

韓牛의 受胎率 增進에 관한 研究

— 韓牛精子の 生存性에 미치는 Caffeine의 影響 —

金 相 根

忠南大學校 農科大學 畜産科

I. 緒 論

人工授精은 家畜의 改良과 増殖을 爲하여 開發된 가장 有效한 手段의 하나로서 家畜繁殖에 널리 利用되어 왔음은 周知의 事實이다. 家畜의 人工授精에 있어 液狀保存과 凍結保存된 精子の 優秀한 運動性을 維持하고 生存性을 延長시키는 것은 受胎率의 向上面에서 대단히 重要하다 하겠다. 그러나, 現在 많이 利用되고 있는 液狀保存精子は 保存時間이 經過함에 따라 生存性이 低下되는 것은 避할 수가 없다.

精子에 對한 Caffeine의 影響은 牛精子^{1,9)} 以外에 豚^{6,12,13,14)} 및 山羊⁸⁾의 射出精子は Caffeine 添加에 의해 運動性이 높아지고 生存時間이 延長된다고 한다. Garbers 等^{3,4)}은 Caffeine 添加가 豚 및 緬羊精子の 生存性 및 呼吸率을 促進시키며, 특히 Piruvinate, 酢酸鹽等의 基質을 添加했을 때 그 効果는 顯著하다고 報告하였다. 한편, 宮本 等^{7,8)}은 Caffeine 添加에 의해 日本和牛 精巢上體精子の 포도糖 消費量과 乳酸蓄積量의 增加 및 果糖分解를 促進시킨다고 報告하였다. 이들 實驗의 大部分은 Linger 液에 精子를 浮遊시켜 運動性과 呼吸에 미치는 影響만을 比較하고 있다. 그러나, 精子の 生存性에 對한 Caffeine의 改善效果를 家畜의 人工授精에 應用하기 위해서는 多角度的 研究檢討가 必要하다 하겠다.

이에 本 實驗은 精子の 生存性에 對한 Caffeine의 改善效果를 韓牛 人工授精에 應用하여, 韓牛의 繁殖率向上과 増殖에 奇與할 目的으로 于先, 現在 널리 利用되고 있는 卵黃子연산 希積精子和 凍結·融解精子の 生存性에 미치는 Caffeine의 影響을 檢討하기 爲해 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 供試精液

精液은 畜協中央會 家畜改良事業所에서 飼育中인 韓牛種牡牛에서 採取한 精液을 使用하였다.

2) 精液處理

原精液을 25~30°C에서 Linger 液으로 2回 洗淨하여 精漿을 除去한 後, 原精液量의 1~1.5 倍로 하여 精子浮遊液을 만들어 Penicillin 1000 IU/ml와 Streptomycin 1mg/ml을 加하였다. 精子浮遊液 0.2ml를 試驗管에 取한 後 本 實驗에 使用하였으며, 精子の 生存指數는 顯微鏡下에서 精子の 運動性과 生存率을 觀察하여 算出하는 野並法¹¹⁾에 準하였다.

2. 試驗方法

1) 各種 基質下에서 Caffeine 添加가 精子の 生存性에 미치는 影響

精子浮遊液 0.2ml 를 試驗管에 取하고 glucose, fructose, lactate 등의 基質을 加하여 10倍로 希積한 後, Caffeine 添加 및 無添加의 것을 만들어 37℃에서 經時的으로 精子의 生存性을 檢査하였다.

2) 卵黃-구연산소다液 希積精子의 生存性에 미치는 caffeine의 影響

原精液을 各種濃度의 Caffeine을 添加한 卵黃-구연산소다液(卵黃20ml + 3%구연산소다液80ml의 比率로 混合한 液)으로 希積한 後 希積精液 2ml를 試驗管에 取하였다. sample을 37℃에 保存하면서 經時的으로 精子 生存性을 檢査하였으며, 또한, 約1時間에 걸쳐 4℃로 下降시켜 4℃에서 經日的으로 精子生存性을 檢査하였다. 이어, 希積精液을 4℃에 保存 하면서 第3日째에 各種濃度의 Caffeine을 添加한 後 經日的으로 精子 生存性을 檢査하였다.

3) 凍結·融解精子의 生存性에 미치는 Caffeine의 影響

1) 原精液을 各種濃度의 Caffeine을 添加한 卵黃구연산소다液으로 希積하고, 約 1時間에 걸쳐 4℃로 下降시켜 靜置하면서 1~3 時間 後에 glycerol을 含有한 卵黃枸橼酸소다液을 等量 加한 後 이 希積精液을 1ml씩 Straw에 分注하여 4℃에서 4~6時間의 glycerol 平衡後에 凍結하였다. 凍結straw精液을 4℃의 水中에서 融解한 後 精子生存性을 檢査하였다.

