

Original Article

동결용해 후 토끼 정자의 Matrix Metalloproteinases (MMPs)와 Their Tissue Inhibitors (TIMPs) 발현 양상

김상환¹, 최화식², 윤종택^{1,3,*}

¹한경대학교 유전공학 연구소, ²신한대학교 임상병리학과, ³한경대학교 동물생명환경과학과

Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Tissue Inhibitors (TIMPs) in Frozen Sperm of Rabbit

Sang Hwan Kim¹, Hwa Sik Choi² and Jong Taek Yoon^{1,3,*}

¹Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Shinan University, Uijeongbu 11644, Korea

³Department of Animal Life Science, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

Received September 16, 2019

Revised September 18, 2019

Accepted September 23, 2019

***Correspondence**

Jong Taek Yoon

E-mail: jtyoon@hknu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0002-9408-8239>

ABSTRACT We observed MMPs expression in all sperm groups, with pro-MMP showing lower expression than active MMPs. According to the results from each freezing extender, the sperm membrane integrity (HOST: Hypoosmotic Swelling Test) analysis in TCGGD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Glycerol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M) is 59.8 ± 0.7 , TCGSD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Sucrose 0.1 M, Dimethylsulfoxide 3.5 M) is 59.3 ± 0.5 were significantly higher ($p < 0.05$) among the experimental groups. And MMPs analysis result, we observed MMPs expression in all sperm groups, with pro-MMP showing lower expression than active MMPs. The expression of active MMP-2 was the highest in sperms frozen in TCGSD and TCGD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Dimethylsulfoxide 3.5 M), Meanwhile, sperms from the TCGGD and TCGED (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Ethylene glycol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M) group showed lower level of active MMP-2 expression. Together, these results indicate that adding glycerol or sucrose to the sperm freezing buffer would not only suppress MMPs expression but also minimize DNA fragmentation, providing a mean to improve the success rate in the in vitro manipulation of rabbit sperms. Therefore, these results suggest that TCGGD or TCGSD extender method for freezing-thawing of rabbit sperm increased the viability after thawing.

Keywords: extender, MMPs, sperm, TIMPs, rabbit

서론

정자의 physiological processes는 여러 proteinase와 inhibitor의 상호관계에 따라 세포막의 재형성을 통하여 이루어지며(Barrett 등, 1998), MMPs (metrix metallo proteinase)와 MMPs의 억제인자인 TIMPs (tissued inhibitor metalloproteinses)의 적절한 발현이 정자형성에 관련하여 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있고, 정상적인 정자의 형성을 도모한다는 연구 결과가 있다(Mruk 등, 1997; Wong 등, 2000; Chung 등, 2001; Mruk 등, 2003). 이 중 MMP-2는 gelatinase A로 collagen type IV, V, elastin, fibronectin, laminin, gelatin을 분해하며, MMP-9은 gelatinase B로 collagen type IV, V, VII, X, casein, gelatin 등의 분해를 하는 역할을 하고 있다(Ashisa 등, 1996). MMP-9은 gelatinase B 분해에 영향을 미치는 효소로 세포외에 분포하며 효소 활성도에 따라 수정란의 배발달률에 영향을 미치고 있고, gelatinase 계열의 MMP-2, MMP-9이 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)를 비롯하여 기저막(basement membrane)의 주성분인 type IV collagen 성분을 분해시켜 배발달률에 영향을 주고 있다(Visse 등, 2003). 즉 MMPs는 세포 기질의 활성화에 따른 단백질가수분해 활동을 촉진하며, 정자의 형성과정에서 세포의 형태적 재구성 및 수정에 있어 중요한 역할을 하고 있다(Longin 등, 2001; 2002; Slongo 등, 2002; Orit 등, 2002). 특히 정자의 수정능 획득 이후 수정 과정에서 물리적으로 난구세포 및 투명대의 붕괴에 MMPs의 도움을 받는 것으로 알려져 있으며(Huarte 등, 1987), 수정 전 정상 정자의 수정능력에 대한 이상 유무를 판별할 수 있는 것으로 알려져 있다(Orit 등, 2002).

