

## Heparin, Chondroitin Sulfate A(CSA) 및 Dilauroylphosphatidylcholine(PC12)이 소 精子的 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

朴永植·任京淳  
서울대학교 農科大學

### Effect of Heparin, Chondroitin Sulfate A(CSA) and Phosphatidylcholine (PC12) on Motility and Acrosome Reaction of Bovine Sperm

Park, Y. S. and K. S. Im  
College of Agriculture, Seoul National University

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of heparin, CSA and PC12 on sperm motility and acrosome reaction in bovine fresh and frozen semen which were washed and incubated in mTALP, and also the effect of heparin-pretreatment on motility and acrosome reaction of sperm treated with PC12, and the results obtained were as follows:

1. When fresh sperm was once washed and then incubated for 15 minutes in mTALP containing heparin 1, heparin 2, CSA and PC12, the percent of motile sperm of PC12 was significantly lower than that of control, heparin 1, heparin 2 and CSA. But the percent of acrosome-reacted sperm of PC12 was significantly higher than that of control, heparin 1, heparin 2, and CSA.
2. When frozen sperm was once washed and then incubated for 15 minutes in mTALP containing heparin 1, heparin 2, CSA and PS12, there was no significant difference in the percent of motile sperm among treatments, but the percent of acrosome-reacted sperm of PC12 was significantly higher than that of heparin 2, and there was no significant difference in the percent of acrosome-reacted sperm among control, heparin and CSA.
3. When fresh sperm was twice washed and then incubated for 15 minutes in mTALP containing heparin and PC12, there was no significant difference in the percent of motile sperm among treatments, but the percent of acrosome-reacted sperm of PC12 was significantly higher than that of control and heparin. When the sperm was incubated for 120 minutes, the percent of motile sperm of PC12 was significantly lower than that of control and heparin, but the percent of acrosome-reacted sperm of PC12 was significantly higher than that of control and heparin.
4. When fresh sperm was twice washed and preincubated in mTALP containing heparin for 0, 15, 120, and 240 minutes, and then incubated with PC12 for 15 minutes, there was no significant difference in the percent of motile sperm among treatments, but the percent of acrosome-reacted sperm of 120 and 240 minutes was significantly higher than that of 0 and 15 minutes.

(Key words : Heparin, CSA, PC12, Capacitation, Acrosome reaction)

帽反應을 조사하였다.

## I. 緒 論

卵胞液(Bellin과 Ax, 1987; Grimek과 Ax, 1982; Grimek 등, 1984), 雌性生殖道管의 分泌液(Lee와 Ax, 1984) 및 精漿(Lee 등, 1985)에는 다량의 Glycosaminoglycans(GAGs)가 함유되어 있으며, GAGs는 精子의 受精能獲得에 關여한다고 보고되고 있다. GAGs중에서 chondroitin sulfate A(CS A)가 精子의 尖帽反應을 유발한다는 Lenz 등(1982; 1983)의 보고에 이어, Parrish 등(1985)은 Heparin이 精子의 尖帽反應을 증진시킬 뿐만 아니라 體外受精率을 높인다고 하였다. GAGs 외에도 Graham과 Foote(1987a; b)는 磷脂質인 lysophosphatidylcholine(PC12)이 精子의 尖帽反應과 투명대 제거 햄스터 卵子の 精子侵入率을 증진시킨다고 보고한 바 있다. 한편 Fraser(1984)는 洗滌에 의한 被覆物質의 제거가 精子의 受精能을 증진시킨다고 하였다.

본 實驗은 heparin, CSA 및 PC12가 新鮮精子, 凍結精子 및 反復 洗滌한 精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

原精液과 凍結精液을 Ca free mTALP 溶液(Parrish 등, 1985)으로 10배 희석하여 1,200rpm으로 10분간 遠心分離하여 상등액을 제거한 다음, heparin 1(Sigma), heparin 2(Wako), CSA(Sigma) 및 PC12(Sigma)가 각각 10, 10, 10 및 112.5 $\mu$ g/ml 첨가된 mTALP 溶液으로 精子를 부유하여 39 $^{\circ}$ C에서 15분간 培養한 후, 精子의 活力과 尖帽反應을 조사하였다.

