

## 돼지 체외성숙난자에서 MMPs와 TIMPs의 발현 분석

김상환<sup>1</sup> · 강현아<sup>1</sup> · 김대승<sup>1</sup> · 이명섭<sup>2</sup> · 서강석<sup>3</sup> · 민관식<sup>1</sup> · 윤종택<sup>1,4,†</sup><sup>1</sup>한경대학교 생물환경정보통신전문대학원 동물생명공학 전공, <sup>2</sup>메디키네틱스(주), <sup>3</sup>순천대학교 동물자원과학과, <sup>4</sup>한경대학교 동물생명환경과학부 동물생명공학전공Expression Analysis of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases from *In Vitro* Maturation Oocytes Complexes in PorcineSang-Hwan Kim<sup>1</sup>, Hyun-Ah Kang<sup>1</sup>, Dae-Seung Kim<sup>1</sup>, Myeong-Seop Lee<sup>2</sup>, Kang-Suk Seo<sup>3</sup>,  
Kwan-Sik Min<sup>1</sup> and Jong-Taek Yoon<sup>1,4,†</sup><sup>1</sup>Major in the Animal Biotechnology The Graduate School of Biology & Information Technology,  
Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea<sup>2</sup>Medi Kinetics Co., Ltd., Pyeongtaek 451-833, Korea<sup>3</sup>Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea<sup>4</sup>Department of Animal Life Research, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea

## ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMP) play important roles in extracellular matrix (ECM) remodeling during ovarian follicular development, oocytes development and ovulation. In an attempt to investigate the effect of MMP activation in development cumulus-oocytes complexes, we examined the localization and expression of MMP, and monitored MMP expression profile. Cumulus-oocytes complexes were collected and matured *in vitro* for 24 hr, 36 hr and 48 hr. A mRNA expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and TIMP-3 was detected in all culture medium regardless of CC, OC and COCs. Activity of MMP-2 in the OC progressively was increased from 24 hr to 48 hr. But MMP-9 was not detected in all culture medium. The localization of MMP-2 was also measured by immunohistochemistry analysis. The MMP-2 and TIMP-2 was detected in cumulus cell and oocyte zone pellucida. Expression of MMP-2 protein in the COCs was progressively increased from 24 hr to 48 hr. However, MMP-9 protein was progressively decreased from 24 hr to 48 hr. And TIMP-2 protein was most highly expressed in the COCs 36 hr. Expression of TIMP-3 protein in the COCs was progressively increased from 24 hr to 48 hr. In conclusion, these results suggest that MMP-2 plays a role in maintaining normal maturation and development by controlling the ECM inhibitor concentration on cumulus cell and oocytes.

(Key words : MMP2, MMP9, TIMP2, TIMP3, Cumulus-oocytes complexes)

## 서 론

난자의 체외성숙은 체외수정란을 비롯해 각종 생리학적인 실험에 매우 중요한 부분을 차지하고 있다. 따라서 충분한 성숙시간과 성숙도를 통해 성숙되어진 양질의 난자는 핵이식, 복제동물의 생산 및 형질전환 동물에 이르기까지 발생공학 전 분야에 있어서 필수적인 학문으로 자리잡고 있다 (Alm 등, 2005; Nicholas 등, 2005; Anguita 등, 2007). 수정을 이루기 위한 발생능을 가지고 있는 난자를 선별하는 방법은 극체의 방출 여부나 세포질을 관찰하는 방법(Ebner

등, 2003)과 난자의 크기, 난구세포의 부착 정도 및 세포질의 균일화 및 BCB 염색 여부와 극체 방출 여부를 고려하여 선별하는 것이 배 발달에 중요한 역할을 하는 것이라는 보고가 있다(김 등, 2009). 난자의 체외성숙은 여러 유전자의 관여 및 호르몬의 영향을 통한 복잡한 구조적 형성을 이루게 된다(Loos 등, 1992). 하지만 난자의 성숙과 수정시기에 관련하여 난구세포의 재구성 및 proteinase들에 의한 구조적 변화에 대한 연구는 미비한 상태에 있다. 체내에서 난자의 성숙은 호르몬의 변화에 따라 난소의 성숙을 도모하여, 난자의 성숙을 유도하게 된다(정 등, 1999). 난소에서 난포의 발육이나 난소 자체의 재구성에는 많은 효소들이 작용

\* 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호 : 109188-03-1-SB010)의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-5094, E-mail: jtyoon@hknu.ac.kr

