinases

Gelatin substrate gel zymography 방법을 이용하여 서로 다른 두 사람으로부터 채취한 난자-난구 복합체의 ECM에서의 gelatinase의 활성을 알아본 결과 사람에 따라 각각의 gelatinase들의 효소활성은 약간의 차이를 보였으나 gelatinase의 종류에는 별 차이가 없었다. 즉 조사된 시료의 경우 항상 300 kDa, 240kDa, 200kDa, 180kDa, 116kDa, 97kDa, 84kDa의 분자량을 갖는 단백질들이 gelatinases 활성을 나타내었고 이 중 180kDa, 116kDa 및 84kDa gelatinase들이 상대적으로 강한 활성을 나타내었다. 그러나 ECM을 추출하기 위해 사용한 hyaluronidase 용액(대조군)에서는 gelatinase의 활성이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 1A). 1/100로 희석된 같은 시료를 전기영동한 후, silver staining한 결과 ECM에는 여러 종류의 단백질이 존재하는 것으로 나타났는데 대부분의 단백질들이 대조군에서도 관찰되었으나 200kDa, 120kDa, 36kDa의 분자량을 갖는 3종류의 단백질들은 난자-난구 복합체 ECM에서만 관찰되었다(Fig. 1B).

2. 난포과립세포와 백혈구의 gelatinases

시료 채취 시에 혈구세포가 유입되어 위와 같은 결과가 나타났는지 또한 난포과립세포와의 유사성을 알아보기 위하여 동일한 사람으로부터 난포과립세포와 백혈구를 채취하여 zymography를 실시하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 것처럼 난포과립세포의 추출액에서는 300kDa, 150kDa, 97kDa 그리고 62kDa의 분자량을 갖는 gelatinase들이 나타났고 백혈구의 경우에는 난포과립세포와 유사하게 300kDa, 150kDa 그리고

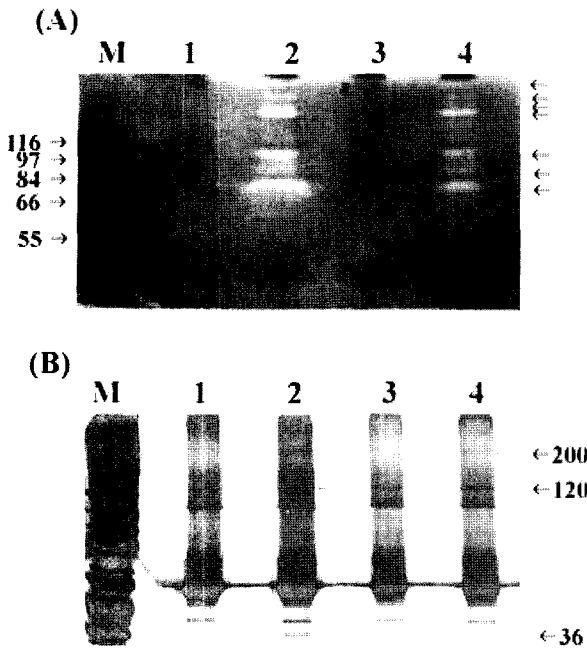


Fig. 1. Gelatin-substrate zymogram(A) and corresponding SDS-PAGE gel(B) of ECM extracted from human oocyte-cumulus complex. Lane 1, control washing medium; lane 2, ECM isolated from oocyte-cumulus complex of an woman; lane 3, control washing medium; lane 4, ECM isolated from oocyte-cumulus complex of another woman. Each lane was loaded with 2.5 oocyte-cumulus complex equivalent ECM. Arrows in A indicate typical gelatinases of ECM. From the top, 300kDa, 240kDa, 200kDa, 180kDa, 116kDa, 97kDa, and 84kDa gelatinases are shown. Arrows in B indicate 3 protein species present in ECM. M, molecular weight standard.