2) 各種濃度의 Caffeine을 含有한 卵黃枸橼酸소다液으로 原精液을 5倍로 希積한 後 約1 時間에 걸쳐 4℃로 下降靜置했다. 이어, 各種濃度의 glycerol을 含有한 卵黃구연산소다液을 等量 加한 後 試驗管에 取하여 4℃에서 24時間 靜置하였다. 이어 5時間의 glycerol 平衡後 凍結·融解하면서 經時的으로 精子生存性을 檢査하였다.

3) 7%의 glycerol을 含有한 卵黃구연산소다液으로 希積한 後 上記方法으로 凍結 融解後에 各種濃度의 Caffeine을 含有한 卵黃구연산소다液을 融解精液에 等量 加해 4℃에서 24時間 靜置하면서 精子生存性을 檢査하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 各種基質下에서 Caffeine添加가 韓牛 精子의 生存性에 미치는 影響

韓牛精液을 Linger液으로 浮遊시켜 37℃에서 最高 8時間 保存했을때 Caffeine添加가 精子生存性에 미치는 影響을 檢討한 成績은 Table 1. 과 같다.

Table 1. Motility of Korean cattle spermatozoa with various substrates in the presence or absence of caffeine.

Substrate (10mM)	Caffeine (10mM)	Incubation time at 37℃ (hrs)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
		(Sperm motility index)									
None	-	75	57	41	31	27	18	14	11	9	
	+	85	62	52	27	13	10	10	9	4	
Glucose	-	74	73	72	70	70	72	71	70	70	
	+	83	85	87	86	84	80	76	71	56	
Fructose	-	74	73	73	73	73	70	70	71	70	
	+	84	84	83	83	83	77	80	73	70	
Lactate	-	73	73	70	70	68	65	58	40	19	
	+	84	82	82	80	78	75	70	38	12	

Caffeine을 添加한 精液은 無添加의 對照區에 比해, 添加直後 運動性이 높았으며, 이것은 2時間後도 維持되었으나, 4時間以後는 對照區보다 運動性이 低下되는 傾向을 나타냈다.

供試한 基質下에 Caffeine을 添加한 精子의 運動性은 5時間 保存後에도 無添加에 比해 生存性이 優秀한 結果를 나타냈다. 이러한 結果는 Grabers等^{5,6)}의 報告와 一致하며, Caffeine은 牛精子의 運動性을 높이고 生存性을 延長시킬뿐만 아니라, 基質添加時 呼吸을 促進하는것으로 알려져 있다.

2. 卵黃枸橼酸소다液 希積精子의 生存性에 미치는 Caffeine의 影響

原精液을 25~30℃에서 各種濃度의 Caffeine을 添加한 卵黃구연산소다液으로 希積한 後 37℃에서 6時間 保存하면서 經時的으로 生存性을 檢査한 結果는 Table 2.와 같다.

Caffeine을 添加한 精子의 運動性은 無添加에 比해 높았으며, 이 添加効果는 添加直後에 나타나 6時間에 걸쳐 나타났다. 特히 Caffeine

Table 2. Effect of caffeine on motility of Korean cattle spermatozoa incubated at 37°C

Concent. of caffeine (mM)	Incubation time at 37°C (hrs)						
	0	1	2	3	4	5	6
	(Sperm motility index)						
0	76	77	70	64	60	60	57
1.8	77	78	76	74	70	66	60
3.6	80	82	79	78	76	68	62
5.4	84	85	83	80	78	70	67
7.2	87	88	87	85	83	72	69
9.0	87	88	85	84	80	78	73
13.5	86	87	83	82	82	77	69
18.0	84	85	82	81	80	76	64
27.0	82	82	79	79	78	72	63

濃度 7.2~13.5mM에서 比較的 높은 運動性이 維持되었다. 이러한 結果는 Garbers^{5,6)}等과 宮本^{7,8)}等이 報告한 結果와 대체로 一致하였다.

한편, 希積精液을 4°C에서 7日間 保存하면서 經日的으로 精子生存性을 檢査한 結果는 Table 3 과 같다.