을 하고 있는데, 그중 난포에서 발생하는 matrix metalloproteinase (MMP)는 gelatin 기질을 분해하여 난자 성숙을 원활하게 수행하는데 도움을 주고 있다(Imai, 등 2003). 난포의 성장이 활발하게 이루어지는 과정에서 난포는 collagen, laminin, fibronectin 같은 세포외 매트릭스(Extracellular matrix, ECM)의 성분과 구조의 변화를 수반하게 되며, 결정적으로 난자의 성숙을 가져오게 되는데(Greenwald와 Roy, 1994; Monniaux 등, 1992), 이러한 구조를 재형성화 시켜 원시 난자를 성숙난자로 성장시키기 위하여 기저막의 주성분인 type IV collagen 성분의 분해를 통해 영양분의 이동을 원활하게 수행시키고, 난자성숙에 직접적인 영향을 주는 역할을 하고 있는 것이다(Visse, 등 2003; Imai, 등 2003). 특히 이러한 역할에 관련하여 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있는 대표적인 MMP 효소는 MMP-2와 MMP-9을 들 수 있다. 92 KDa의 분자량인 collagenase으로 알려져 있는 MMP-9은 세포외 기저막에 분포하며, collagen type IV, V, VII, X, casein, gelatin의 효소를 분해하므로 영양막세포 침투에 매우 중요한 역할을 하고 있으며(Keiichiro, 등 2008), MMP-2는 세포외 기저질에 분포하고, collagen type IV, V, elastin, fibronectin, laminin, gelatin을 분해하며, 동시에 MMP-9의 활성화를 촉진한다(Ashida 등, 1996). 이러한 MMPs는 난자의 성숙 및 수정시에 중요하게 작용하게 되며, estrogen이나 progesterone 및 FSH에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다(Marbaix 등, 1992). 따라서 본 연구는 돼지 난자의 체외성숙시 MMP의 발현기작을 난소 및 난포에서의 작용이 아닌 난자와 난구세포 자체에서의 발현과 발현 위치를 분석하여 난자의 성숙에 미치는 영향을 판단하고, 24시간, 36시간, 48시간 동안의 MMP-2, MMP-9의 작용 기전을 규명하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 난포란의 채취 및 성숙배양

도축장에서 채취된 돼지 난소를 회수하여 37°C의 생리 식염수 용액에 넣어 실험실로 운반하여 직경이 3~6 mm의 난포로부터 18 gauge의 주사침을 이용해 aspiration을 하여 난포액을 흡입하여 채란하고, 0.3% Bovine albumin serum(BSA, Sigma, USA)가 첨가된 TCM-199으로 세척한 뒤 난구세포가 균일하고 세포질이 균질한 것만을 선별하여 공시하였다(Ebner 등, 2003). 난자의 성숙배양을 위해 TCM-199에 10 ng/ml EGF, 0.5 mM cysteine, 0.91 mM Na pyruvate, 75 µg/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin 0.5 µg/ml FSH, 10% porcine follicular fluid(pFF)가 첨가된 pFFTCM-199 배양액 1 ml를 4well-dish에 넣어 성숙배양 3시간 전에 5% CO<sub>2</sub> 39°C 온도조건 하에 평형시킨 후 성숙배양 직전 난구세포가 부착되어 있는 정상적인 난자와 0.2% hyaluronidase 처리를 하여 난구세포를 제거한 난자, 그리고 난구세포만을 분리하여 각 well당 200개의 난자를 공시하여 24시간, 36시간, 48시간 동안 배양하여 성숙시켰다(Fig. 1). 실험구들간의 환경을 같게 하기 위하여 무 혈청 배지로 옮겨 성숙시키는 과정을 제외하여 실시하였다.

### Total RNA 분리 및 cDNA 합성

돼지의 난자와 난구세포에서 Total RNA를 추출하기 위

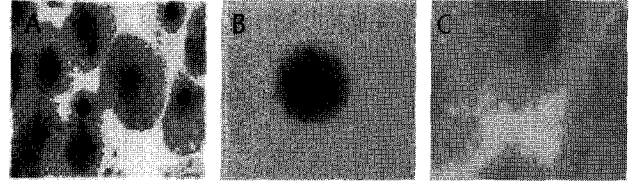


Fig. 1. Collected of cumulus-oocyte complexes (COCs), oocytes (OC) and cumulus cell (CC) were the cultured for 24 hr, 36 hr, 48 hr. A : Cumulus-oocyte complexes, B : Oocytes, C : Cumulus cell.

Table 1. The number of oocyte per group

Quality	Condition of oocytes, and cumulus cell (ea)		
	Oocytes of excellent	Cumulus-oocyte complexes of excellent	Cumulus cell
No.	200	200	10×10 <sup>3</sup>
Total No.	400 ea		

해 RNAqueous kit(Invitrogen)의 실험방법에 따라 균질된 시료에서 total RNA를 분리한 후 SmatSpec™3000 (Bio-red, USA)으로 total RNA의 농도를 측정하고, A260/A280이 1.8 정도 되는 순수 RNA를 이용하여 농도를 같게 하여 cDNA합성을 실시하였다. cDNA를 합성하기 위해 SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen Co., U.S.A)를 사용하여 RNA 5 µg에 oligo dT (0.5 µg/µl) 1 µl와 10 mM dNTP mix 1 µl를 혼합하였다. 65°C에서 5분간 배양하고 4°C에서 3분간 정치한 후, 10× RT PCR buffer(MgCl<sub>2</sub> 포함) 2 µl, 5 mM dNTP 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, RNase inhibitor 1 µl(TOYOBO, Japan)를 혼합하여 넣어준 뒤 42°C에서 2분간 배양하였다. 이후 SuperScript II RT 1 µl(50 units)를 첨가한 후 42°C에서 50분과 70°C에서 15분 동안 반응 후, 4°C에서 3분간 정치시켰다. 남아 있는 RNA를 제거하기 위하여 Rnase A 1 µl를 넣고 37°C에서 25분간 반응한 후 4°C에서 3분간 정치시켰다. 합성된 cDNA는 RT-PCR를 실시할 때까지 -20°C에 보관하였다.

### cDNA 정량 분석

cDNA를 Pig-GAPDH로 정량하기 위해 cDNA 1 µl에 10×PCR buffer(MgCl<sub>2</sub>) 2 µl, 2.5 mM each dNTP Mixture(G&P, Kor) 2.5 µl, Taq polymerase 500 units/100 µl (G&P, Kor) 0.3 µl, Pig-GAPDH Fw primer, Rv primer를 각각 1 µl씩 첨가하여 최종 부피 25 µl가 되도록 하여 PCR을 실시 후 1% agarose에서 100 v 30분간 전기영동을 실시하고, UV 상에서 관찰하여 100 bp Ladder의 band를 기초로 하여 정량하였다.