따라서 본 연구는 TCG 기본 동결보존액에 저온 충격 저하를 위한 egg yolk의 농도 변화가 토끼정자에 미치는 영향을 분석하고 2차 동결보존액에 첨가되는 glycerol, ethylene glycerol, DMSO 및 sucrose의 최종 농도가 토끼 정자의 동결성 및 생존율에 미치는 영향을 분석하고 MMPs의 발현양상을 통하여 원활한 토끼 정자의 동결 보존 시스템을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

정액 채취

정액 채취는 자체 제작한 정액 채취기를 사용하여 인공질법으로 1주일에 한번 30분 간격으로 채취하여 1차 동결 보호제로 4×10^7 정자/mL로 희석 한 후 37°C로 가온한 보온병에 담아 2시간 이내로 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

동결 희석액

실험에 사용될 정액의 희석액의 조성은 Tris 250 mM (T-6791, Sigma, USA), Citric acid 88 mM (C-2404, Sigma, USA), Glucose 47 mM (G-7021, Sigma, USA)을 증류수에 용

해하여 1차 희석액(이하 TCG)을 만들었다. 1차 희석액의 삼투압은 303 osmol로, pH는 7.0으로 맞추었으며, 1차 희석액에 egg yolk 10%를 첨가하였다. 동결보존액으로 사용할 2차 희석액은 1차희석액에 3.5 M의 dimethylsulfoxide (DMSO; D-2650, SIGMA, USA)을 첨가한 보존액(이하 TCGD), 3%의 ethylene glycol과 3.5 M의 DMSO를 첨가한 보존액(이하 TCGED), 3%의 glycerol과 3.5 M의 DMSO가 첨가된 보존액(이하 TCGGD), 0.1 M의 sucrose와 3.5 M의 DMSO가 첨가된 보존액(이하 TCGSD)를 제조하였다.

정액 동결 및 동결 정액 용해

1차 동결 보호제로 희석되어 운반된 정액을 37°C에서 4°C까지 중탕하여 2시간 동안 냉각하였다. 그 후 2차 동결보호제를 V/V으로 4°C에서 순차첨가법을 사용하여 10분 간격으로 3회 희석한 후 4°C에서 30분동안 glycerol평형을 유도한다(Theau와 Roustan, 1982). 0.5 mL straw에 담아 액체 질소 표면 위 10 cm위에서 10분간 예비 동결 시킨 후 액체 질소 안에서 보관 한다. 38°C에서 20초간 용해하여 실험을 하였다(Moce 등, 2003a).

원형질막 기능 검사

용해된 토끼의 정자는 100 uL sperm을 1,500 rpm, 37°C, 5분간 원심분리하여 상층액 제거 후 hypoosmic solution (5% Fructose, 2.6% Sodium citrate) 1 mL 첨가 후 37°C에서 30분 관 보관한다. 50 uL를 슬라이드에 올려 현미경 $\times 400$ 에서 꼬리의 흰 정도와 중편부의 부운정도를 관찰하여 300마리의 정자를 세어 백분율로 환산하여 분석하였다(Fig. 1).

동결 정자의 해동 이후 DNA 절편분석

동결보호제로 동결 이후 해동하여, 1,500 rpm, 37°C, 5분간 원심분리하여 상층액 제거 후 Kim 등(2012)에서 제시한 방법에 따라 페놀 추출 방법으로 DNA를 회수하였다. 이후 1.2% agarose gel에 넣어 100 v에서 약 1시간동안 전기영동하여 DNA 절편을 분리하였고, 1 mg/mL ethidium bromide 시약에서 DNA 절편 염색을 유도한 후 UV상에서 관찰하였다.

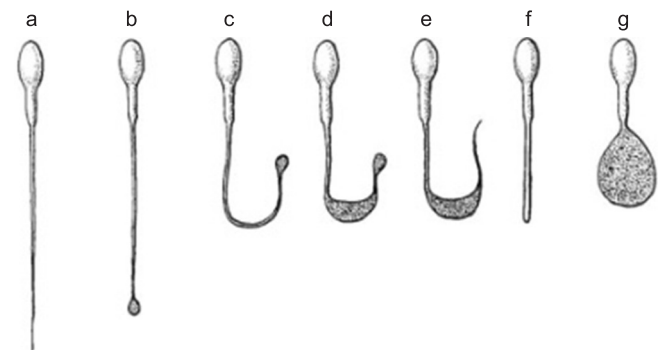


Fig. 1. Patten of hypoosmotic-swelling (HOST).