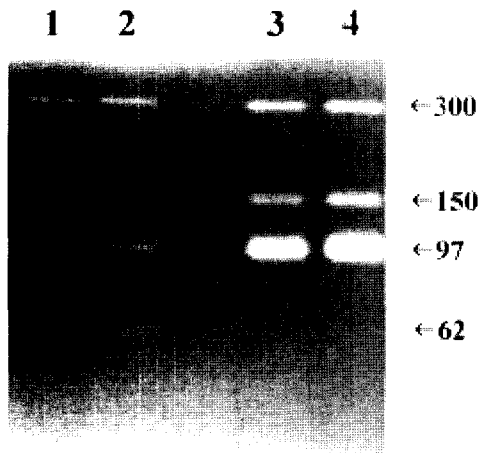


Fig. 2. Gelatinolytic activities of human ovarian granulosa cells and white blood cells. Lane 1, 3×10^6 granulosa cell extract; lane 2, 6×10^6 granulosa cell extract; lane 3, 5×10^4 white blood cell extract; lane 4, 1×10^5 white blood cell extract.

97kDa gelatinase들이 관찰되었으나 난포세포와는 달리 62kDa gelatinase는 나타나지 않았다.

3. APMA가 난자-난구 ECM gelatinase의 활성화에 미치는 영향

APMA는 MMP의 conformational change를 일으켜 precursor 형태의 MMP를 분해하여 active 형태로 전환시킨다(Birkedal-Hansen et al., 1993). 이러한 성질을 이용하여 사람의 난자-난구 복합체의 ECM에서 나타난 gelatinase들이 precursor인지 혹은 active 형태인지 조사하였다. 즉 ECM의 추출물에 1mM의 APMA를 24시간 동안 처리한 후 zymography를 실시한 결과 200kDa, 180kDa, 97kDa, 84kDa의 gelatinase band는 사라지고 대신 80kDa, 65kDa, 60kDa gelatinase들이 새로 나타난 것이 관찰되었다(Fig. 3).

4. 1,10-phenanthroline과 EDTA가 난자-난구 ECM의 gelatinase 활성화에 미치는 영향

ECM의 추출물에서 관찰된 gelatinase들이 MMP인지를 알아보기 위하여 gelatin-substrate 전기영동이 끝난 gel의 incubation buffer에 MMP의 특이억제제로 잘 알려진 1,10-phenanthroline과 metal chelator인 EDTA를 처리하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 것처럼 ECM 추출물에서 관찰된 모든 gelatinase들의 활성이 대조군(Fig. 4A)과는 달리 처리군들에서는(Figs.

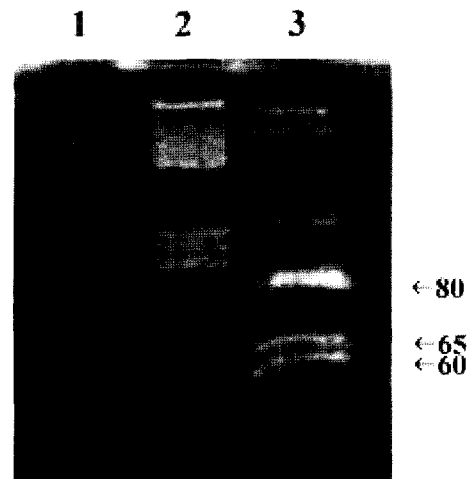


Fig. 3. Effect of APMA on the gelatinases of ECM extracted from the human oocyte-cumulus complex. Lane 1, control washing medium; lane 2, ECM extracted from 2.5 human oocyte-cumulus complex; lane 3, same as ECM of lane 2 but treated with 1 mM APMA for 24 h. Numbers indicate 3 new gelatinases appearing by APMA treatment.