또한 原精液을 Ca free mTALP 溶液으로 10배 희석하여 1,400rpm으로 5분간 遠心分離하여 精子를 洗滌하였다. 동일한 방법으로 두 번 洗滌한 精子를 10 $\mu$ g/ml heparin과 112.5 $\mu$ g/ml PC12가 첨가된 mTALP 溶液에 부유하여 39 $^{\circ}$ C에서 120분간 培養하였으며 또한 두 번 洗滌한 精子를 먼저 10 $\mu$ g/ml heparin이 첨가된 mTALP 溶液에서 15, 120 및 240분간 前培養한 다음 112.5 $\mu$ g/ml PC12가 첨가된 mTALP 溶液에서 15분간 培養하여, 精子의 活力과 尖

## III. 結 果

### 1. Heparin, CSA 및 PC12가 新鮮精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

한 번 洗滌한 新鮮精液을 heparin, CSA 및 PC12가 첨가된 mTALP 溶液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精子와 尖帽反應精子의 比率은 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of heparin 1 and 2, CSA and PC12 on percent of motile sperm and acrosome-reacted sperm in once-washed fresh semen

Additives ( $\mu$ g/ml)	Percentage	
	Motile sperm	Acrosome-reacted sperm
Control	75.0 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>
Heparin 1(10)	75.0 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>
Heparin 2(10)	73.0 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>
CSA (10)	78.3 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>
PC12 (112.5)	63.3 <sup>b</sup>	21.5 <sup>b</sup>

a, b: significantly different at  $p < 0.05$  in the same column

運動精子 比率은 PC12가 63.3%로서 대조구, heparin 1과 2 및 CSA의 75.0, 75.0, 73.3 및 78.3%보다 유의하게 낮았으며 대조구, heparin 1과 2 및 CSA 간에 유의한 차이가 없었다. 尖帽反應精子 比率은 PC12가 21.5%로서 대조구, heparin 1과 2 및 CSA의 4.0, 5.6, 5.6 및 4.2%보다 유의하게 높았으며 대조구, heparin 1과 2 및 CSA 간에는 유의한 차이가 없었다.

### 2. Heparin, CSA 및 PC12가 凍結精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

한번 洗滌한 凍結融解精子를 heparin, CSA 및 PC12가 첨가된 mTALP 溶液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精子와 尖帽反應精子의 比率은 Table 2와 같다.

運動精子 比率은 대조구, heparin 1과 2, CSA 및 PC12가 각각 23.3, 33.0, 26.7, 28.3 및 28.3%로

**Table 2. Effect of heparin 1 and 2, CSA and PC12 on percent of motile sperm and acrosome-reacted sperm in once-washed frozen semen**

Additives ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentage	
	Motile sperm	Acrosome - reacted sperm
Control	23.3 <sup>NS</sup>	23.9 <sup>ab</sup>
Heparin 1(10)	33.0	15.9 <sup>ab</sup>
Heparin 2(10)	26.7	8.8 <sup>b</sup>
CSA (10)	28.3	22.0 <sup>ab</sup>
PC12 (112.5)	28.3	31.6 <sup>a</sup>

a, b; significantly different at  $p < 0.05$  in the same column

NS; not significantly different ( $p < 0.05$ )

처리간에 유의한 차이가 없었다. 한편 尖帽反應精子比率은 처리구, heparin 1과 2, CSA 및 PC12가 각각 23.9, 15.9, 8.8, 22.0 및 31.6%로서 heparin 2와 PC12간에 유의한 차이가 있었으나 기타 처리간에 유의한 차이가 없었다.

### 3. Heparin 과 PC12가 反復洗滌한 新鮮精子的 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

두번 洗滌한 新鮮精자를 heparin 과 PC12가 첨가된 mTALP 溶液에 부유하여 120분간 培養하였을 때, 運動精자와 尖帽反應精자의 比率은 Table 3과 같다.

**Table 3. Effect of heparin and PC12 on percent of motile sperm and acrosome-reacted sperm of twice-washed fresh semen**

Additives	Incubation time (minute)			
	15		120	
	Percentage			
	Motile sperm	Acrosome-reacted sperm	Motile sperm	Acrosome-reacted sperm
Control	47.8 <sup>NS</sup>	18.0 <sup>b</sup>	46.1 <sup>B</sup>	50.0 <sup>B</sup>
Heparin	50.0	12.6 <sup>b</sup>	72.2 <sup>A</sup>	11.2 <sup>C</sup>
PC12	63.3	35.2 <sup>a</sup>	20.0 <sup>C</sup>	85.9 <sup>A</sup>

a, b; significantly different at  $p < 0.05$  in the same column

A, B, C; significantly different at  $p < 0.01$  in the same column

NS; not significantly different ( $p > 0.05$ )

運動精子 比率은 15분간 培養하였을 때, 대조구, heparin 과 PC12가 각각 47.8, 50.0과 63.3%로 처리간에 유의한 차이가 없었으나, 120분간 培養하였을 때는, heparin 이 72.2%로 대조구의 46.1%와 PC12의 20.0%보다 유의하게 높았다. 한편 尖帽反應精子 比率은 15분간 培養하였을 때, PC12가 35.2%로 대조구의 18.0%와 heparin 의 12.6%보다 유의하게 높았으며, 120분간 培養하였을 때, PC12는 85.9%로 대조구의 50.0%와 heparin 의 11.2%보다 유의하게 높았다.