MMP-2, MMP-9의 효소활성화 분석

MMPs의 효소반응을 분석하기 위하여 20 µg의 total 정자 단백질과 배양배지를 zymography 반응액인 2 µL/10 µL 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 영동 하였다. 전기영동 한 후 gel은 renaturation buffer (2.5% Triton X-100, 1×PBS)로 20분간 2회 단백질 재형성화를 유도 한 후, 멸균수로 20분간 세척하였다. 단백질을 재형성화 한 이후 zymography reaction buffer (1 M Tris-HCL pH 7.5, 5 M NaCl, 1 M CaCl₂, 0.2 mM ZnCl₂, 0.2% Triton X-100, 0.02% Na₃N)에 넣어 37°C에서 18시간 동안 효소 반응 시켰다. 반응이 끝난 zymography gel은 coomassie blue R250 (Bio-rad, USA)로 단백질 염색을 1시간 동안 유도 하였으며, 이후 탈색하여 탈색된 부분을 분석 하였다.

MMP-2, MMP-9 및 inhibitor의 단백질 발현양상

배양배지와 정자 단백질에서 특정 단백질의 발현양을 분석하기 위하여 96 well ELISA plate에 primary antibody로 도포하여 4°C에서 하루 동안 coating한 후 washing buffer (1×PBS with 2.5% Triton X-100)로 2회 세척하였다. Blocking을 위해 1% skim milk blocking solution으로 4°C에서 24시간 동안 blocking 하였다. 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.

통계 분석

실험 결과는 SAS package (version 9.1)를 이용하여 ANOVA와 GLM (Generalized linear model)를 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 통계적 유의성($p < 0.05$)을 분석하였다.

Table 1. Effect of freezing extender on the percentage of the hypoosmotic-swelling (HOST)

Type of extender	Tail changes (%)
TCGD	46.7 ± 0.9*
TCGED	39.7 ± 0.5
TCGGD	59.8 ± 0.7**
TCGSD	59.3 ± 0.5**

***: Different letters within same column represent a significant difference ($p < 0.05$). TCGD: Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Dimethylsulfoxide 3.5 M, TCGGD: Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Glycerol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M, TCGSD: Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Sucrose 0.1 M, Dimethylsulfoxide 3.5 M, TCGED: Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Ethylene glycol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M.

결 과

동결보호제에 따른 토끼 정자의 원형질막 정상성 분석

동결보호제가 동결 용해 후 원형질막 기능에 미치는 영향을 분석하기 위하여 토끼 저온 보존 희석액에 3.5 M의 dimethylsulfoxide (DMSO; D-2650, SIGMA, USA)을 첨가한 보존액(이하 TCGD), 3%의 ethylene glycol과 3.5 M의 DMSO를 첨가한 보존액(이하 TCGED), 3%의 glycerol과 3.5 M의 DMSO가 첨가된 보존액(이하 TCGGD), 0.1 M의 sucrose와 3.5 M의 DMSO가 첨가된 보존액(이하 TCGSD)에 따른 토끼 정액의 동결 용해 후 원형질막 기능 검사 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 TCGGD와 TCGSD에서 각각 $59.8 \pm 0.7\%$ 와 $59.3 \pm 0.5\%$ 가 나와 TCGD의 $46.7 \pm 0.9\%$ 와 TCGED의 $39.7 \pm 0.5\%$ 보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 이러한 결과는 생존율과 침체정상성과 같은 경향의 결과로 비추어 볼 때 토끼 정액의 동결에서 DMSO에 glycerol이나 sucrose의 혼합첨가가 DMSO 단독이나 DMSO와 ethylene glycol 혼합 첨가보다 효과적인 것으로 사료된다($p < 0.05$).

동결보호제에 따른 DNA 손상도 분석

동결보호제가 정자 두부에 미치는 영향을 분석하기 위하여 토끼 정자를 동결-용해하여 phenol-down 추출방법으로 DNA를 추출한 후 DNA fragment 분석을 실시한 결과 Fig. 2와 같다.

