

미니돼지 정자 동결 보존에 Tea-N-Tris의 첨가가 체외 수정 및 MMPs 활성화에 미치는 영향

김상환¹ · 강현아² · 박용수³ · 윤종택^{1,4,*}

¹한경대학교 유전공학연구소, ²한경대학교 미래융합기술대학원 동물바이오융합전공,
³장수군청 환경위생과 생태복원팀, ⁴한경대학교 동물생명환경과학부 동물생명공학전공

Impact of *In-vitro* Fertility and Matrix Metalloproteinases Activation of Spermatozoa by Supplement of Tea-N-Tris to Sperm Cryopreservation of Miniature Pig

Sang-Hwan Kim¹, Hyun-Ah Kang², Yong-Su Park³ and Jong-Taek Yoon^{1,4,*}

¹Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea.
²Major in Animal Fusion Biotechnology, Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea.
³Jangsu Endangered Species Restoration Team, Jangsu 597-831, Korea
⁴Department of Animal Life Science, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea.

ABSTRACT

The main purpose of this study is to estimate the effect of adding Tea-N-Tris (TES) to the freezing buffer for miniature pig sperm. In particular, we attempted to identify the association between the MMPs expression and the fertility and viability of frozen sperm from each extender (LEY (Lactose Egg-Yolk), TLE (TES + LEY), TFGE (TES + Fructose + Glucose Egg-Yolk)). In accordance with this, Hypoosmotic Swelling Test (HOST) respond test was the lowest among sperms frozen in LEY while the highest HOST respond was observed among sperms frozen in TLE. Furthermore, we observed MMPs expression in all sperm groups, with pro-MMP showing lower expression than active MMPs. The expression of MMP-9 and MMP-2 was the highest in sperms frozen in LEY, Meanwhile, sperms from the TFGE and TLE group showed lower level of MMP-9 and MMP-2 expression in the order of TLE being the lowest. LEY group showed lower rate of blastocyst development than the TES supplement group, although the difference was not statistically significant. Meanwhile the rate of blastocyst development appeared similar when sperms from TLE and TFGE group were used for IVF. Together, these results indicate that adding Tea-N-Tris to the sperm freezing buffer only suppresses MMPs protein activation but also maximize *in-vitro* fertility, providing a means to improve the success rate in the *in vitro* manipulation of miniature pig sperm.

(Key words : miniature pigs, extender, TES, MMPs, *in-vitro* fertility)

서 론

일반적으로 돼지의 정액은 저온에 예민하며(Palge, 1973), 다른 가축의 정자와는 달리 첨체를 구성하는 정자막에 불포화지방산의 함량이 높아 동결 과정 동안 지질의 산화로 생존성 및 운동성이 저하 되는 것으로 알려져 있다(Mazur, 1984). Choi 등 (2007)의 연구 결과에 따르면 돼지 정액의 동결시 산화방지제 첨가가 정자 지질막의 산화를 방지시켜 성공적인 동

결성을 가질 수 있다고 보고한바 있으며, 특히 용해 온도 및 시간에 따른 생존성의 차이를 시사한 바 있다(Arriora, 1982; Choi 등, 2007). 현재 돼지 정액의 동결보존액으로는 Lactose Egg-Yolk (LEY)가 널리 사용되고 있으나 동결 및 용해시 세포 내 빙결 재형성으로 인하여 미토콘드리아의 손상을 일으키기 때문에(Courtens와 Paquignon, 1985), 정액의 동결 효율성 증가를 위한 냉각속도 및 용해온도와 시간에 대한 영향은 매우 중요하다(Shim 등, 2005). Kim 등 (2012)의 연구 결과에

* 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ009596)의 지원에 의해 수행되었다.

† Correspondence : E-mail : jtyoon@hknu.ac.kr

따르면 미니돼지의 정자는 일반돼지와 생리학적 영향이 다르며, 동결 방법에도 차이가 있고, 특히 일반돼지에서 사용된 LEY의 경우 미니돼지에서는 낮은 생존성을 보이거나 가젤과 같은 특수동물에 사용되는 Tea-N-Tris(TEs)의 첨가가 미니돼지 정자의 생존성을 높인다고 보고하였다. 이러한 연구 결과는 Tea-N-Tris가 정자 세포막의 보호를 돕는 역할을 하는 것이라 볼 수 있는데(Garde 등, 2003), 이는 정자의 physiological processes 및 적절한 단백질 분해효소를 활용할 수 있는 능력을 통하여(Yanagimachi 등, 1994), 침체막 안에 특정 단백질 분해효소를 형성시키는 역할을 할 때(Phelps 등, 1990) Tea-N-Tris가 정자 세포막의 분해에 대한 완충제 역할을 할 것이라 사료된다. 그러나 상기된 바의 기능이 제시되긴 했지만, 아직까지 미니돼지 정자의 수정능력에 미치는 영향에 관련한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 Kim 등 (2012)의 연구 결과를 토대로 미니돼지 정자를 각 세 종류(LEY(Lactose Egg-Yolk), TLE (TES+LEY) 그리고 TFGE (TES+Fructose+Glucose Egg-Yolk))의 동결 보존액을 사용하여 동결-융해 후 정자의 정상성 및 수정능력을 평가하기 위하여 정자세포의 형태적 재구성 및 수정에 있어 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려진 Matrix metalloproteinase(Longin 등, 2001, 2002; Kim 등, 2013)의 활성분석 및 체외 수정률을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 공시 정액

본 실험에 사용된 정액은 경기도 평택시에 위치한 메디칼 네틱스(주)의 Midget miniature pig에서 의빈대를 이용한 음경 수압법으로 정액을 채취하여, 전체 정자의 70% 이상의 정상 움직임과 80% 이상의 생존율을 현미경하에서 확인한 후, 미리 제조된 1차 동결 보존액(TLE, LEY, TFGE)으로 4×10^7 정자/ml가 되도록 희석한 후 37°C로 가온한 보온병에 담아 2시간 이내로 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다.