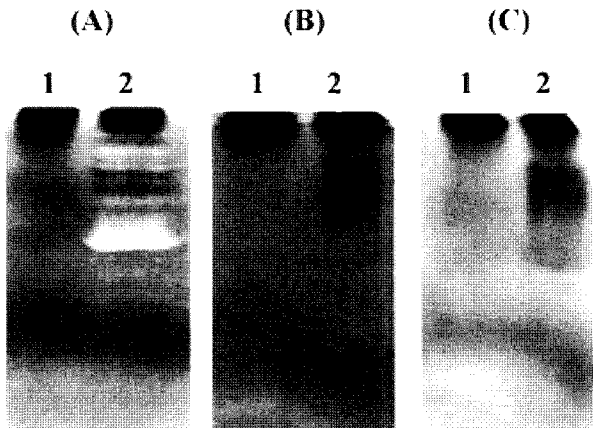


Fig. 4. Effect of EDTA or phenanthroline on the gelatinases of ECM extracted from human oocyte-cumulus complex. Lane 1, control washing medium; lane 2, ECM from 2.5 human oocyte-cumulus complex. (A) control, (B) EDTA-treated gel during zymography, (C) phenanthroline-treated gel during zymography.

4B, 4C) 나타나지 않았다.

고찰

본 연구에서는 사람의 난자-난구 복합체의 ECM에 MMP들이 존재하는지의 여부를 조사하였고, 그 결과 300kDa, 240kDa, 200kDa, 180kDa, 116kDa, 97kDa, 84kDa의 분자량을 가지는 여러 가지 gelatinase들의 활성이 나타나는 것을 관찰하였다.

난소내 난포로부터 난자-난구의 복합체를 채취할 경우 난구세포뿐만 아니라 난포과립세포 및 혈구세포의 일부도 같이 얻어질 수 있으며 이들 세포도 gelatinase 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Curry & Osteen, 2001; Opdenakker et al., 2001). 그러나 본 실험에서 관찰된 ECM gelatinase들은 난포세포 혹은 백혈구의 gelatinase들과는 다른 분자량을 갖는 것으로 보아 본 실험 결과 ECM에서 나타난 gelatinase들은 난자-난구 복합체로부터 기원한 것들로 여겨진다. 지금까지 알려진 바에 의하면 활성화된 MMP의 경우 가장 큰 분자량을 갖는 것은 MMP-9로써 대략 92kDa에 달하며 이외의 MMP들은 이보다 작은 분자량의 단백질들이다(Birkedal-Hansen et al., 1993). 그러나 ECM에 존재하는 대부분의 gelatinase들의 분자량은 MMP-9보다도 큰 것으로 나타나 이들이 MMP인지 혹은 다른 종류의 gelatinase들인지 알아보기 위하여 복합체에서 추출된 ECM에 MMP의 활성화 물질인 APMA를 처리한 결과 200kDa, 180kDa, 97kDa, 84kDa의 gelatinase는 사라지고 80kDa, 65kDa, 60kDa band의 활성이 나타났다. 이같은 결과

로 미루어 APMA에 의해 사라진 200kDa, 180kDa, 97kDa, 84kDa의 4종류의 gelatinase는 isoform인 것으로 사료된다. 즉 이들은 보다 작은 분자량을 갖는 gelatinase들이 covalent bonding으로 다른 단백질과 결합한 결과 나타나는 새로운 형태인 것으로 추정되는데 이러한 예는 MMP-2와 MMP-9의 경우 잘 알려져 있다(Sottrup-Jensen et al., 1989; Arbelaez et al., 1997; Monier et al., 2000). 그리고 metal chelator인 EDTA와 MMP의 특이억제제인 1,10-phenanthroline에 의해 ECM의 거의 모든 gelatinase들이 gelatin에 대한 가수분해 활성을 상실하는 것으로 보아 ECM gelatinase들은 MMP인 것으로 여겨진다. 이들 ECM MMP들의 정체는 자세하게 알 수 없으나 APMA처리에 의해 나타나는 MMP의 분자량이 80kDa, 65kDa 및 60kDa인 것으로 보아 80kDa gelatinase는 MMP-9, 그리고 65kDa 및 60kDa gelatinase는 MMP-2(Sottrup-Jensen et al., 1989)일 가능성이 높다. 소의 난자-난구 복합체를 체외에서 배양할 경우 MMP-1의 mRNA가 발현되며 이에 상응하는 분자량 55kDa gelatinase의 활성이 나타나며 또한 MMP-2로 추정되는 분자량 약 70kDa인 gelatinase의 활성도 관찰된다는 보고가 있다(Bieser et al., 1998).