동결 용해시킨 토끼 정자의 genomic DNA 추출에 따른 분석에

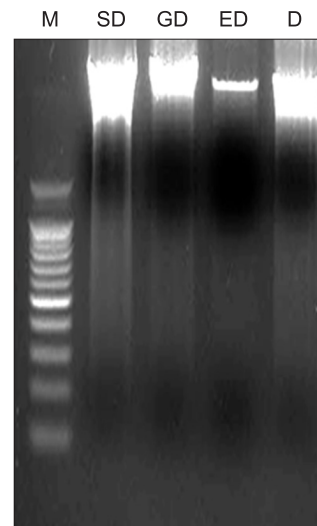


Fig. 2. Analysis of chromosome DNA fragmentation. M: marker, SD: TCGSD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Dimethylsulfoxide 3.5 M), GD: TCGGD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Glycerol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M), ED: TCGED (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Ethylene glycol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M), D: TCGD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Dimethylsulfoxide 3.5 M).

서 TCGSD, TCGGD 그리고 TCGD의 경우 전기영동 상에서 가장 높은 추출률을 보였으나, TCGED의 경우 낮은 DNA의 추출률을 보였다. 또한 DNA band의 끌림의 현상을 통하여 genomic DNA의 손상을 분석한 결과 TCGSD의 경우 DNA marker 100 bp구간까지 끌리는 현상이 나타나 가장 많은 손상을 보였으며, TCGD의 경우도 같은 양상을 확인 할 수 있었다. 그러나 TCGGD의 경우 타 그룹에 비하여 가장 적은 손상을 보였다. TCGED의 경우 genomic DNA의 손상률이 가장 적은 것을 확인 할 수 있었는데, 이는 ethylene glycol의 영향으로 낮은 DNA 추출 및 적은 손상을 보이는 것으로 사료된다.

동결보존액에 따른 세포외 기저질 분해효소의 활성 및 비활성도 분석

각 동결보존액에서 동결-용해한 토끼정자의 단백질 그리고 동결보존액과 정장이 혼합된 단백질에서 MMP-2와 MMP-9의 활성도를 분석한 결과 Fig. 3A와 같다.

먼저 정자 단백질에서 MMP-9의 활성도를 분석한 결과 활성이 완료된 active-MMP-9의 경우 모든 그룹에서 확인 할 수 없었

나, 세포외질로 나와 존재하며 활성을 이루지 못해 비활성화로 존재하는 pro-MMP-9의 경우 TCGSD, TCGGD 그리고 TCGD에서 발현되는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 TCGE의 경우 pro-MMP-9를 관찰 할 수 없었다. MMP-2의 경우 비활성화 된 pro-MMP-2의 경우 TCGSD, TCGGD 그리고 TCGD에서 관찰 되었으나, TCGE에서는 관찰할 수 없었다. 활성화된 active MMP-2의 경우 모든 그룹에서 관찰 할 수 있었으며, TCGE에서는 가장 낮은 활성도를 보였으며, TCGSD와 TCGGD 그리고 TCGD에서의 활성도 분석에서는 TCGD에서 가장 낮은 활성을 보였다.

동결보존액과 정장이 혼합된 단백질에서의 MMP-2, 9의 활성 및 비활성도를 분석한 결과 모든 그룹에서 active MMPs를 관찰 할 수 없었으며, 비활성상태로 존재하는 pro-MMPs만 관찰 할 수 있었는데, 특히 TCGGD의 경우 다른 그룹에 비하여 가장 높은 비활성 MMPs를 관찰 할 수 있었으며, TCGE에서 가장 낮은 비활성 pro-MMPs를 관찰 할 수 있었다.