2. 동결 보존액의 준비

실험에 사용된 1차 동결 보존액인 LEY는 Westendorf 등 (1975)의 방법을 보완하여 제조하였고, TES가 첨가된 TLE 및 TFGE의 제조는 Kim 등(2012)의 방법에 따라 제조되었으며, 제조된 모든 1차 동결 보존액에 각각 Egg-Yolk 20%를 혼합하고, 원심분리(4,000 rpm, 30min, 4°C)하여 상층액만을 사용하였다. 2차 동결 보존액은 동결 시 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)와 glycerol의 최종 농도를 0.5%와 각 1.5%로 하였다. 특별하게 언급 또는 기술하지 않는 한 본 실험에 사용된 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

3. 정액 동결 및 동결 정액 융해

1차 동결 보존액으로 희석되어 운반된 정액은 37°C에서 4°C까지 2시간 동안 냉각하였다. 그 후 2차 동결 보존액을 총 용량의 1/2로 첨가하여 0.5 ml straw에 넣어, 액체 질소가 담겨있는 용기의 액체 질소 표면 위로부터 5 cm 위 -180°C에서 10분간 정치한 후, 액체 질소에 침지하여 동결 보관하였다. 동결-융해는 항온 수조를 이용하여 75°C에서 5초 동안 융해하였다.

4. 정자 원형질막 기능 검사

Jeyendran 등(1984)의 방법을 보완하여 사용하였다. 정자 부유액 100 µl에 Hypoosmotic Swelling Test(HOST : 150 mOsm/kg fructose, 150 mOsm/kg sodium citrate) 1 ml를 혼합하여 37°C에서 30분간 배양한 후, 표본을 제작하여 위상차 현미경으로 400배하에서 400마리의 정자를 세어 백분율로 환산하여 분석하였으며, 검사 기준은 미부의 형태가 부풀어 오르거나, 나선형으로 감겨 있는 정자를 세었다.

5. Protein 분석을 위한 시료 제작

1) 정자 세포에서의 Total Protein의 추출 및 Slide 제작

(1) 정자 세포에서 Protein 추출

단백질의 분리는 용해 처리가 끝난 정자 세포 5×10^6 을 5,000 rpm에서 5분간 1 ml의 1 × PBS를 넣어 섞은 후 5,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 제거한 후, PRO-PREP™ (Intron biotechnology, USA.)을 100 µl 혼합하여 4°C에서 30분 동안 반응시킨 후 13,000 rpm(4°C)으로 원심 분리하여, 상층액을 추출하고, -20°C에 보관하여 사용하였다.

(2) 정자 세포의 면역학 분석을 위한 Slide 제작

먼저 정자 세포를 용해한 상태에서 4,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 1 × PBS로 세척한 후 4% formaldehyde를 넣어 잘 섞은 후, poly-L-lysine으로 도포된 slide 위에 올려 4°C에서 30분 동안 고정한 후 0.2% Triton X-100으로 불순물을 제거하였다. 이후 Tris-buffer(25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)에 0.1% Tween 20을 첨가하여 TTBS를 만든 후, 2회 세척한 후 coverslip을 덮어 4°C에 보관하였다.

6. MMP-2, MMP-9의 효소 활성화 분석

1) Zymography

전체 단백질 내에 기저막 분해 효소(MMPs)의 효소 활성 반응(비활성 MMPs : pro-MMPs, 활성 MMPs : active-MMPs)을 분석하기 위하여, 20 mg의 total 정자 단백질을 배양 배지

를 zymography 반응액인 2 μ l/10 μ l FOZ loading buffer(5% Bromo phenol blue, 10% SDS, 2% Glycerol)를 섞어 얼음 위에서 5분간 반응시킨 후, 100 mg/ml의 gelatin이 포함된 Gelatin SDS-PAGE gel에서 150 V로 1시간 30분 동안 전기 영동하였다. 전기영동한 후 gel은 renaturation buffer(2.5% Triton X-100, 1 \times PBS)로 20분간 2회 단백질 재형성화를 유도한 후, 멸균수로 20분간 세척하였다.

재형성화 이후 zymography reaction buffer(1M Tris-HCl pH 7.5, 5 M NaCl, 1 M CaCl₂, 0.2 mM ZnCl₂, 0.2% Triton X-100, 0.02% NaN₃)에 넣어, 37°C에서 18시간 동안 효소를 반응시켰다. 반응이 끝난 zymography gel은 Coomassie blue R250(Bio-rad, USA)로 단백질 염색을 1시간 동안 유도하였으며, 이후 탈색하여 탈색된 부분을 분석하였다.