Table 3. Effect of caffeine on motility of Korean cattle spermatozoa stored at 4°C

Concent. of caffeine (mM)	Storage time at 4°C (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
	(Sperm motility index)							
0	77	76	70	62	52	44	37	29
1.8	83	80	76	70	68	67	65	58
3.6	83	83	78	77	74	70	69	54
5.4	85	88	83	81	79	73	70	56
7.2	87	87	85	85	82	79	70	58
9.0	90	90	89	84	83	76	72	60
13.5	90	91	89	89	81	75	68	52
18.0	89	87	87	82	79	72	62	48
27.0	87	84	85	78	70	66	42	33

希積精液을 4°C에 保存한 때의 精子運動性은 Caffeine 無添加에 比較 各種濃度의 Caffeine을 添加한 處理區의 精子運動性이 높았으며, 또한 生存性을 增加시키는 結果를 나타냈다. 특히 4°C 保存時 精子의 生存性에 미치는 Caffeine의 適正濃度는 5.4~13.5mM로 나타났다.

希積精液을 4°C에 保存하면서 第3日째에 各種濃度의 Caffeine을 添加한 후 經日的으로 精子生存性을 檢査한 結果는 Table 4. 와 같다.

Table 4. Motility of Korean cattle spermatozoa treated with caffeine on the 3rd day of storage at 4°C

Concent. of caffeine (mM)	Storage time at 4°C (days)								
	Before addition			After addition					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	(Sperm motility index)								
0	87	85	80	75	70	68	65	55	47
4					87	81	78	70	67
10					93	89	89	85	79
20					92	87	84	84	71
30					87	80	78	74	70

Caffeine을 添加한 處理區의 精子運動性은 無添加에 比較 運動性이 높고 生存時間도 延長된 結果를 나타냈다. 특히, Caffeine濃度가 10~20mM 일때 精子生存性이 가장 良好했다. 이러한 結果는 Grabers等^{5,6)}과 宮本^{7,8)}等이 報告한 結果와 類似하였으며, 특히, 卵黃子연산소다液 希積精液에 對한 Caffeine添加效果는 구연산鹽 및 卵黃中의 포도糖이 外因性基質로서 作用하여 精子의 生存性에 影響하고 있는것으로 考察하고 있다.^{2,8,9,12)}

3. 凍結·融解精子의 生存性에 미치는 Caffeine의 影響

各種濃度의 Caffeine을 添加한 卵黃子연산소다液 希積精液에 glycerol을 含有한 卵黃枸橼酸소다液을 等量 加한 後, 이 希積精液을 glycerol 平衡後 凍結融解한 精子의 生存性에 對한 檢査 結果는 Table 5. 와 같다.

Table 5. Effect of caffeine on motility of frozen-thawed Korean cattle spermatozoa.

Concent. of caffeine (mM)	Sperm motility index		
	Before freezing		After freezing and thawing
	1st dilution (glycerol-free)	2nd dilution (+7%glycerol)	
	(Sperm motility index)		
0	87	85	45
4	90	80	41
10	95	72	38
20	95	68	34
30	90	65	21

glycerol을 함유하지않은 卵黃구연산 소다液 希積精液에 Caffeine을 添加하면, 無添加에 比해 添加直後 運動性이 向上된 結果를 나타냈다. 그러나 7%의 glycerol을 添加한 경우 Caffeine添加精자의 運動性은 对照区보다 오히려 運動性이 低下되었으며, 이 希積精자를 凍結·融解하였을때도 Caffeine添加精자는 对照区보다 運動性이 역시 低下되는 傾向을 나타냈다.

Caffeine을 含有한 卵黃구연산소다液으로 原精液을 5倍로 希積한後, glycerol을 含有한 卵黃구연산소다液을 等量 加하여 5時間의 glycerol平衡을 한後, 凍結·融解한 精자의 生存性은 Table 6. 과 같다.

Table 6. Motility of Korean cattle spermatozoa stored at 4°C or post-thaw motility of spermatozoa various concentrations of glycerol in the presence of caffeine.