### Real-time PCR

Real time PCR은 One Step SYBR RT-PCR Kit(TaKaRa, Japan)의 실험 방법에 따라 실행되었다. 이때의 total RNA은 소의 임신 기간 각 시기별 조직에서 분리해 1 mg을 사용하였다. Real time PCR 반응은 첫 번째로 42°C에서 15분, 95°C에서 2분 동안 1회 실시하고, 두 번째로 95°C에 40초,

**Table 2. Primers used for Real Time PCR**

Primer	Sequence
MMP-2 Forward	5"-GGCAGCCCTCAGTTCTGTAA-3"
MMP-2 Reverse	5"-TACTTGAGCACAGGGCAGAG-3"
MMP-9 Forward	5"-CTTGCCCTTCATGCTGGGACT-3"
MMP-9 Reverse	5"-GTGAGGATAGCACTTGGTCTGGCT-3"
TIMP-2 Forward	5"-GGGTCTCGTGGACATTG-3"
TIMP-2 Reverse	5"-AGCTGATCAGGATCCCC-3"
TIMP-3 Forward	5"-CCCTTCCCACTGAGCTTCCCTT-3"
TIMP-3 Reverse	5"-CTATCTGCTGGCTGCCCTTGAC-3"

58°C에 15초, 그리고 60°C에서 32초를 40회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분 동안 1회 실시하였다. 유전자 증폭의 정량은 geometric 지역의 semi-logamplification plot에 기초한 cycle threshold(Ct)값에 주하여 계산하였다.

**Semiquantitative RT-PCR**

RT-PCR을 수행하기 위하여 한 가닥 cDNA량을 normalize 하였다. 동일량의 cDNA와 target primer를 사용하여 PCR한 후 agarose gel 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였다. 각각의 산물에 대한 band의 intensity를 densitometer (Vilber Lourmat, France.)를 이용하여 정량하고 분석하였다.

**Gelatin Zymography**

난구세포를 제거한 군과 난구세포 배양군 및 난구세포가 균일하게 분포된 군의 성숙 배양액에 Foz loading buffer(0.06% bromo phenol, 10% SDS, 2% glycerol)을 섞어 얼음위에서 5분간 정치한 후 100 mg/ml의 gelatin B, A가 포함된 12% SDS-PAGE를 사용하여 150 V에서 1시간 30분 동안 전기영동하였다. 전기영동한 후 gel은 renaturation buffer (2.5% Triton X-100)로 20분간 2회 세척한 후, DW로 20분간 반응시킨 후 zymography reaction buffer를 넣어 37°C에서 18시간 반응시켰다. 반응이 끝난 gel은 0.5% Coomassie blue R250 (Bio-rad, USA) staining solution으로 1시간 동안 염색한 후 Destain solution(Bio-rad, USA)으로 탈색하여 MMP-2와 MMP-9의 위치를 확인하여 탈색유, 무로 효소 활성도를 판단하였다.

**Immunohistochemistry (IHC)**

4% paraformaldehyde(with the 1XD-PBS)으로 난자를 고정 후 antibody 투과성을 높이기 위하여 0.2% Triton-X 100으로 30분간 처리하였고, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 3분간 처리하였다. 이후 5% horse serum으로 blocking하여, mouse monoclonal antibody MMP-2와 mouse-goat IgG secondary antibody를 37°C에서 2시간 동안 처리하였으며, rabbit polyclonal antibody TIMP-2와 rabbit-goat IgG scndary antibody를 37°C에서 2시간 동안 처리하여 A, B, C detection buffer(vector, USA)로 탐지한 후 DAB으로 발색시켜 발현 위치를 분석하였다.

면역형광염색을 통한 MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-3의 발현 양상 분석

24시간, 36시간 48시간 동안 배양된 돼지 체외수정란의 MMP-2, 9과 inhibitor인 TIMP-2, 3의 단백질 활성화를 분석하기 위하여, 난구세포가 붙어 있는 정상난자를 각각 100여개씩 고정하여 분석하였다. 고정은 4% paraformaldehyde(with the 1XD-PBS)으로 난자를 고정하여 slide에 부착시킨 후 antibody 투과성을 높이기 위하여 0.2% Triton-X 100으로 30분간 처리하였고, 5% normal horse, 1% normal goat serum으로 실온에서 2시간 동안 blocking하여 각각 mouse monoclonal antibody MMP-2, rabbit polyclonal antibody MMP-9, goat polyclonal antibody TIMP-2, TIMP-3를 4°C에서 20시간 동안 탐침하였고, 이후 Alaxa-488 goat anti-mouse IgG, Alaxa-488 goat anti-rabbit IgG, Alaxa 594 anti-goat IgG를 각각 실온에서 2시간 동안 처리하였다. DNA를 염색하기 위하여 2 µg/ml의 Hoechst33258로 1분 동안 염색하여 counter staining을 하고, H-1000(Vector, USA)로 피복한 후 cover slip으로 봉합하여, 광학현미경 상에서 관찰하였다.