7. MMP-2, MMP-9 및 Inhibitor의 단백질 발현 양상

1) ELISA

배양 배지와 정자 단백질에서 특정 단백질의 발현량을 분석하기 위하여 96 well ELISA plate에 primary antibody로 도포하여 4°C에서 하루 동안 coating한 후, washing buffer(1 \times PBS with 2.5% Triton X-100)로 2회 세척하였다.

Blocking을 위해 1% SKmilk blocking solution으로 4°C에서 24시간 동안 blocking하였다. Washing buffer로 세척한 후 secondary antibody로 2시간 동안 detection하고, substrate solution(R&D Systems, USA)으로 반응시킨 후, 1 M NH₂SO₄로 반응을 중지시키고, 450 nm로 흡광도를 측정하였다.

2) Immunofluorescence

각 처리된 정자 slide를 0.2% Triton X-100으로 실온에서 5분씩 2회에 걸쳐 재형성화를 하였고, 이후 TTBS(1 \times Tris, 1 \times NaCl, 0.02% Tween 20)로 3회 세정한 후 5% normal horse serum에 1% goat serum을 1 \times PBS에 섞어 실온에서 1시간 동안 blocking하였다. Primary antibody(MMP-2, 9과 TIMP-2, 3)를 blocking solution으로 1:200으로 희석하여, 4°C에 24시간 동안 항원 항체 반응을 유도하였다. 반응 유도 후 1 \times PBS로 4회 세정하였으며, Secondary Antibody Alexa-594(red), 488(green)로 37°C에서 30분 동안 반응하고, 1 \times PBS로 5분씩 3회 세정한 후 Hoechst33342로 정자의 핵과 세포질을 counting staining하여 H-1000으로 mounting하였고, 형광현미경(400 \times)으로 분석하였다.

8. 정자의 수정 능력 평가를 위한 체외 수정

1) 난자의 채란 및 체외 성숙

도축장에서 도축된 돼지의 난소를 채취하여 항생제(Peni-

cillin G 100 IU/ml, Streptomycin 100 μ g/ml)가 첨가된 37°C의 생리식염수에 넣어, 2시간 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 생리식염수로 3회 세척하고, 18gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 3~5 mm의 난포에서 난포액과 난자를 흡입, 채취하였다. 15 ml round bottom tube(Falcon, USA)에 담아 10분간 정지시켜 상층액을 제거하고, 하층의 침전액에서 난자를 채취하였다. 난자는 난구 세포의 부착 상태가 전체적으로 치밀하고 균일하게 부착된 난자만을 회수하여 실험에 사용하였으며, 수집된 난자는 HEPES-buffered tissue culture medium 199(TCM 199; Gibco, USA)에 10 μ l/ml antibiotic antimiotic(Gibco, USA), 0.3%(w:v) bovine serum albumin(BSA; Sigam, USA)이 첨가된 T-washing으로 3회 세척한 후 2.5 μ g/ml gonadotrophic hormone(GTH; Sigma, USA), 15 ng/ml epidermal growth factor(EGF; Sigma, USA) 및 30 μ g/ml kanamycin(Sigma, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Sigma, USA)와 10% porcine follicle fluid(pFF)를 각각 첨가한 TCM-199 성숙 배양액에 1회 세척한 후 같은 배양액을 4-well dish(Nunc Co., Denmark)에 각 well 당 1 ml와 200개의 난자를 넣고, 38.5°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 22시간 동안 1차 체외 성숙을 유도하였다. 그 후 동일한 체외 성숙 배지에서 GTH를 제거한 배지를 사용하여 22시간을 추가로 2차 체외 성숙을 완료하였다.

2) 체외 수정 및 체외 배양

체외 수정에 이용된 배양액은 mTBM(NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ · 2H₂O 7.5 mM, Glucose 11 mM, pyruvic acid 5 mM, L-cysteine 0.57 mM, Tris 20 mM, Penicillin G 20 mM, streptomycin sulfate 3.4 mM)을 사용하였다. 체외 성숙된 난자는 modified Tris buffer medium(mTBM)으로 1회 세척 후 4-well dish에 각 well 당 mTBM 500 μ l와 성숙 난자 200개를 넣었다. 이후 동결 정액을 37°C, 45초 동안 용해한 후 Percoll 처리 방법(Lee 등, 2011)을 이용하여 분리하였고, 정자의 침체 반응을 유도하기 위하여 bovine serum albumin(BSA; Sigma, USA)와 1 mM caffeine(Sigma, USA)이 첨가된 mTBM 배양액에 최종 농도를 1 \times 10⁶ 마리/ml로 희석하여 난자가 들어있는 well에 체외 수정한 후 38.5°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 6시간 후 수정된 난자의 주위에 붙어 있는 난구 세포와 정자를 제거한 후 NCSU-23(North Carolina State University-23)에 0.03% BSA를 첨가한 체외 배양액에서 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하며 관찰하였다.

9. 통계적 분석

본 논문에서 얻어진 데이터들은 SPSS Statistics 20(SPSS, Korea)를 이용하여 T-test와 GLM(Generalized linear model)

방법으로 통계적 유의성을 분석하였다.