본 연구의 결과 관찰된 사람의 난자-난구 복합체의 ECM의 MMP들의 기원은 두가지로 설명될 수 있다. 첫째, 난포의 성장 과정에서 축적된 난포액의 MMP들이 난구세포의 확장 시에 ECM 성분들과 결합하여 ECM내에 위치하게 되는 경우이다. 난포액 성분이 ECM내에 축적되는 예는 이미 inter-alpha-inhibitor 등에서 보는 바와 같이 잘 알려져 있다(Chen et al., 1994). 그러나 이 가설에 따르면 사람의 난포액내에서도 ECM MMP들과 동일한 종류의 MMP isoform들이 관찰되어야 하는데 현재 알려진 사람의 난포액내의 MMP isoform들의 종류는 ECM과는 반드시 일치하지는 않는다(Kim et al., 2001a). 즉 본 연구에서 관찰된 ECM의 240kDa, 200kDa 및 180kDa gelatinase 들은 난포액에서는 관찰되지 않는 것들이다. 대신에 ECM의 97kDa 및 84kDa gelatinase들은 난포액내에 존재하는 92kDa 및 88~84kDa gelatinase와 분자량이 유사하다. 이로 미루어 일부 난포액의 MMP가 선택적으로 ECM내에 축적될 가능성은 있다. 둘째, 난구세포 스스로가 직접 MMP들을 합성 분비하는 경우이다. 난구세포의 확장 시에 난구세포의 분비물이 ECM내로 축적되는 경우는 hyaluronic acid(Salustri et al., 1989; Camaioni et al., 1996), TSG-6(Carrette et al., 2001), 42kDa-link protein(Kobayashi et al., 1999) 등의 예에서 잘 알려져 있다. 또한 소의 미성숙난자-난구 복합체를 체외에서 배양하면 gelatinase 활성을 갖는 plasminogen activator가 난구세포에 의해 합성 분비되어 ECM내에 축적된다(Park et al.,

1999). 이런 사실들을 종합해 볼 때, 사람의 난자-난구 복합체의 ECM내의 MMP들은 아마도 난포액에서 기원한 것과 난구 세포 스스로가 합성 분비한 것들이 서로 혼재되어 나타나는 것으로 여겨진다.

난자-난구 복합체 ECM의 기능은 아직 명확하게 밝혀진 바는 없으나 배란 시에 난포벽으로부터 난자-난구 복합체의 분리를 도와주거나 난소막(ovarian bursa)이 없는, 사람이나 가축의 난포로부터 방출된 난자가 수란관에 의해 포획되는 것을 용이하게 하거나(Lam et al., 2000) 혹은 수란관내로 배란된 난자의 정자와의 수정을 도와주는 것(Tesarik et al., 1988; Hess et al., 1999)으로 추측되고 있다. 포유동물의 난구 세포들의 확장현상은 난구세포에 의해서 분비된 hyaluronic acid와 위에서 언급한 여러 가지 단백질들이 서로 화학적인 결합을 이루어 점착성이 강한 띠를 형성하여 난구세포가 난자 주위에 산재하는 것을 말한다. 이 과정에서 원래는 난자 주위를 조밀하게 여러 층으로 에워싸고 있던 난구세포들은 서로 간의 결합을 끊고 재배열을 이룬다. 이런 점에서 볼 때, ECM MMP는 이 난구세포의 재배열시에 세포주위의 ECM의 분해를 일으켜 확장을 일으킬 수 있도록 하거나 혹은 수정이 일어날 때 정자가 ECM을 관통하는 것을 도와 주는 것으로 추측된다.