Con-Caffeine of (10 caff- m M) (m M)	1st dilution (glycerol free)	2nd dilution (+glycerol)	Storage time at 4°C after addition of caffeine hrs)					After freezing and thawing
			1	3	5	7	24	
(Sperm motility index)								
-	87	85	85	85	85	85	85	0
+	97	94	94	94	93	94	90	0
-		80	76	80	82	80	80	7
+		90	90	91	90	85	85	7
-		82	76	78	80	80	78	57
+		88	84	85	85	70	65	42
-		78	78	75	78	75	70	55
+		62	62	67	60	60	50	40
-		70	67	67	65	65	44	39
+		54	53	52	52	48	38	15

glycerol濃도가 0 또는 2%때에는 Caffeine 添加에 의해 精자의 運動性은 無添加에 比해 높게 維持되었지만, 7, 또는 10% glycerol濃도 下에서의 Caffeine添加精자의 運動性은 無添加에 比해 低下되는 結果를 나타냈다. 凍結·融解後의 精자의 運動性은 glycerol濃도가 5, 7 및 10%일때 即 高濃도의 glycerol일때 对照区에 比해 低下되는 結果를 나타냈다. 이러한 結果에 對해 宮本等^{8,9)}은, glycerol은 牛精자에 對한 外因性基質로서는 포도糖과 같은 效果를 가지고 있지만,^{10,11)} 高濃도의 glycerol은 Caffeine

添加精자의 生存性에 惡影響을 끼친다고 考察하고 있다.^{8,9,11,13)}

7% glycerol을 含有한 卵黃구연산소다液으로 希積한 希積精液을 凍結·融解한 後 Caffeine을 添加한 精자의 運動性은 Table 7. 과 같다.

Table 7. Motility of frozen-thawed Korean cattle spermatozoa treated with caffeine after thawing.

Concent. of caffeine (mM)	Before freezing	After thawing Before caffeine addition	After caffeine addition	Storage time at 4°C after thawing (hrs)				
				1	2	4	6	24
(Sperm motility index)								
0	85	62	62	59	54	50	46	22
4			65	62	59	55	52	28
10			70	62	60	57	55	38
20			70	62	57	55	49	32
30			66	60	52	50	38	28

凍結·融解後에 Caffeine을 添加한 区는 無添加에 比해 精자運動性이 높았고, 生存時間도 延長되는 結果를 나타냈다. 또한, 凍結·融解精자에 對한 이와같은 Caffeine添加效果는 添加直後에 나타나며, 4°C에 24時間 保存後에도 確認되었다.

이와같이 Caffeine添加에 의해 精자의 生存性 및 代謝가 높아지는 機轉에 關해서 吉田¹⁵⁾는 Caffeine添加에 의해 精자內의 cyclic AMP濃도가 높아지고, 이것에 의해 cyclic ATP依存性의 Proteinkinase가 關해서 精자의 運動性이 높아지고 그結果 ATP濃도가 低下하고 그것에 刺戟되어 呼吸 解糖等의 ATP를 生産하는 代謝가 活發하게 된다고 推察하고 있다. 이에 關해서는 今後 繼續的인 研究가 必要하다고 思料된다.

Caffeine添加에 의한 精자의 生存性의 改善은 本來 生存性이 높은 精자보다 낮은 精자의 경우에 顯著하며, Caffeine添加에 의해 凍結·融解牛精자의 受精能(Capacitation)이 높은 傾向이 있어^{8,13)}. Caffeine은 韓牛精液 希積劑의 改良에 重要한 要素가 될것으로 思料된다.

IV. 結論

韓牛精자의 生存性에 對한 Caffeine의 改善效 果를 韓牛人工授精에 應用하여 韓牛의 繁殖率 向上과 增殖에 寄与할 目的으로, 現在 널리 利用되고 있는 卵黃子연산 소다液 希積精자와 凍結·融解精자의 生存性에 미치는 Caffeine의 影響을 檢討코져 本 實驗을 實施한 바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Caffeine을 添加한 精자는 無添加에 比해 添加直後 運動性이 높았으나, 添加 4時間以後는 低調하였다. 또한 外因性基質인 포도糖, 果糖, 乳糖을 添加하였을때는 約5時間 以後까지도 精자의 運動性이 높았다.

2. 各種濃度の Caffeine을 添加한 希積精자를 37°C에서 6時間, 4°C에서 7日間 保存했을 때 添加精자는 無添加에 比해 運動性이 높았고 生存性도 延長되었다. Caffeine濃도가 各各

7.2~13.5mM, 5.4~13.5mM 일때 比較的 높은 精子生存性이 維持되었다.

3. 卵黃子연산소다液 希積精자를 4°C에 保存하면서 保存第3日에 Caffeine을 添加하여 4日間 保存했을 때 Caffeine添加直後 運動性이 높고 生存性이 延長되었다.

4. 凍結前에 Caffeine을 添加한 精자에 glycerol을 加하면 glycerol添加直後나 凍結·融解後의 精자의 運動性은 無添加에 比해 低調했다. 그러나 凍結·融解後 Caffeine을 添加했을 때는 精자의 運動性이 높고 生存時間이 延長되었다.