결 과

1. 동결 정액의 HOST 양성 반응을

미니돼지의 동결 보존액에 따른 HOST 양성 반응율 분석 결과는 Fig. 1과 같다. Glycerol 1.5%가 첨가된 TFGE, TLE와 LEY의 동결보존액을 75℃로 5초 동안 용해한 결과, TFGE와 LEY는 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 TLE는 다른 동결 보존액에 비하여 높은 HOST 양성 반응율이 나타났고, LEY의 경우, 낮은 HOST 양성 반응율이 나타났다.

2. 동결 보존액에 따른 MMPs의 활성화 분석

미니돼지 정자에서 세포의 기저질 분해 효소인 MMP-2, 9과 TIMP-2, 3의 발현 양상 및 활성을 분석한 결과 Fig. 2와 같다. MMPs의 발현 양상을 분석한 결과, 세포의 기저질에서 작용하는 MMP-2의 경우, TFGE에서 유의적($P < 0.05$)으로 높게 발현되는 것으로 확인되었으며, TLE와 LEY는 큰 차이를 보이지 않았지만 LEY에서 약간 높은 발현을 보이고 있었다. 세포의 기저막에서 작용하는 MMP-9의 경우, LEY에서 유의적으로 가장 높은 발현을 보이고 있었으며, TLE에서 낮은 발현을 나타내고 있었다. 또한 MMPs의 억제 인자인 TIMPs의 경우, TIMP-2와 3 모두 TFGE와 TLE에서 높은 발현한 반면, LEY에서는 유의적으로 낮은 발현을 보이고 있어, MMPs의 발현 양상과 상반된 발현이 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. MMPs의 활성을 분석한 결과, MMP-2와 9의 경우, LEY에서 가장 높은 활성을 나타내고 있었으며, TFGE와 TLE에서는 LEY보다 낮은 활성 MMPs를 관찰할 수 있었다. 특히 TLE 동결 보존액에서 유의적으로 가장 낮은 MMPs의 활성을 보였다 (Fig. 2B).

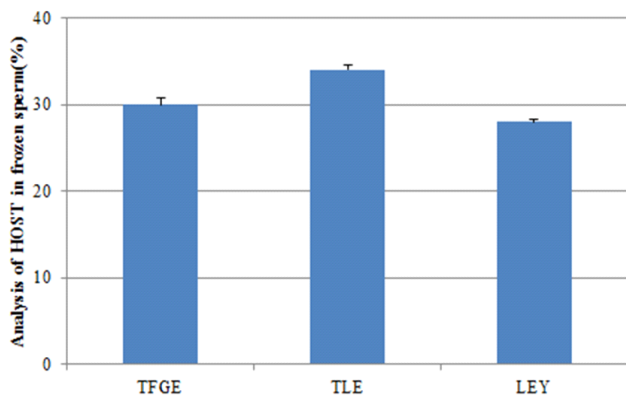


Fig. 1. Effect of freezing extender on the percentage of the hypoosmotic swelling test(HOST).

3. 정자에서 세포의 기저질 분해 효소 및 억제 인자의 발현 위치 분석

미니돼지 정자에서 세포의 기저질 분해 효소인 MMP-2, 9과 TIMP-2, 3의 발현 및 위치 분석을 한 결과, Fig. 3과 같다. 먼저 MMP-2, 9의 발현 양상 분석 결과, MMP-2의 경우, 두부의 주변에 주로 발현이 높았음을 관찰할 수 있었으며, MMP-9의 경우, 두부의 중심부와 중편부, 미부에서 높은 발현이 있음을 관찰할 수 있었다. 각 동결 보존액 별로 발현 양상을 분석한 결과, ELISA의 분석 결과와 같은 양상으로 LEY에서 높은 발현 양상을 보이고 있었으며, TLE에서 가장 낮은 발현을 보이고 있었다. TIMPs의 발현 양상을 분석한 결과, TIMP-2, 3 모두 정자 두부의 전체에서 발현을 확인할 수 있었다. 발현 양상은 LEY에서는 TIMP-2, 3 모두 미약하게 관찰되었고, TFGE와 TLE에서 많은 발현을 관찰할 수 있었으며, 그 중 TLE에서 가장 높은 TIMPs의 발현을 확인할 수 있었다.

4. 동결 보존액에 따른 체외 수정률 평가

정자의 수정능을 평가하기 위하여, 일반돼지의 난자를 이용한 수정률 평가를 분석한 결과, Table 1 그리고 Fig. 4와 같다. TFGE의 경우, 체외 수정 후 2일차에서 2 cell 이상 43.2%의 수정률을 보였으며, 4일 후 2 cell 이상의 수정란에서 4 cell 이상까지 발생률은 83.5%였고, 4 cell 이상에서 배반포의 발달률은 42%의 결과를 보이고 있었다. TLE의 경우, 수정 후 2일차에서 46%의 수정률을 보이고 있었으며, 2 cell 이상에서 4 cell 이상까지의 발달률은 74.8%를 나타내고 있었고, 4 cell 이상에서 배반포까지 40%의 발생률을 확인할 수 있었다. LEY의 경우, 체외 수정 후 2일차에서 34.2%의 수정률을 확인할 수 있었으며, 2 cell 이상에서 4 cell 이상까지의 발달률은 67%를 나타내고 있었고, 4 cell 이상에서 배반포까지 36%의 발생률을 확인할 수 있었다(Table 1).