인용문헌

- Arbelaez LF, Bergmann U, Tuuttila A, Shanbhag VP, Stigbrand T (1997) Interaction of matrix metalloproteinases-2 and -9 with pregnancy zone protein and alpha2-macroglobulin. Arch Biochem Biophys 347:62-68.
- Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R (1998) Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. Biol Reprod 59:801-806.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med 4:197-250.
- Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Epigg JJ (1990) FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. Dev Biol 138:16-25.
- Camaioni A, Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC (1996) Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. Arch Biochem Biophys 325:190-198.
- Carrette O, Nemade RV, Day AJ, Brickner A, Larsen WJ (2001) TSG-6 is concentrated in the extracellular matrix of mouse cumulus oocyte complexes through hyaluronan and inter-alpha-inhibitor binding. Biol Reprod 65:301-308.
- Chen L, Mao SJ, McLean LR, Powers RW, Larsen WJ (1994) Proteins of the inter-alpha-trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. J Biol Chem 269:28282-28287.
- Curry TE Jr, Osteen KG (2001) Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. Biol Reprod 64:1285-1296.
- Curry TE Jr, Song L, Wheeler SE (2001) Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation, and early luteal formation in the rat. Biol Reprod 65:855-865.
- Hart DA, Rehemtulla A (1988) Plasminogen activators and their inhibitors: regulators of extracellular proteolysis and cell function. Comp Biochem Physiol B 90:691-708.
- Hess KA, Chen L, Larsen WJ (1999) Inter- α -inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. Biol Reprod 61:436-443.
- Hunter MG, Hindle JE, McLeod BJ, McNeilly AS (1988) Treatment with bovine follicular fluid suppresses follicular development in gonadotropin-releasing hormone-treated anoestrous ewes. Endocrinology 119:95-100.
- Kim M, Kim J, Kim H, Lee SJ, Yoon YD, Cho DJ (2001a) A gelatinase A isoform, GA110, of human follicular fluid is degraded by the bovine oviductal fluid component. Dev Reprod 5:23-33.
- Kim M, Hong M, Kim J, Kim H, Lee SJ, Kang SG, Cho DJ (2001b) Bovine follicular fluid and serum share a unique isoform of matrix metalloproteinase-2 that is degraded by the oviductal fluid. Biol Reprod 65:1726-1731.
- Kobayashi H, Sun GW, Hirashima Y, Terao T (1999) Identification of link protein during follicle development and cumulus cell cultures in rats. Endocrinology 140:3835-3842.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

- Lam X, Gieseke C, Knoll M, Talbot P (2000) Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and oviductal epithelium. *Biol Reprod* 62:579-588.
- Liu Y-X, Hsueh JW (1987) Plasminogen activator activity in cumulus-oocyte complexes of gonadotropin-treated rats during the preovulatory period. *Biol Reprod* 36:1055-1062.
- Monier F, Surla A, Guillot M, Morel F (2000) Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients. *Clin Chim Acta* 299:11-23.
- Nagyova E, Prochazka R, Vanderhyden BC (1999) Oocytectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium. *Biol Reprod* 61:569-574.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J (2001) Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 69:851-859.
- Park KW, Choi SH, Song XX, Funahashi H, Niwa K (1999) Production of plasminogen activator(PAs) in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vitro*: effects of epidermal growth factor on production of PAs in oocytes and cumulus cells. *Biol Reprod* 61:298-304.
- Ralph JH, Telfer EE, Wilmot I (1995) Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor. *Mol Reprod Dev* 42:248-253.
- Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC (1999) Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum Reprod Update* 5:293-301.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC (1989) Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem* 264:13840-13847.
- Sottrup-Jensen L, Sand O, Kristensen L, Fey GH (1989) The alpha-macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* 264:15781-15789.
- Switzer RC 3rd, Merrill CR, Shifrin S (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 98:231-237.
- Tesarik J, Pilka L, Drahorad J, Cechova D, Veselsky L (1988) The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implication in IVF. *Hum Reprod* 3:129-132.
- Vanderhyden BC (1993) Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *J Reprod Fertil* 98:219-227.
- Zhu C, Woessner JF Jr (1991) A tissue inhibitor of metalloproteinases and alpha-macroglobulins in the ovulating rat ovary: possible regulators of collagen matrix breakdown. *Biol Reprod* 45:334-342.