

생쥐 정소상체정자의 전배양시간 및 정소상체추출물의 첨가가 체외수정에 미치는 영향

경희대학교 의과대학 산부인과학교실 (불임클리닉)

김재명 · 서병희 · 이재현

건국대학교 축산대학 축산학과

정길생

The Effect of Fertilization on Capacitation in vitro ; Inverment of Epididymal Secretions and Preincubation Time

J.M. Kim, M.S., B.H. Suh, M.D. and J.H. Lee, M.D.

Infertility Clinic, Department of Obstetris and Gynecology, College of Medicine, Kyung Hee University

K.S. Chung, Ph.D.

College of Animal Husbandry, Kon Kuk University

= Abstract =

Capacitation of mouse spermatozoa in vitro is brought about by epididymal secretions released into the m-Tgrode medium at the time of sperm collection. Epididymal mouse sperm suspension achived by centrifugation were preincubated for a total of 120min with aliquants being removed at 5, 30 and 120min.

By gently centrifugation and resuspending in fresh medium, the fertilizing rate of unwashed 5- and 30-min suspensions was increased such that 30-min washed samples did not differ significantly from full capacitated, highly fertile 120-min unwashed samples. When epididymal suspension, was added fertilization of cumulus intact oocyte was markedly inhibited, although fertilization of zona free oocytes was unaffected. Washing sperm suspensions preincubated in the absence of Ca^{2+} with the subsequent introduction of exogenous Ca^{2+} resulted in a significant increase in fertilization rates over equivalent unwashed samples.

서 론

포유동물의 정자는 정소상체 부위로 이동함에 따라 성숙 및 운동성을 갖고 정소상체미부에서 수정능력을 보유하게된다. Blandau와 Rumery (1961)에 의하면 정소상체 두부에 있는 쥐 정자는 운동력을 지니고 있으나, 수정능력(capacitation)을 갖지 못하며 미부를 통과한 후에

야 수정능력을 지닌다고 한다.

수정능은 정자가 난자의 투명대를 통과하고 난자의 세포질에 침입하여 수정을 일으키는데 필요한 기능적 변화로서, 사정즉시 정자는 수정능력을 갖지못하나 자성 생식기도 또는 체외배양에 의해 일정시간후 수정능력과 침체반응을 거치면서 난자를 수정시킬 수 있는 능력을 지니게 된다(Johnson, 1975; Yanagimarchi, 1970).

Oliphant와 Brackett (1975)는 생쥐 난자의 체외수정에 있어서 정소상체액이 수정율을 감

본 논문은 경희대학교 의과대학 임상 연구비의 보조로 이루어졌음.

소시키는데, 이는 정소상체액에 존재하는 수정능 억제요인에 의하여 발생한다고 하며 이를 수정능 억제효과 (decapacitating effect)라 한 반면, Gwatkin등 (1974)은 정소상체 추출액이 정자의 수정능을 유기하며, 파립세포가가 제거된 난자의 체외수정에는 이들물질이 필요하다하였다. Bedford와 Chang (1962)은 수정능을 획득한 토끼정자가 정장에 배양되었을때 가역적으로 수정능을 상실하는데 이는 정장속에 수정능억제인자인 lysin을 포함한 peptide가 존재하기 때문이라 하며, 다른 연구자들은 거대단백 또는 당 단백질이라하며 이들물질은 원심분리에 의해서 제거될 수 있다고 하였다. 한편 Bedford (1970)는 수정능 억제인자가 투명대를 뚫고 정자의 침투능에 필요한 침체반응 부위에 결합하여 정자의 침투능을 억제하며 수정능력을 저하시킨다고 하였다. 다른 연구자들에 의하면 여러가축 및 인간의 정장에도 수정능 억제인자가 존재하므로 인공수정 및 체외수정 프로그램에 적용되는 정자는 정장을 제거해야한다고 하였다 (Engi & Oiphant, 1978; Fleming & Wai, 1978; Ruddy & Audhya, 1982). 체외수정시 정소상체로부터 채취된 생쥐정자의 전배양시간이 길어질수록 수정율이 높아지는데 이는 전배양시간에 따른 억제요인의 파괴 또는 불활성화에 기인하지 않나 생각된다.

저자들은 생쥐로부터 채취된 정소상체정액을 원심분리하여 상층액을 얻은후 체외수정시 정소상체 상층액의 첨가, 전배양시간의 길이 및 배양액내 Ca^{2+} 이온의 유무에 따라 난자의 수정율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

실험동물로는 성숙한 ICR 및 C3H 계통의 생쥐를 사용하였다. 공란생쥐는 4-6주령 (체중: 15-20)이었고, 웅성생쥐는 10-14주령 (체중: 30-40)이었으며 일조시간과 온도가 일정하게 조절되는 사육실에서 사육하였으며 급이와 급수는 무제한으로 급여하였다.

2. 배양액

난자와 정자의 배양은 0.4%의 BAS가 함유되어있는 m-Tyrode 배양액을 사용하였으며, pH는 7.2-7.4로 조성하였다. 배양액은 0.2um의

millipore filter (German Science, Inc. U.S.A.)를 사용하여 여과 시킴으로서 멸균하였다.