고 찰

돼지 정자는 정자막의 불포화 지방산 축적으로 높은 지질 과산화로 핵막의 손상이 높고 동결보존시 생존율이 낮다 (Maxwell과 Johnson, 1997; Salisbury 등, 1978). 특히 미니돼지의 경우 일반돼지의 정자 성숙과는 다르게 호르몬의 기전 및 정자의 형성에 있어 단백질 분해 효소의 작용에 차이가 있어 첨체의 반응 시간 및 반응율이 다르고, 동결 보존시 내동성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Haley 등, 1993; Carreau, 2001; Jin 등, 2001). 또한 정자 원형질막의 콜레스테롤 분포에도 차이가 있어 정자세포막의 분해가 높을 것으로 사료된다(Cerolini 등, 2001). 특히 선행 연구를 통하여 일반돼지 정자의 동결방법과는 생리학적 차이가 높을 것이라 사료되어

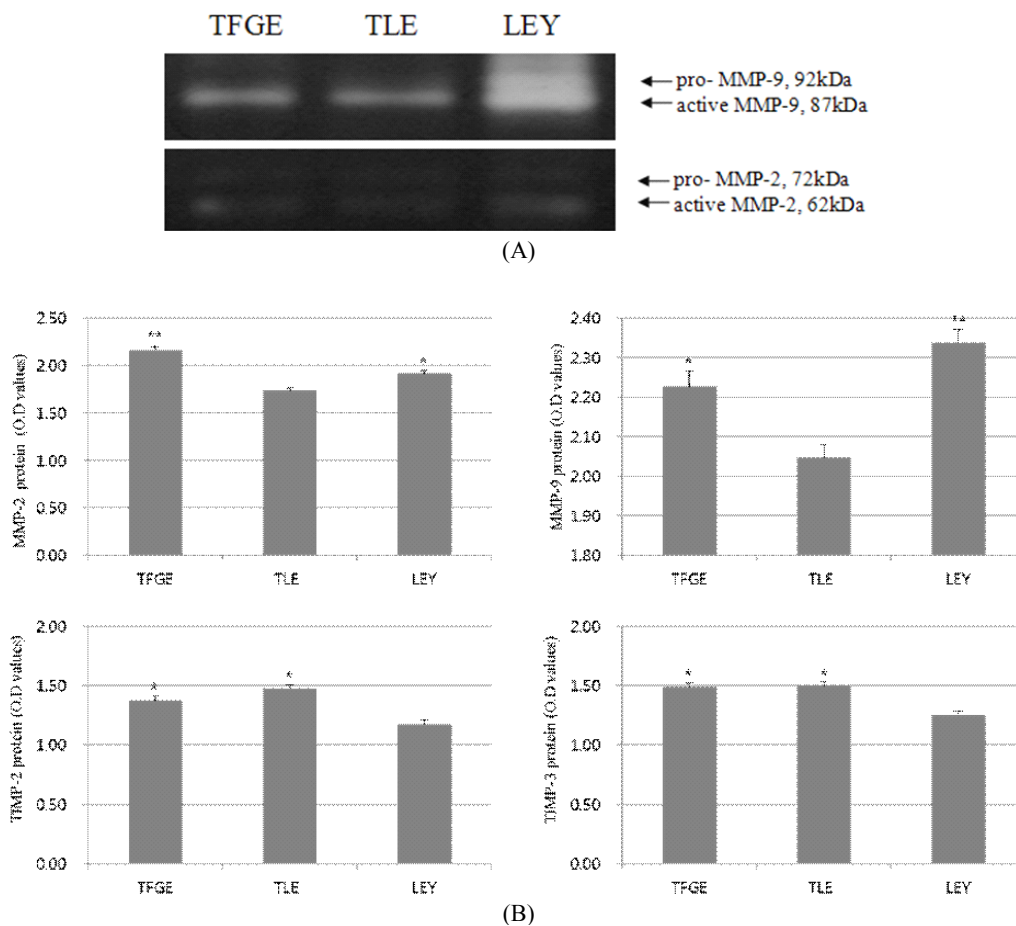


Fig. 2. Expression of MMPs and TIMPs protein in the sperm of miniature pigs. Zymography analysis of the MMP activity in the sperm protein (A). MMPs and TIMPs protein expression by ELISA (B). Different letters within the same column represent a significant difference ($p < 0.05$).