**결 과**

**돼지 체외성숙란과 난구세포의 mRNA상의 MMPs, TIMPs의 발현 양상**

24시간, 36시간 및 48시간 동안 성숙되어진 돼지의 난자와 난구세포의 mRNA에서 발현 양상을 분석한 결과(Fig. 2) 대체적으로 cumulus cell에서의 발현 양상이 두드러지게 나타나고 있음을 확인하였으며, 난자에서도 mRNA의 발현을 확인할 수 있었다. MMP-2의 경우 36시간의 난구세포에서 발현이 나타났으며, 그에 따라 inhibitor인 TIMP-2도 높게 발현되었다. 난자의 경우에는 48시간에 MMP-2의 발현이 가장 많이 나타났으며, 난구세포에서의 반응은 미미하였다. 또한 이 시기에 TIMP-2의 발현도 낮게 나타났다. MMP-9의 경우, 24시간에서 48시간까지 난구세포에서 큰 변화 없이 발현되었고, inhibitor인 TIMP-3의 경우 48시간째에 급격하게 증가하였다. 난자의 경우에는 24시간째에 MMP-9의 발현이 가장 많이 나타났으나, TIMP-3의 경우 큰 폭 없이 발현되다가 48시간째에 MMP-9의 발현과 비슷하게 발현되었다.

**Zmography를 통한 MMP-2 및 MMP-9의 활성도 분석**

난자 및 난구세포에서 활성화되는 MMP-2와 MMP-9을 분석하기 위하여 성숙배양 배지에서 zymography를 분석한 결과(Fig. 3) MMP-2의 활성화는 분석할 수 있었으나, MMP-9의 활성도는 분석할 수 없었다. 먼저 난자만을 배양한 배지에서는 24시간에서 48시간까지 점차 증가하는 것으로 확인할 수 있었으며, 난구세포만을 배양한 배지에서는 48시간에서 가장 많이 활성화되었다. 난자와 난구세포가 균일하게 분포되어 있는 배양액에서는 비슷하게 활성화되고 있었으나, 48시간 때에 MMP-2 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

**면역염색방법을 이용한 MMP-2와 TIMP-2의 발현 위치 분석**

Zymography의 결과를 토대로 난자와 난구세포에서의

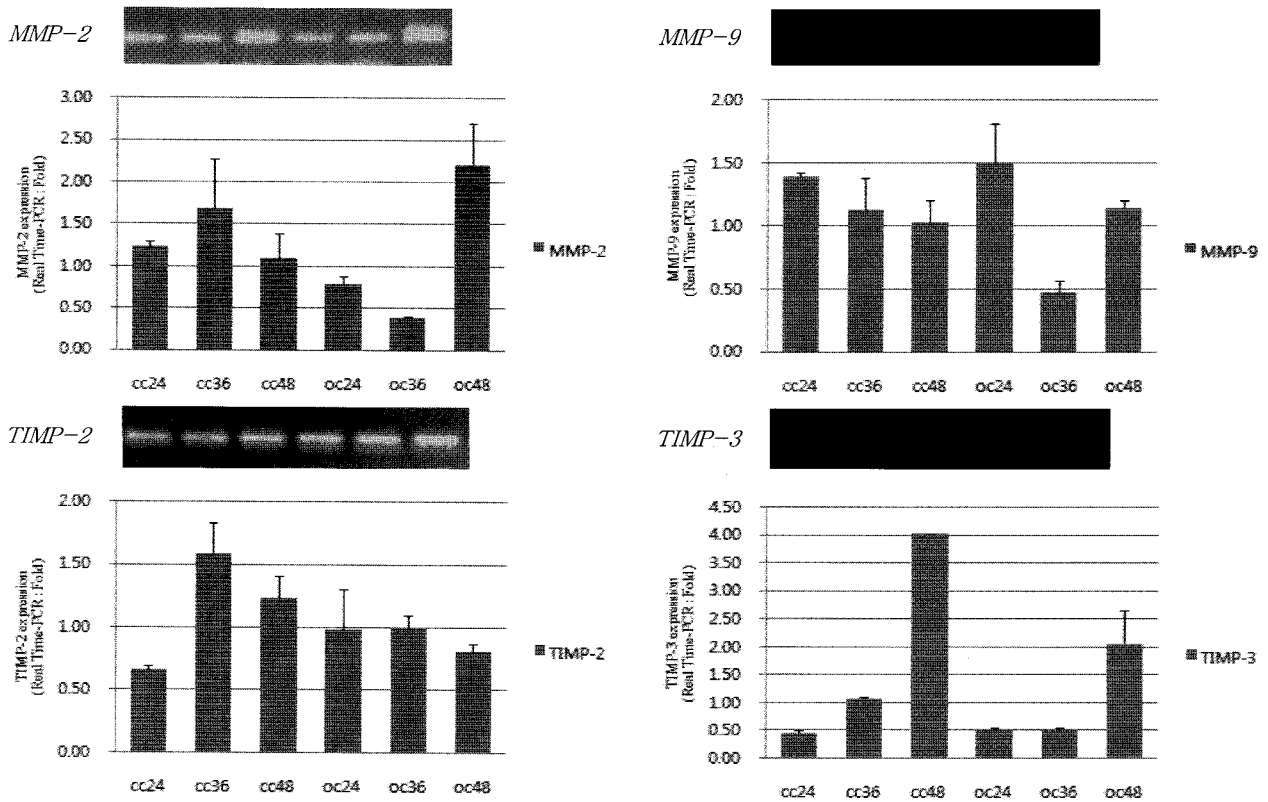


Fig. 2. Expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and TIMP-3 mRNA in collection sample of the cumulus cell (CC) and oocytes (OC). All samples for mRNA expression were cultured for 24 hr, 36 hr and 48 hr.