동결보존액에 따른 MMPs와 TIMPs의 발현양상

각 동결보존액에서 동결-용해한 토끼정자의 단백질에서 세

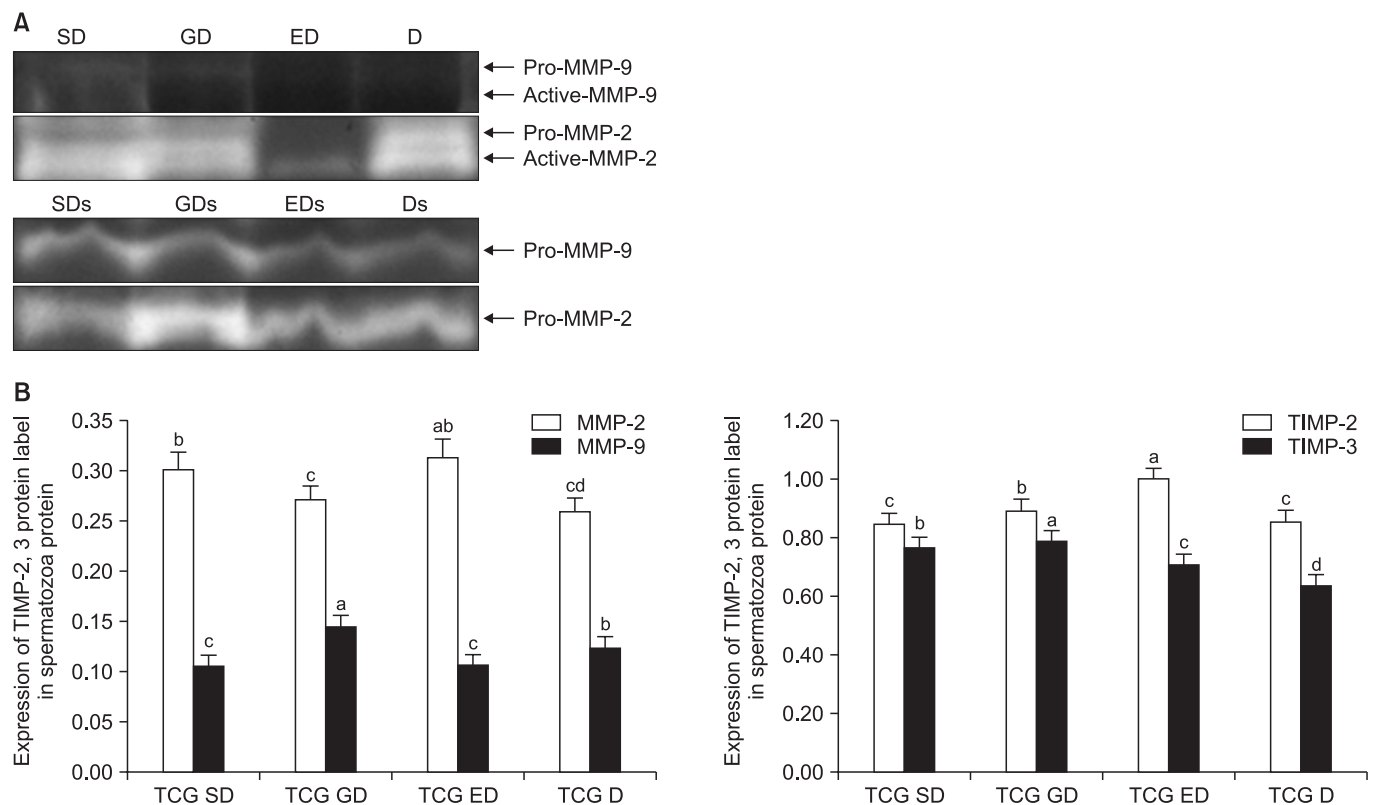


Fig. 3. Expression and active analysis of MMPs in frozen sperm of rabbit. (A) MMPs detected of cultured medium and rabbit spermatozoa protein. (B) ELISA analysis of MMP-2, 9 and TIMP-2, 3 proteins in spermatozoa of rabbit. SD: TCGGD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Glycerol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M), GD: TCGGD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Glycerol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M), ED: TCGED (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Ethylene glycol 3%, Dimethylsulfoxide 3.5 M), D: TCGD (Tris 250 mM, Citric acid 88 mM, Glucose 47 mM, Dimethylsulfoxide 3.5 M), SDs: Semen + TCGSD extender, GDs: Semen + TCGGD extender, EDs: Semen + TCGED extender, Ds: Semen + TCGD extender. ^{a,b,c,d}Different letters within same column represent a significant difference ($p < 0.05$).