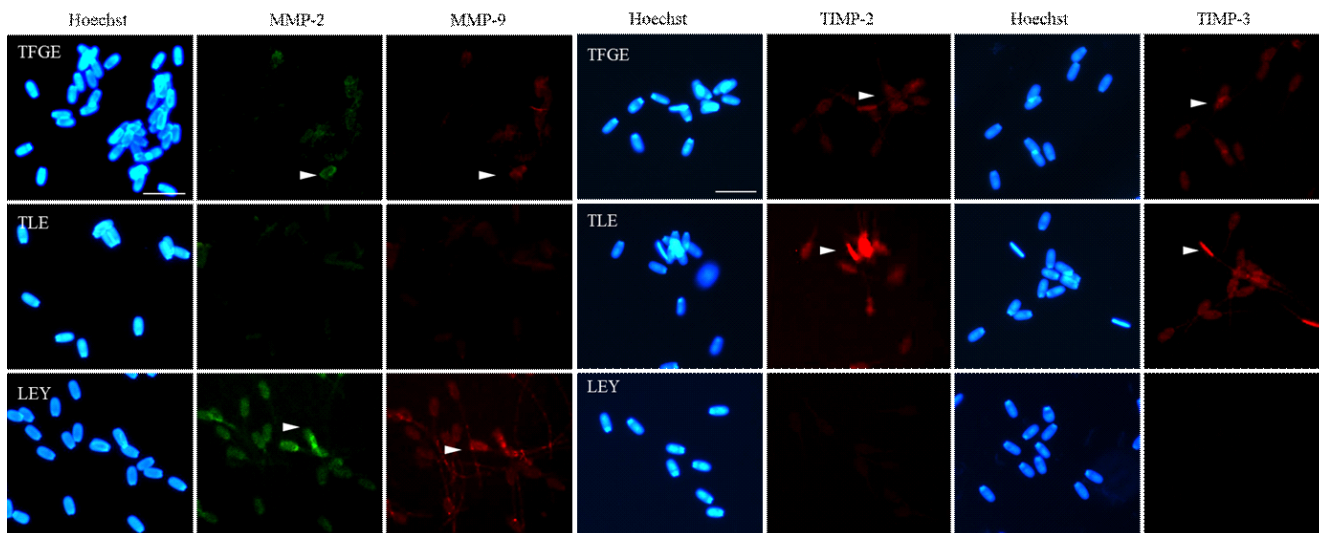


Fig. 3. Localization of MMPs and TIMPs protein in the sperm of miniature pigs. White arrows indicate MMPs and TIMPs expressing cells. Original magnification $\times 400$.

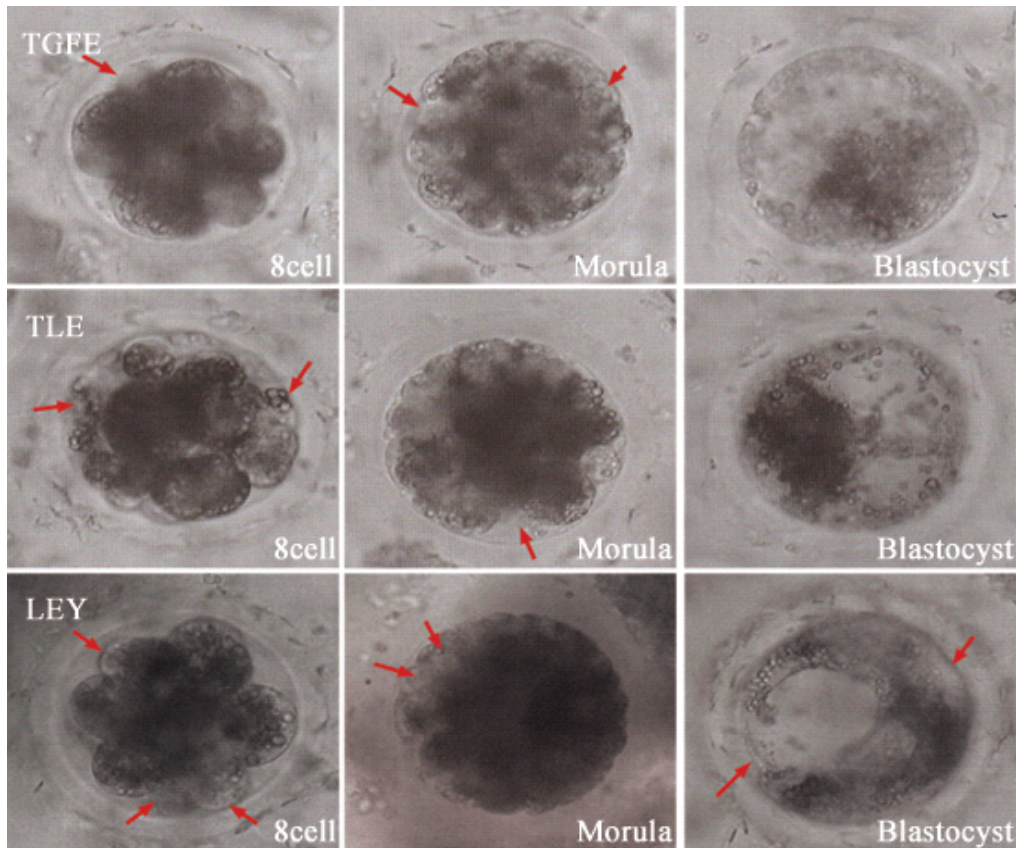


Fig. 4. Morphological differences of *in vitro* fertilized eggs after being treated with various types of extenders. A red arrow is assumed to be cell degradation.