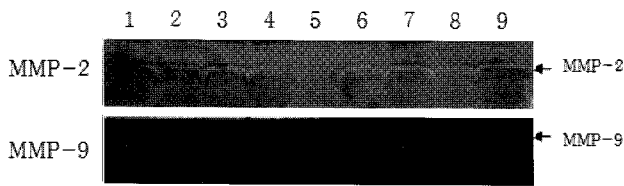


Fig. 3. Gelatinase activity in the bovine vaginal mucus during estrus and pregnancy. A representative zymography gel shows the highest activity of the latent forms in the culture medium on 36 hr of the oocytes and cumulus cell. The latent form MMP-2 is about 72 kDa in size and the MMP-9 is about 92 kDa. Sample list : culture medium of the oocytes(CMOC), culture medium of the cumulus cell(CMCC), culture medium of the cumulus-oocyte complexes(CM-COCs). Line 1) CMOC24, 2) CMOC36, 3) CMOC48, 4) CMCC24, 5) CMCC36, 6) CMCC48, 7) CMCOCS24, 8) CMCOCS36, 9) CMCO-Cs48.

MMP-2와 TIMP-2의 발현 위치를 분석하기 위하여 발현이 가장 많이 나타난 36시간의 난구세포가 없는 난자와 난구세포가 균일하게 있는 난자에서 면역염색을 실시하였다 (Fig. 4). 난자에서의 MMP-2의 경우, 투명대 부근에서 가장 많이 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었으며, TIMP-2의 반응은 투명대에서 발견할 수 있었으나, 그 발현은 미미한 편이었다(Fig. 4, A, A1). 난구세포에서의 경우 확장되어 있는 난구세포 전반에 걸쳐 발현을 하고 있음을 확인할 수 있었으며, TIMP-2의 반응은 난자에서와 같이 미미하게 발현

되고 있었다(Fig. 4, B, B1).

면역형광염색을 통해 MMPs와 TIMPs의 발현 양상 분석

MMP-2와 MMP-9 및 inhibitor인 TIMP-2, TIMP-3의 발현 양상을 형광현미경 하에서 분석한 결과(Fig. 5, Fig. 6), MMP-2는 24시간부터 48시간까지 점차 발현 양상이 높아지고 있음을 확인할 수 있었는데, 24시간에서는 난자 내에서 약간의 발현을 확인할 수 있었으며, 36시간에서는 난구세포 위주로 발현하였다. 그러나 48시간의 난자에서는 극체를 중심으로 난자 내 전체적으로 발현이 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5, A, B, C). TIMP-2의 경우 36시간 배양 난자에서 가장 많이 발현하고 있었으며, 24시간과 48시간에는 발현량이 미미함을 확인할 수 있었는데, 초기 24시간에서는 난자 내에서의 발현을 관찰할 수 있었지만 이후 36시간 48시간에서는 난자 내의 발현을 관찰할 수 없었으며, 난구세포 위주의 발현만을 확인할 수 있었다.

MMP-9의 경우, MMP-2와 달리 전체적으로 발현 양상을 관찰할 수 없었으나, 24시간 때의 난자 내에서 약간의 발현을 확인할 수 있었으며, 36시간에는 미약하게 발현하고, 48시간에는 발현 양상을 관찰할 수 없었다(Fig. 6, A, B, C). MMP-9의 inhibitor인 TIMP-3의 경우, 24시간부터 48시간까지 활발한 발현 양상을 관찰할 수 있었으며, MMP-9의 발현과 상반되는 발현 양상을 나타내고 있었다(Fig. 6, D, E, F). 본 결과를 통해 MMPs와 TIMPs의 발현은 난구세포에서만 발현되는 것이 아니라 난자 내에서도 단백질 발현

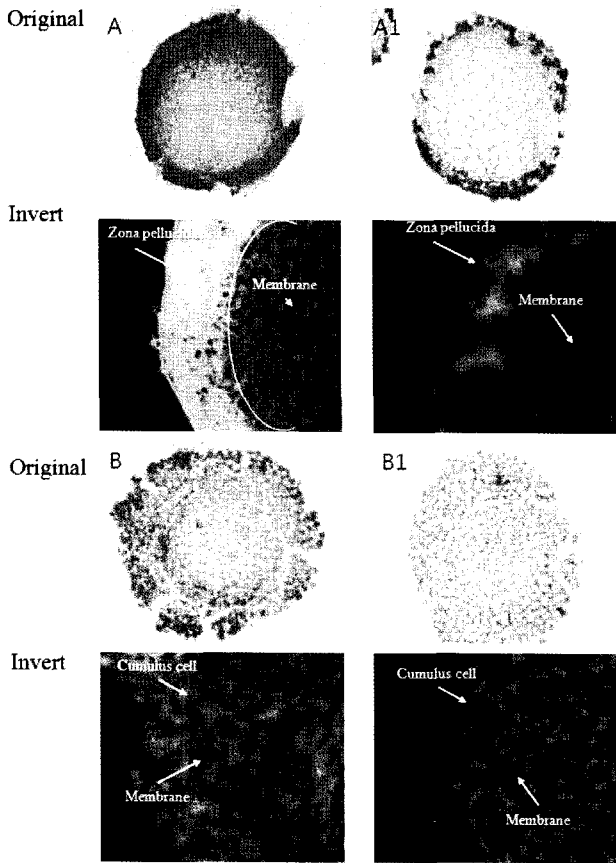


Fig. 4. Localization and expression analysis of MMP-2, TIMP-2 protein detection in the oocytes and cumulus-oocyte complexes. A, A1) Oocytes at 36 hr. B, B1) Cumulus-oocyte complexes at 36 hr.

의 양상을 관찰할 수 있었다.