포의 기저질 분해효소인 MMP-2, 9과 억제인자인 TIMP-2, 3의 발현양상을 ELISA로 분석한 결과는 Fig. 3B와 같다. MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현양상의 분석 결과 MMP-9의 발현보다 MMP-2의 발현이 모든 그룹에서 높게 발현되었으며, TCGSD와 TCGED에서 TCGGD와 TCGD 보다 높은 MMP-2의 발현양상을 보였고, 그 중 TCGED에서 유의적($p < 0.05$)으로 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. MMP-9의 경우 TCGSD와 TCGED에서 같은 발현양상을 나타냈으며, TCGGD에서 가장 높은 MMP-9의 발현을 확인 할 수 있었다. TIMPs의 발현양상은 모든 동결보존액에서 높게 발현되고 있음을 확인 할 수 있었는데, 특히 MMP-2의 활성을 억제하는 것으로 알려진 TIMP-2의 발현이 가장 높음을 확인 할 수 있었다. 동결보존액 별로 발현양상의 분석 결과 TCGED가 가장 높게 발현되고 있었으며, 다른 그룹은 비슷한 발현을 보였다. MMP-9을 억제하는 TIMP-3의 경우 TCGED와 TCGD에 비하여 TCGSD와 TCGGD에서 높은 발현을 확인 할 수 있었다. 즉 TCGED의 경우 MMP-2와 TIMP-2의 발현이 가장 높았으며, MMP-9과 TIMP-3의 발현이 가장 낮았고, TCGGD의 경우 MMP-2와 TIMP-2의 발현이 낮았으며, MMP-9과 TIMP-3의 발현이 가장 높은 것으로 확인 되었다.

고 찰

동결보존액에 따른 토끼 정자의 보존성을 판별하기 위하여 정자 genomic DNA의 손상률을 분석한 결과에서 glycerol첨가 동결보존액이 다른 동결보존액에 비하여 가장 낮은 DNA 손상도를 보이고 있었으며, DNA 추출률이 높아 정자의 핵상보존에 긍정적인 역할을 하는 것으로 사료되었다.

정자의 수정능 획득 및 침체 반응에 있어서 단백질 분해 효소의 반응 유무가 가장 중요한데, 그중 정자의 MMPs는 정소의 sertori 세포에서 정자가 재형성되는 것을 도우며, 정자가 수정 시 난자의 난구세포를 파고들어 갈 때 난구세포의 ECM을 분해하는 작용을 돕는다(Salamonsen, 1996; Hulbooy 등 1997; Gunnarsson 등, 1999; Song, 2010). 정소에서 MMPs 중 MMP-9의 역할에 주목할 수 있는데 MMP-9의 경우 정소 내에서 정자의 proteases 활성화를 도모하기 위하여 lamina에 있는 교원질 네트워크의 분열을 주도하게 된다. 즉 sertoli cell-tight junctions에 영향을 미치는 ECM의 완전성에 손상을 입혀 정자의 성숙을 유도한다(Hudson 등, 1993; Sternlicht 등, 2001; Robinson 등, 2001; Cheng 등, 2002). 또한 정자가 수정을 위해서 정자 자체에서 MMPs를 발산하여 수정을 원활하게 돕는다는 보고(Orit 등, 2002)가 있으며, Orit 등(2002)의 보고에 따라 92 kD에 준하는 MMP-9의 발현이 낮으면 이상정자로 볼 수 있다는 결과를 통하여 20% egg yolk가 첨가된 TCG 1차 희석액에 dimethylsulfoxide (DMSO)를 단독 혹은 ethylene glycol, glycerol 및 sucrose와 같이 첨가한 동결보존액으로 동결-융해 후 정자 MMPs의 효소의 발현양상 및 활성을 분석한 결과, 2차 동결 보호제인

TCGGD와 TCGED으로 동결-융해한 정자 단백질에서 active MMP-2가 가장 낮게 발현되는 것을 확인하였다. TCGED 희석액의 경우 pro-MMPs의 함량이 적었으나, active MMP-2는 확인할 수 있었다. TCGGD의 경우 TCGED를 제외한 다른 그룹에 비하여 pro 및 active MMPs가 가장 낮았다. 이와 같은 결과는 수정 전 정자의 MMPs 활성이 높으면 정자의 낮은 생존능력 및 침체 정상성을 나타낸다(Orit 등, 2002)는 보고와 같이 TCG 희석액에 3%의 glycerol과 3.5 M의 DMSO를 첨가한 동결보호제인 TCGGD가 다른 보호제보다 효과적일 것이라 사료될 수 있다. 또한 본 연구결과에서 DNA fragment 분석을 통하여 TCGGD에서 chromosome DNA상의 손상도가 낮았으며, 정자의 단백질 발현양상 결과에서도 다른 동결보호제보다 TCGGD의 단백질 다형성이 높게 나오는 것으로 보아 정자 정상성도 다른 동결보호제와 비교하여 상대적으로 높을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구결과를 통하여 동결보존희석액에 DMSO와 glycerol의 혼합이 토끼 정자 동결 시 정자의 두부 내에 MMPs의 활성을 줄여주는 역할을 하여 정상적인 동결에 좋은 효과를 줄 수 있을 것이라 사료된다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Sang Hwan Kim: <https://orcid.org/0000-0003-0996-6912>