Table 1. Effect of the freezing extender on the IVF rate of spermatozoa

Type of extender	No. of oocytes	No. of oocyte developed to (After <i>in-vitro</i> fertilization)		
		2 cell (1 day) (%)	4 cell (2 day) (%)	Blastocyst (6~7 day) (%)
TFGE	238	103(43.2)*	86(83.5)**	36(42)**
TLE	250	115(46.0)**	86(74.8)*	34(40)*
LEY	266	91(34.2)	61(67.0)	22(36)

LEY(Lactose Egg-Yolk), TLE(TES + LEY), TFGE(TES + Fructose + Glucose Egg-Yolk).

** Different letters within the same column represent a significant difference($p < 0.05$).

본 연구에서 일반돼지의 동결보존액과 TES를 첨가한 동결보존액으로 동결 융해시 미니돼지 정자의 정상 침체 반응에 영향을 주는 효소의 분석과 수정률에 미치는 영향을 분석하고자 실시하였다. 미니돼지 정자의 동결에 있어 Kim 등 (2012)의 결과에 따르면 일반돼지에서 사용되는 LEY에서 정자의 생존성 및 운동성이 급격하게 저하되며, 비정상 침체의 형성이 높아지는 것을 확인할 수 있었으며, 본 연구결과에서도 TES가 첨가된 동결보존액에서 높은 HOST 양성 반응을 나타내는 것으

로 확인되었고, LEY에서 낮은 양성 반응이 형성되는 것을 볼 수 있어, 첨가된 TES가 정자의 침체 및 핵막을 보호하여 정자막의 손상을 줄일 수 있는 것이라 알 수 있다(Garde 등, 2003; Kim 등 2012). 또한 정자 침체의 기능적 정상성을 분석하기 위하여 정자의 세포막 효소의 재배열 및 분해를 하는 MMPs와 이를 억제하는 TIMPs(Diaz-Perez 등, 1988; Diaz-Perez와 Meizel, 1992; Chesneau 등, 1996; Kim 등, 2013)의 발현양상을 통하여 각 동결보존액으로 동결된 미니돼지 정자의 세포막

내 효소 반응을 분석한 결과, LEY의 경우 MMP-2와 9 모두 높게 발현되었고, 억제자인 TIMPs의 발현은 낮아 비정상 침체의 형성이 TES 동결보존액에 비하여 높은 것을 확인 할 수 있었다. 특히 TES의 첨가군은 정자 내 MMPs의 발현이 낮았으며, TIMPs의 발현이 높은 것을 확인 할 수 있었고, 그 중 TLE의 경우 TIMPs의 높은 발현으로 MMPs의 발현이 억제되는 것으로 사료 되었다(Longin 등, 2002). 정자에서의 MMPs와 TIMPs의 발현양상은 Orit 등(2002)의 연구보고와 같이 정자의 두부(acrosome)와 중편부(midpiece)에서 모두 발현되고 있음을 알 수 있었고, LEY의 MMP-2의 발현은 두부에서 높은 발현을 이루고 있었으며, MMP-9의 경우 중편부까지 발현율이 높았다. 이와 같은 결과는 정자 세포막의 손상시 MMP-2의 발현 및 활성이 증가한다는 결과와 같았으며, 중편부에서 MMP-9의 발현은 정자의 운동성 및 생존성에 악영향을 미치는 것으로 사료된다(Kim 등, 2013). 또한 MMPs활성 분석에서도 LEY에서 MMPs의 활성이 높아진 반면 TES가 첨가된 군에서는 낮은 활성이 이루어지는 것을 확인하여 정자의 동결 용해 이후 세포표면의 변화과정에서 이루어질 수 있는 proteinases의 활성이 이상정자의 출현을 높일 수 있다는(Huarte 등, 1987) 연구결과와 같았다. 즉, 동결보존에 있어서 TES가 정자표면을 보호하며, 지질 과산화를 줄이고, MMPs의 활성을 낮춰 생존능력 및 정상 침체반응을 높이는 것으로 사료된다. 또한 각 동결보존액으로 동결된 미니돼지 정자의 수정률을 평가한 결과 TES가 정자의 정상적인 수정능 획득 및 수정률을 향상시키는 것으로 사료되며, 특히 TLE에서 유의적으로 높은 수정률을 보였다. 따라서 본 연구결과는 보존액으로 사용된 TES가 정자 표면을 보호하여 용해시 MMPs의 활성을 줄이고 침체 정상성을 향상시켜 생존율에 긍정적인 영향을 주는 것이라 사료된다. 따라서 본 연구 결과를 종합하여 볼 때 미니돼지 정자의 동결에 있어 정자세포막 보호에 TES와 Lactose Egg-Yolk의 혼합 동결보존액의 사용이 동결 용해 후 비정상 정자의 출현을 억제하여 수정률 및 배발달을 향상 시키는 것으로 사료된다

결 론

본 연구는 미니돼지 정자의 동결에 있어서 첨가된 TES가 정자의 정상성 및 수정률에 미치는 영향을 판단하기 위하여 실시하였다. 정자의 정상성 및 비정상 정자의 출현 정도를 분석하기 위하여 MMPs의 발현양상 및 활성을 분석한 결과 TES 첨가군에서 낮은 MMPs의 반응을 확인할 수 있었으며, 억제자인 TIMPs의 높은 반응을 관찰할 수 있었다. 그러나 TES가 제거된 LEY의 경우 높은 MMPs의 반응을 보였으며, 억제자인 TIMPs의 반응이 낮아지는 것을 확인할 수 있어, 정자

정상성에 영향을 미치는 것으로 사료되었다. 특히 동결 보존액 별 수정률 분석에서도 LEY는 TES군에 비하여 낮은 수정률을 보였으며, 배반포의 발달율이 상대적으로 낮았다. 따라서 본 연구 결과를 통하여 TES가 정자의 침체 및 핵막을 보호하여 MMPs의 발현 억제와 체외수정률을 높여주는 역할을 하는 것으로 보이며, 이는 미니돼지 정자 동결 및 체외수정에 긍정적인 역할을 할 것이라 사료된다.