### 고 찰

MMPs는 세포의 재구성 및 성장에 있어서 중요한 역할을 하고 있다(Woessner 등, 1991). MMP는 생식기관중 난포 형성 시기의 발현(Curry 등, 2001)과 배란(Tadakuma 등, 1993; Smith 등, 1999)시의 발현에서 난자의 성숙에 관련하여 난소 및 난포의 재구성을 이루도록 하고 있다. 난자를 발달시키기 위한 재구성은 발정주기 및 배란의 과정에 포함되는 granulosa cell, theca cell(Matthew 등, 1995)를 비롯한 fibroblast cell 및 cumulus cell(Shea 등, 1989)에 이르기까지 난자의 발육과 연관되는 거의 모든 세포에서 재구성이 이루어지고 있다. 본 연구 결과는 돼지의 난자가 체외 성숙이 되는 시기에 MMP-2와 MMP-9이 난구세포뿐만 아니라 난자 내에서도 발현되어 중요한 작용을 할 것이라고 사료되어 실시하였고, 그 결과 체외성숙과정에서 난구세포를 비롯한 난자 내에서도 MMP-2와 MMP-9이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. McCaffery 등 (2000)의 연구 결과에서 난자의 성숙에 MMP-2와 MMP-9의 역할은 성정인자의 원활한 소통에 중요한 작용을 한다는 결과와 유사했다. 이

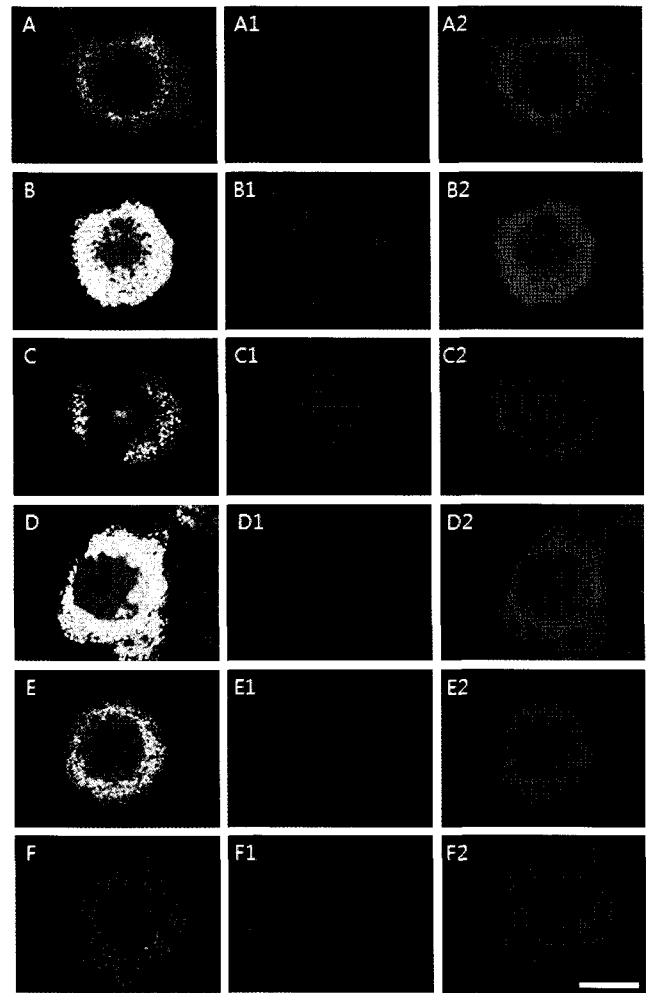
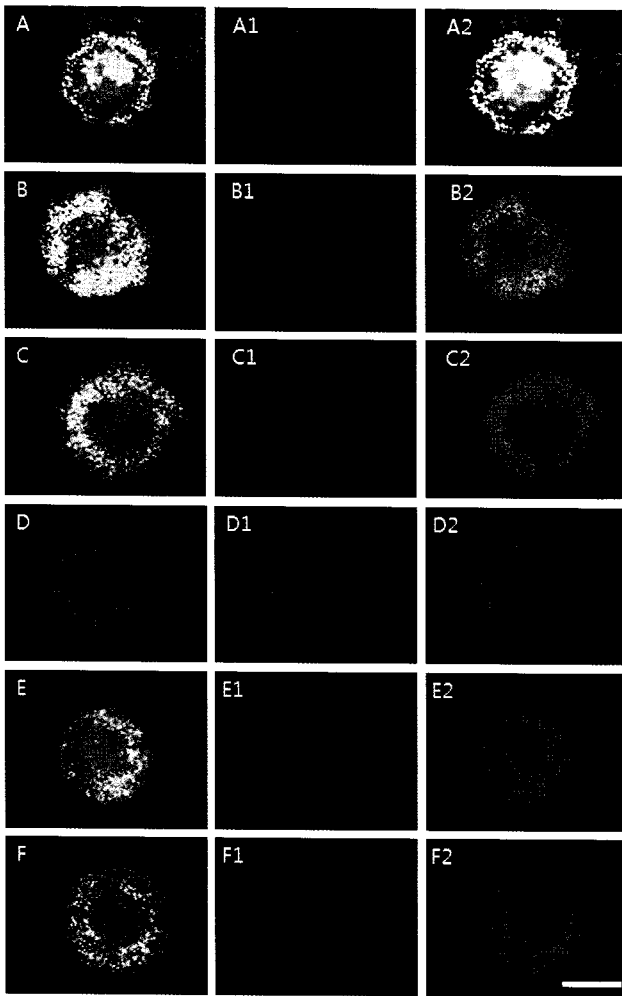