### 4. Heparin 전처리가 PC12를 처리한 精자의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

두번 洗滌한 新鮮精자를 heparin 으로 前處理한 다음 PC12로 15분간 培養하였을 때, 運動精자와 尖帽反應精자의 比率은 Table 4와 같다.

運動精子 比率은 0, 15, 120 및 240분간 heparin 전처리가 각각 63.3, 48.3, 47.8 및 45.6%로 처리간에 유의한 차이는 없었다. 한편 尖帽反應精子 比率은 0, 15, 120 및 240분간 heparin 전처리가 각각 53.2, 23.3, 60.6 및 62.6%로 120과 240분이 0과 15분보다 유의하게 높았다.

## IV. 考 察

Handrow 등(1982, 1986)과 Parrish 등(1985)은 heparin 이 소 精자의 尖帽反應을 유발한다고 하였으나 본 實驗에서는 heparin 이 소 新鮮精자와 凍結精자의

Table 4. Effect of pretreatment of heparin on percent of motile sperm and acrosome reacted sperm of PC12-treated fresh semen

Incubation time(minute)		Percentage	
Heparin	PC12	Motile sperm	Acrosome-reacted sperm
0	15	63.3 <sup>NS</sup>	35.2 <sup>b</sup>
15	15	48.3	23.3 <sup>b</sup>
120	15	47.8	60.6 <sup>a</sup>
240	15	45.6	62.6 <sup>a</sup>

a, b : significantly different at  $p < 0.05$  in the same column

NS : not significantly different ( $p > 0.05$ )

尖帽反應을 유발하지 못하였다. 또한 Lee 등(1985)은 CSA 가 소 精子的 尖帽反應을 유발한다고 하였으나, 본 實驗條件에서 CSA 도 소 精子的 尖帽反應을 유발하지 못하였다. 한편 Parrish 등(1985)은 heparin 은 소 精子的 尖帽反應을 유발하거나, CSA 는 소 精子的 尖帽反應을 유발하지 못한다고 보고한 바 있다. 이들은 modified Tyrode 溶液을 培養液으로 사용하여 6시간 이상 장시간 培養하였을 때 heparin 또는 CSA 에 의한 精子的 尖帽反應이 유발된 것으로 보고 있다. 한편 Park 과 Im(1991)은 體外受精實驗을 통해서 heparin 이 소 精子的 受精能獲得 誘發因子라고 보고하였다.

한편 PC12는 新鮮精子에서는 尖帽反應을 유의하게 증진시켰으나, 凍結精子에서는 尖帽反應을 증진시키지 못했는데, 이는 凍結精子는 凍結 및 融解過程에서 침모에 상당한 변화가 진행되어 尖帽反應이 유발되었기 때문인 것으로 사료된다.

反復洗滌한 新鮮精子에서 PC12는 尖帽反應을 유의하게 증진시켰으나 heparin 은 尖帽反應을 억제하였다. 그러므로 heparin 은 精子的 尖帽反應을 유발하지는 않는 것으로 사료된다. 한편 heparin 이 精子的 受精能獲得에 관여하는지를 규명하기 위해서 heparin 前處理를 실시하였는데 2시간 이상 heparin 으로 前培養한 다음 PC12에 15분간 培養한 精子에서는 尖帽反應이 유의하게 증진되었다. Parrish 등(1988)도 heparin 으로 4시간 前培養한 精液에서 尖帽反應이 유의하게 증진되었다고 보고한 바 있다. 또한 이러한 결과는 heparin 이 精子에 可逆상태로 결합하는데 120분이 소요된다고 Handrow 등(1984)의 보고와 일치한다.

이상의 結果를 考察하여 보면, 卵胞液, 雌性生殖道管 分泌液 및 精漿에 다량 함유되어 있는 GAGs 는 精

子의 受精能獲得과 관련이 있으며, 磷脂質인 PC12는 精子的 尖帽反應과 직접 관련이 있는 것으로 사료된다.