Hwa Sik Choi: <https://orcid.org/0000-0002-8675-7359>

Jong Taek Yoon: <https://orcid.org/0000-0002-9408-8239>

REFERENCES

- 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 the egg yolk and milk extender. Ph.D.Thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
- 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.* 1803-1811.
- Cortell C, Viudes de Castro MP. 2008. Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. In: Xiccato, G. (Ed.), 9th World Rabbit Congress. 327-332.
- Footo RH, Carney EW. 2000. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reprod. Toxicol.* 14:477-493.

- Gotze VG, Paufler S. 1976. Fertility results and prenatal mortality following artificial insemination with fresh and deep frozen semen in rabbits after normal induction of ovulation and superovulation. *Zuchthyg.* 11:169-174.
- Gunnarsson M, Lecander I, Abrahamsson PA. 1995. Factors of the plasminogen activator system in human testis., as demonstrated by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mol. Hum. Reprod.* 5:934-940.
- Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology.* 29:26-38.
- Hanada A, Nagase H. 1980. Cryoprotective effects of some amides on the rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 60:247-252.
- Huarte J, Belin D, Bosco D, Sappino AP, 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.
- Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. 1993. Type IV collagen : structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Bio. Chem.* 26033-26036.
- Jeyendran RS, Van der Ven HK, Perez-Palaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70:219-228.
- Kim SH, Min KS, Kim NH, Yoon JT. 2012. Differential expression of programmed cell death on the follicular development in normal and miniature pig ovary. *PLoS One.*;7(10):e46194. doi: 10.1371/journal.pone.0046194.
- Larson JL, Miller DJ. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* 52:445-449.
- Longin J, Guillaumot P, Chauvin MA, Morera AM, 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, 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.
- Michelle KYSIU, Will M, Lee C, Yan C. 2002. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor-gelatinase B (Matrix Metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology.* 144(1):371-387.
- Orit BS, Zaki K, Yael G, Shlomit G. 2002. Presence of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase in Human Sperm. *J. Androl.* 23(5):702-708.
- O'Shea T, Wales RG. 1969. Further studies of the deep freezing of rabbit spermatozoa in reconstituted skim milk powder. *Aust. J. Biol. Sci.* 22:709-719.
- Polgar ZS, Virag GY, Baranyai B, Bodo SZ, Kovacs A, Gocza E. 2004. Evaluation of effects of cryopreservation on rabbit spermatozoa membranes with trypan blue-Giemsa staining. In: Becerril, Pro, A. (Eds.), 8th World Rabbit Congress. *World Rabbit Sci.* 322-329.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164:666.
- Robinson LL, Sznajder NA, Riley SC, Anderson RA. 2001. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Mol. Hum. Reprod.* 7:641-648.
- Sawanda Y and Chang MC. 1964. Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide. *Fertil. Steril.* 15:222-229.
- Slongo ML, Zampieri M, Onisto M. 2002. Expression of matrix metalloproteases (MMP-2, MT1-MMP) and their tissue inhibitor (TIMP-2) by rat Sertoli cells in culture: implications for spermatogenesis. *Biol. Chem.* 383:235-239.
- Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:463-516.
- Theau M, Roustan A. 1982. Etude des possibilites de dilution du sperme de lapin congele pour l'insemination artificielle. *3emes Journees de la Recherche cunicole.* 8-9.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-492.
- Yamagata K, Murayama K, Okabe M, Toshimori K, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T. 1998. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* 273:10470-10474.
- 김상환, 강현아, 이명섭, 서강섭, 윤종택. 2012. Effect of TES Extender on Sperm Characteristics and Viability of Frozen Semen in Miniature Pig. *한국수정란이식학회.* 27:45-50.