Fig. 5. Expression and localization of MMP-2 and TIMP-2 protein detection in porcine cumulus-oocyte complexes at 24, 36 hr and 48 hr in culture. MMP-2(green), TIMP-2(red) and DNA(blue) were visualized using fluorescence microscope. A, D) Cumulus-oocyte complexes at 24 hr in culture. B, E) Cumulus-oocyte complexes at 36 hr in culture. C, F) Cumulus-oocyte complexes at 48 hr in culture. A~F) DNA(blue). A1~C1) MMP-2(green). D1~F1) TIMP-2 (red). A2~F2) Merged imaged. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

와 같은 결과는 난자가 성숙되는 과정에서 작용하는 호르몬의 영향을 들 수 있는데, MMPs의 분비 및 발현을 조절하는 호르몬 중 estrogen이나 progesterone에 의해서도 조절하게 되며(Marbaix 등, 1992), FSH에 의해서도 연관되어진다고 한다(Fiona 등, 2000). 그러므로 난자의 성숙에서 호르몬의 관여는 MMPs의 분비에 밀접하게 관여되고 있으며, 난자의 성숙 시에 혈청 혹은 무혈청의 배양체계에 따라 성숙도의 변화는 MMP 분비에 큰 교란 요인으로 작용할 것이라 사료되어진다(Riley, 등, 2001; Gosden 등, 2002). 돼지의 성공적인 체외성숙이 완료되기 위해서 호르몬 배지에서 1차 성숙과 호르몬이 제거된 배지에서 2차 성숙을 유도하여 약 40시간의 성숙 과정을 거치게 되면 비로소 원활한 수정이 이루어지게 된다는 보고(Kuwayama 등, 1992; Kikuchi 등, 1998)와 같이 24시간보다 36시간과 48시간에서



**Fig. 6.** Expression and localization of MMP-9 and TIMP-3 protein detection in porcine cumulus-oocyte complexes at 24, 36 hr and 48 hr in culture. MMP-9(green), TIMP-3(red) and DNA(blue) were visualized using fluorescence microscope. A, D) Cumulus-oocyte complexes at 24 hr in culture. B, E) Cumulus-oocyte complexes at 36 hr in culture. C, F) Cumulus-oocyte complexes at 48 hr in culture. A~F) DNA(blue). A1~C1) MMP-2(green). D1~F1) TIMP-2 (red). A2~F2) Merged imaged. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

성숙이 활발하게 진행되어지고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 그에 따라 MMP-2의 증가도 24시간에서 48시간까지 증가하고 있는 것을 관찰할 수 있었고, 배지 내 활성화에서도 MMP-2의 증가는 꾸준히 이루어지고 있었다. 그러나 본 연구 결과에서는 Fiona 등(2000)의 결과와 다르게 MMP-9의 증가는 난자 및 난구세포에서 약하게 발현하고 있었으며, 배지 내 활성화에서도 관찰되지 못했다. 이런 결과를 통해 난자에서 MMP-2의 발현은 난자의 투명대 부근과 난구세포에서 발현하므로 인해 난자의 영양소 소통을 원활하게 하는 것으로 사료될 수 있었으며, MMP-9의 관여는 극히 일부분에 지나지 않을 것이라 볼 수 있었다. MMP는 여러 세포에서 분비되며, 작용하는 다유전체군(multi gene family)으로 MT-MMP에 의하여 활성화(Bjorn 등, 2000)하고, TIMPs에 의해 1:1 접합 작용을 통해 억제되는 작용을 가지게 된다(Woessner 등, 2002). 이런 일련의 활성화 및 비

활성화는 세포의 기질에서 작용을 하고 있으며(Marbaix 등 1996; Sato 등, 1999), 적절한 수준의 MMPs 작용을 돕고 있는 것이다. MMP는 N-terminal 프로펩타이드의 분할이나 재접합을 통해 여러 단계로 활성화되며, 전사, 분비, 활성화를 이루며 여러 효소들에 의해서 억제되기 때문에(Bischof 등, 2000), mRNA에서의 MMP 발현에 대한 관찰은 활성화에 대한 절대적인 관계가 설립되지 않는 것이다. 본 연구 결과에서 MMP-2의 발현은 성숙시간이 늘어날수록 난구세포에서 난자 자체의 발현으로 점차 그 역할이 바뀌어가고 있음을 확인할 수 있었으며, TIMP-2의 발현은 24시간에서 36시간까지 적절하게 발현하고 있었으나, 48시간에는 MMP-2의 발현에 비해 극히 적은 발현을 보이고 있어 결과적으로 MMP-2는 난자의 성숙이 진행될수록 발현이 극대화하는 것으로 보아, Fiona 등(2000)에서 보고되어 있는 난포의 상태를 볼 수 있는 마커로 사용할 수 있다는 결과와 마찬가지로 난자의 성숙도를 확인할 수 있는 결과라고 말할 수 있다. 다른 점이 있다면 난포의 마커로 사용할 수 있다고 시사되었던 MMP는 MMP-9이라는 것이지만 본 연구 결과와 비교한 결과 성숙이 되어지는 과정에서 난자 및 난구세포에서 발생하는 MMP-2가 난포에 pro-MMP-9을 자극하여 MMP-9의 활성화를 이루는 것(Birkedal-Hansen 등 1993)이라 추측할 수 있다. 따라서 이상의 결과를 종합할 때 난자의 체외성숙 초기과정부터 성숙이 완료되는 시점까지 MMP-2의 역할은 발달에 있어 결정적인 요인으로 자리잡을 수 있다는 것이며, 난구세포에서만 분비되는 것이 아니라 난자 내에서도 같이 합성되어 성숙을 완료할 수 있는 것이라 사료된다.