## V. 摘要

본 實驗은 heparin, CSA 및 PC12가 mTALP 溶液으로 洗滌한 소 新鮮精液과 凍結精液의 精子 活力과 尖帽反應에 미치는 影響과 heparin 前處理와 PC12處理가 精子的 受精能獲得에 미치는 影響을 조사하기 위하여 실시하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 한번 洗滌한 소 新鮮精子를 heparin 1, heparin 2, CSA 및 PC12가 각각 첨가된 mTALP 溶液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精子 比率은 PC12가 대조구, heparin 1, heparin 2 및 CSA 보다 유의하게 낮았으나, 尖帽反應精子 比率은 PC12가 대조구, heparin 1, heparin 2 및 CSA 보다 유의하게 높았다.
2. 소 凍結精子를 한 번 세척하고 heparin 1, heparin 2, CSA 및 PC12가 각각 첨가된 mTALP 溶液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精子 比率은 처리간에 유의한 차이가 없었으나, 尖帽反應精子 比率은 PC12가 heparin 2보다 유의하게 높았으며 대조구, heparin 및 CSA 간에는 유의한 차이가 없었다.
3. 新鮮精子를 두번 洗滌하고 heparin 과 PC12가 첨가된 mTALP 溶液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精子 比率은 대조구, heparin 과 PC12간에 유의한 차이가 없었으나, 尖帽反應精子 比率은 PC12가 대조구와 heparin 보다 유의하게 높았다. 120분간 培養하였을 때, PC12가 대조구와 heparin 보다 運動精子 比率은 유의하게 낮았으나, 尖帽反應精子 比

率は 유의하게 높았다.

4. 新鮮精자를 두번 洗滌하고 heparin 이 첨가된 mTALP 溶液에서, 0, 15, 120 및 240분간 前培養한 다음, 다시 PC12가 첨가된 mTALP 溶液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精子 比率은 처리간에 유의한 차이가 없었으나, 尖帽反應精子 比率은 120과 240분이 0과 15분보다 유의하게 높았다.

(主要語: Heparin, CSA, PC12, 受精能獲得, 尖帽反應)

## VI. 引用文獻

1. Bellin, M.E. and R.L. Ax. 1987. Purification of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid. J.D.S. 70 : 1913-1919.
2. Fraser, L.R. 1984. Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface associated inhibitory component. J. Reprod. Fert. 72 : 373-384.
3. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987a. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen. Gamete Res. 16 : 133-145.
4. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987b. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. Gamete Res. 16 : 147-158.
5. Grimek, H.J. and R.L. Ax. 1982. Chromatographic comparison of chondroitin-containing proteoglycan from small and large bovine ovarian follicles. Biochem. Biophys. Res. Comm. 104 : 1401-1406.
6. Grimek, H.J., M.E. Bellin and R.L. Ax. 1984. Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. Biol. Reprod. 30 : 397-407.
7. Handrow, R.R., S.K. Boehm, R.W. Lenz, J.A. Robinson and R.L. Ax. 1984. Specific binding of the glycosaminoglycan H-heparin to bull, monkey and rabbit spermatozoa *in vitro*. J. Androl. 5 : 551-563.
8. Handrow, R.R., R.W. Lenz and R.L. Ax. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 107 : 1326-1332.
9. Handrow, R.R., J.J. Parrish and J.L. Susko-Parrish. 1986. Effect of glycosaminoglycans on capacitation and the acrosome reaction of bovine and hamster sperm. Biol. Reprod. 34(Suppl) : 93.
10. Lee, C.N. and R.L. Ax. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. J. D.S. 67 : 2006-2009.
11. Lee, C.N., R.R. Handrow, R.W. Lenz and R.L. Ax. 1985. Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa *in vitro*. Gamete Res. 12 : 345-355.
12. Lenz, R.W., R.L. Ax, H.J. Grimek and N.L. First. 1982. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 106 : 1092-1098.
13. Lenz, R.W., G.D. Ball, J.K. Lohse, N. L. First and R.L. Ax. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. Biol. Reprod. 28 : 683-690.
14. Park, Y.C. and K.S. Im. 1991. Study on effect of heparin on bovine sperm capacitation. Korean J. Anim. Reprod. (Submitted).
15. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N. L. First. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction

- and fertility of bovine sperm *in vitro*.  
Theriogenology 24 : 537-549.
16. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish, M.A.  
Winer and N.L. First, 1988. Capacitation  
of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod.  
38 : 1171-1180.