5. 10mM의 Caffeine을 添加한 精자에 各種濃度の glycerol을 加하여 4°C에 保存했을 때 glycerol濃도가 0 또는 2%의 精자는 無添加에 比해 運動性이 높았지만, 7~10%의 精자는 運動性이 低下되는 結果를 나타냈다.

<Reference>

1. Drevus, L.O.: Studies on the effects of caffeine on motility of epididymis spermatozoa. J. Reprod. Fert. (1972) 28:41-54
2. Frenkel, G., R. N. Peterson and M. Freund, : Effects of caffeine on motility of mormott spermatozoa. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1973) 144:420-425.
3. Garbers, D. L., W. D. Lust, N. L. First and H. A. Lardy, : Studies on the effects of caffeine on motility of bull spermatozoa incubated 37 C. Biochemistry Reprod., (1971) 10:1825-1831.
4. Garbers, D. L., N. L. First, J. J. Sullivan and H. A. Lardy, : The effects of caffeine on motility of bull spermatozoa. Biol. Reprod., (1971) 5:336-339.
5. Garbers, D. L., N. L. First and H. A. Lardy, : Motility of bull spermatozoa with various substrates in the presence or absence of caffeine. Biol. Reprod., (1973) 8:589-598.
6. Garbers, D. L., N. L. First, S. K. Gorman and H. A. Lardy, : Effects of caffeine on motility of dairy cattle spermatozoa. Biol. Reprod., (1973) 8:599-606.
7. Hoskins, D. D., : The effects of caffeine on motility of boar spermatozoa. J. Biol. Chem., (1973) 248:1135-1140.
8. 宮本元, 田村彰夫, : 카페인에 의한山羊 精자의 生存性延長. 家畜繁殖誌. (1978) 24 : 100~104.
9. 宮本元·入谷明·西川義正, : 카페인에 의한牛および豚精자의 生存性 延長, 凍結精液研究会報. (1973) 41 : 3 - 6.
10. 西尾登, 徳富義喜, 岩住安晃, 石原俊一, : 카페인에 의한 緬羊精자의 生存性延長. 凍結精液研究会報. (1978) 54 : 1 - 3
11. 野並慶宣 : 畜産大事典, 養賢堂, 東京 (1978) 1005 - 1012
12. 番場公雄·小島義夫 : 豚射出精子에 對する 카페인에의 影響家畜繁殖誌. (1977) 23 : 99 - 104
13. 和出清·栢田博司 : 農林省 畜産年報 (1975) 15 : 32 - 33
14. 和出清·副島義夫 : 카페인에 의한豚射出精자의 生存性延長, 家畜繁殖誌 (1977) 23 : 99 - 104
15. 吉田重雄 : 家畜繁殖學 - 最近의 歩み. 文永堂, 東京 (1978) 53 - 74.

The Studies on the Improvement of Fertilization in Korean Cattle

Effect of caffeine on Motility of Korean Cattle Spermatozoa

Sang Keun Kim

(Dept. of Animal Science, Coll. of Agri. Chungnam Natl. Univ.)

Abstract

The studies carried out to examine the effects of caffeine on motility of ejaculated Korean cattle spermatozoa.

The results obtained are summarized as follows:

1. Motility index of caffeine-treated spermatozoa, however, decreased as compared with that of control after incubation of 4 more hrs. But caffeine markedly increased and maintained incubation with glucose, fructose and lactate for 5 hrs.
2. When Korean cattle semen was diluted with egg yolk-sodium citrate dilutor and incubated for 6 hrs at 37°C or stored for 7 days 4°C, however, increased or maintained motility index of spermatozoa.
3. Diluted semen was stored at 4°C and caffeine was added to diluted semen on the 3rd day of storage for 4 days. After the addition of caffeine immediately enhanced motility index of spermatozoa.
4. When glycerol was added to caffeine-treated spermatozoa to give a concentration of 7% before freezing, pre-freeze and post-thaw motility index of caffeine-treated spermatozoa were decreased as compared with those of caffeine-untreated spermatozoa. The addition of caffeine to frozen-thawed spermatozoa in the presence of glycerol enhanced motility index and longevity of spermatozoa when compared to the control samples.
5. Korean spermatozoa treated with various concentration of glycerol in the presence or absence 10 mM caffeine was stored at 4°C. Spermatozoa, stored at 4°C with 2% glycerol plus caffeine, showed enhanced motility index as compared with the caffeine-untreated spermatozoa with glycerol.