## 인용문헌

1. Alm H, Torner H, Lohrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W (2005): Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63:2194-2205.
2. Anguita B, Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Van Soom A (2007): Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 67:537-549.
3. Ashida K, Nakatsukasa H, Higashi T, Ohguchi S, Hino N, Nouse K, Urabe Y, Yoshida K, Kinugasa N, Tsuji T (1996): Cellular distribution of 92-kd type IV collagenase/gelatinase B in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* Dec;149(6):1803-1811.
4. 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(2):197-250.
5. Bischof P, Meisser A, Campana A (2000): Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion a review. *Placenta*. Mar-Apr;21 Suppl A:S55-60.
6. Bjorn SF, Hastrup N, Larsen JF, Lund LR, Pyke C

- (2000): Messenger RNA for membrane type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta* 21:170-176.
7. Curry Jr TE, Osteen KG (2001): Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 64:1285-1296.
  8. De loos F, van Maurik P, van Beneden T, Kruip Th AMA (1992): Structure aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 31:208-214.
  9. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G (2003): Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: A review. *Hum Reprod Update* 9:251-262.
  10. Fiona H, McCaffery, Rosemary Leask, Simon C, Riley, Evelyn E Telfer (2000): Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biology of Reprod* 63:267-273.
  11. Gosden RG, Mullan J, Picton HM, Yin H, Tan SL (2002): Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. *Hum Reprod Update* 8:105-110.
  12. Greenwald GS, Roy SK (1994): Follicular development and control. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction* 2nd edit. New York: Raven pp. 629-724.
  13. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R (2000): Bovine preantral to antral follicles after long term culture *in vitro*. *Biol Reprod* 67(4):1197- 1203.
  14. Imai K, Khandoker MA, Yonai M, Takahashi T, Sato T, Ito A, Hasegawa Y, Hashizume K (2003): Matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in bovine follicular fluid of different-sized follicles: relationship to intra-follicular inhibin and steroid concentrations. *Domest Anim Endocrinol* 24:171-183.
  15. Kikuchi K, Nagai T, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H (1998): Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50 :615-623.
  16. Keiichiro Kizaki, Koichi Ushizawa, Toru Takahashi, Osamu Yamada, Junichi Todoroki, Takashi Sato, Akira Ito and Kazuyoshi Hashizume (2008): Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 6:66.
  17. Kuwayama M, Hamano S, Nagai T (1992): Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fertil* 96:187-193.
  18. Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y (1992): Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci USA*. Dec 15;89(24):11789-11793.
  19. Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ (1996): Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked *in vitro* and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* Aug 20;93(17):9120-9125.
  20. Matthew JG, Marsha AM, Paul CWT (1995): Identification of matrix metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors in bovine corpora lutea and their variation during the estrous cycle. *J Anim Sci* 74: 849-857.
  21. McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE (2000): Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod* 63:267-273.
  22. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC (1997): Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 51:3-23.
  23. Monniaux D, Pisselet C (1992): Control of proliferation and differentiation in ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-1 and follicle stimulating hormone *in vitro*. *Biol Reprod* 46:109-119.
  24. Nichlas B, Alberio R, Fouladi-Nashta AA, Webb R (2005): Relationship between low-molecular weight insulin-like growth factor binding proteins, caspase-3 activity and oocyte quality. *Biol Reprod* 72:796-804.
  25. O'Shea JD, Rodgers RJ, D'Occhi MJ (1989): Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *J Reprod Fertil* 85:483.
  26. Riley SC, Gibson AH, Leask R, Mauchline DJW, Pedersen HG, Watson ED (2001): Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. *Reproduction* 121: 553-560.
  27. Riley SC, Leask R, Chard T, Wathen NC, Calder A, Howe DC (1999): Secretion of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases into the intrauterine compartments during early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 5:376-381.
  28. Sato T, Iwai M, Sakai T, Sato H, Seiki M, Mori Y, Ito A (1999): Enhancement of membrane-type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) production and sequential activation of progelatinase A on human squamous carcinoma cells co-cultured with human dermal fibroblasts. *Br J Cancer* 80:1137-1143.
  29. Smith MF, McIntush EW, Rieke WA, Kojima FN, Smith GW (1999): Regulation of ovarian extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J Reprod Fertil Suppl* 54:367-381.
  30. Tadakuma H, Okamura H, Kitaoka M, Iyana K, Usuku G (1993): Association of immunolocalization of

- matrix metalloproteinase 1 with ovulation in hCG-treated rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 98:503-508.
31. Visse R, Nagase H (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* May 2:92 (8): 827-839.
  32. Woessner JF (2002): MMPs and TIMPs - an historical perspective. *Molecular Biotechnology* 22:33-49.
  33. Woessner Jr JF (1991): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FA-SEB J* 5:2145-2154.
  34. 김연수, 김철욱, 김인철, 곽대오, 정기화 (2009): Brilliant cresyl blue 염색 방법과 극체 방출 여부에 따른 돼지 체외수정용 난포란 선별 방법이 배발달에 미치는 영향. *한국동물번식학회지* 33(1):29-33.
  35. 정기화, 허태영, 곽대오, 방충생, Day BN (1999): 돼지 난자의 직경이 체외성숙 및 체외발달에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 14:17-22.  
(접수일자: 2010. 3. 17 / 채택일자: 2009. 3. 25)