참 고 문 헌

- Arriola J. 1982. Interaction of formaldehyde and of sodium and triethanolamine lauryl sulfate on the motility and fertilizing ability of rabbit and bull spermatozoa frozen in egg yolk and milk extenders. Ph. D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
- Carreau S. 2001. Germ cells; a new source of estrogens in the male gonad. *Mol. Cell Endocrinol.* 178: 65-72.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F and Gliozzi TM. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121: 395-401.
- Chesneau V, Prat A, Segretain D, Hospital V, Dupaix A, Foulon T, Jegou B and Cohen P. 1996. NRD convertase: a putative processing endoprotease associated with the axoneme and the manchette in late spermatids. *J. Cell Sci.* 109(11): 2737-2745.
- Choi WC, Yang MH, Lee YS, Cheong HT, Yang BK, Lee DS and Park CK. 2007. Effect of thawing temperature on sperm characteristics of frozen semen in miniature pig. *Reprod. Dev. Biol.* 31(3): 175-179.
- Diaz-Perez E and Meizel S. 1992. Importance of mammalian sperm metalloendo metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 122-130.
- Diaz-Perez E, Thomas P and Meizel S. 1988. Evidence suggesting a role for human sperm metalloendoprotease activity in penetrating of zona-free hamster eggs by human sperm. *J. Exp. Zool.* 248: 213-221.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso, Gomendio GM, and Roldan ERS. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles. *Biol. Reprod.* 69: 602-611.
- Haley CS and Lee GJ. 1980. Genetic basis of prolificacy in meishan pigs. *J. Reprod. Fertil.* 48: 247-259.

- Huarte J, Belin D, Bosco D, Sappino AP and Vassalli JD. 1987. Plasminogen activator and mouse spermatozoa: urokinase synthesis in the male genital tract and binding of the enzyme to the sperm cell surface. *J. Cell Biol.* 104: 1281-1289.
- Jeyendran RS, Vander HH, Pelaez MP, Crabo BG and Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228.
- Jin W, Arai KY, Herath CB, Kondo M, Ishi H, Tanioka Y, Watanabe G, Groome NP and Tayat K. 2001. Inhibins in the male Gottingen miniature pig: Leydig cell are the predominant source of inhibin. *B. J. Androl.* 22: 953-960.
- Kim SH, Kang HA, Lee MS, Seo KS and Yoon JT. 2012. Effect of TES extender on sperm characteristics and viability of frozen semen in miniature pig. *J. Emb. Trans.* 27(1): 40-50.
- Kim SH, Song YS, Hwang SY, Min KS and Yoon JT. 2013. Effects of hormones on the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in bovine spermatozoa. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 26(3): 334-342.
- Lee SH, Yoo HJ, Lee YS, Cheong HT, Yang BK, Kim DY and Park CK. 2011. Effects of cryo-extenders for spermatozoa sorted by percoll on *in vitro* fertility of in miniature pigs. *Reprod. Dev. Biol.* 35(1): 85-91.
- Longin J, Guillaumot P, Chauvin MA, Morera AM and Le Magueresse-Battistoni B. 2001. MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. *J. Cell Sci.* 114: 2125-2134.
- Longin J and Le Magueresse-Battistoni B. 2002. Evidence that MMP-2 and TIMP-2 are at play in the FSH-induced changes in Sertoli cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 189: 25-35.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48: 209-219.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 16: C125-C142.
- Orit BS, Zaki K, Yael G and Shlomit G. 2002. Presence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. *J. Androl.* 23(5): 702-708.
- Phelps BM, Koppel DE, Primakoff P and Myles DG. 1990. Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J. Cell Biol.* 111: 1839-1847.
- Polge C, Salamon S and Wilmut I. 1973. Fertilization capacity or frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Res.* 87: 424-428.
- Salisbury GW, Van Demark N and Lodge JR. 1978. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle.* W. H. Freeman and Co. 2nd (eds), San Francisco, USA.
- Shim KS, Kim KS, Seo KD and Song HB. 2005. Studies on the freezing of boar semen I. Effects of cooling rate and extenders on viability and normal acrosome after frozen-thawed of boar semen. *Emb. Trans.* 20: 43-48.
- Westendorf P, Richter L and Treu H. 1975. Deep freezing of boar sperm. Laboratory and insemination results using the Hulsberger Paillette method. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 82(7): 261-267.
- Yanagimachi R, Edited by Knobil E and Neill JD. 1994. *Mammalian Fertilization.* In *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition, Raven, Press, pp. 189-315.

(접수: 2014. 3. 12/ 심사: 2014. 3. 12/ 채택: 2014. 3. 26)