3. 난구세포 및 투명대제거

생쥐난자의 난구세포를 제거하기위하여 0.1% hyaluronidase (Sigma, U.S.A.)를 함유한 배양액에 노출시켜 제거하였으며, 투명대를 제거하기 위해서는 0.5% pronase (Sigma, U.S.A.)를 함유한 배양액에 노출시켜 투명대가 거의 연화되었을때 제거하여 신선배양액에 2-3회 세척하여 투명대를 제거하였다.

4. 다배란 유기

공란생쥐의 다배란유기를 위하여 5I.U의 PMSG (Folligon, Intervert, Holland)를 복강에 주사한후 48시간후에 동량의 hCG (Chorulon, Intervert, Holland)를 복강에 주사하여 다배란을 유기하였다.

5. 난자의 회수

hCG 주사후 12-14시간에 경추파열법으로 생쥐를 도살하여 난관을 적출한후, 실체현미경 하에서 전술한 배양액으로 난관을 관류하여 난자를 회수하였다.

6. 정소상체정자의 채취 및 전배양

웅성생쥐를 경추파열법으로 도살한후 정소상체를 적출하여 정소상체 두부, 미부 및 정관을 절개하여 1ml의 배양액에서 핀셋을 이용하여 물리적인 압박을 가함으로써 정자를 획득하였다. 채취된 정소상체 정자는 여러 실험조건에 따라서 5, 30 및 120분동안 전배양을 실시한뒤 수정시키거나 전배양후 원심분리하여 정소상체 상층액을 제거한뒤에 ml당 $1-2 \times 10^6$ 정자수로 조정하여 수정을 실시하였다.

7. 정소상체 정자 상층액의 획득 및 제거

채취된 정소상체 정자를 1ml의 배양액에서 정자를 부유시킨후 750g에서 30분간 원심분리하여 획득한 상층액을 다시 11600g에서 4분간 원심분리하여 정소상체 상층액을 획득하였다. 정자의 상층액을 제거하기 위해서는 정자부유액 1ml당 2ml의 배양액을 희석한후 750g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한뒤 1ml의 배양액을 첨가하여 일정시간 전배양 실시후 체외수정을 실시하였다.

8. 생쥐난자의 염색 및 수정여부 판정

95% ethanol로 세척된 slideglass위에 coverglass의 네귀에 맞도록 waselin 소적(waselin: faraffin=15:1)을 만든후, 그 중앙에 난자를 적하시킨후 coverglass를 덮고 조심스럽게 눌렀다. 2.5%의 lutaraldehyde를 slideglass 사이에서 침투시켜 난자의 1차고정을 실시한후, 10%의 formarin용액에 24시간 침투시킨다음 증

류수로 세척하였다. 세척된 slideglass는 95%의 ethanol에 침적하여 탈수시킨후 0.25% aceto-lacomid용액을 침투시켜 염색한후 coverglass주위를 manicure로 봉입한다음 위상차현미경하에서 난자의 수정여부를 판별하였다. 수정의 판정은 제 2극체의 방출, 세포질에 침입한 정자두부의 팽대 및 응성전핵의 확인등을 기준으로 하여 실시하였다.

결 과

Table 1. In vitro fertilizing ability of unwashed and washed preincubated epididymal mouse sperm suspension

Preincubation time (min)	Washed	Eggs fertilized		Maximal nuclear* development (%)
		No.	% (Range)	
5	-	3/51	5.9(0-12) ^{ab}	0.0
	+	17/61	27.9(11-43) ^{de}	4.6
30	-	19/42	45.2(21-88) ^{ac}	32.5
	+	37/62	59.7(10-87) ^d	56.4
120	-	40/53	75.5(84-100) ^{bc}	87.1
	+	43/60	71.7(86-96) ^e	88.2

a, b, c, d, e: $p < 0.005$

*Fertilized eggs at telophase-second polar body with sperm head fully decondense.

정소상체 정자의 전배양시간 길이와 정자세척의 유무에 따라 체외수정시의 성적이 표 1에 나타나있다. 5 및 30분의 전배양군에 있어서 비세척군과 원심분리에 의하여 상층액을 제거한 세척군의 수정율이 각각 4.6 및 56.4%의 수정율을 나타냈으나 120분간 배양된군에있어는 87.1% 및 88.2%로 별차이가 나타나지 않았다. 또한 5분간 배양된군이 120분간 배양된군보다 유의하게 낮은 수정율을 나타냈으며(세척군; $p < 0.005$, 비세척군; $p < 0.005$), 수정된난자의 4.6%가 핵성숙단계에 도달하였다. 120분간 전배양된 정소상체정자에 각각 5, 30 및 120분간 전배양후 원심분리하여 정소상체

Table 2. Inhibition of capacitated mouse sperm in vitro fertilizing ability by sperm supernatants prepared after preincubation

Preincubation (min)	Epididymal supernatant		Eggs fertilized		Maximal nuclear development (%)
	Dilution	No.	% (Range)		
5	1: 5	5/32	15.6(0-12) ^a	60.0	
	1: 15	15/46	32.6(25-46) ^b	66.7	
30	1: 5	8/40	20.0(28-43) ^d	75.0	
	1: 50	19/40	42.2(34-52) ^e	68.4	
120	1: 5	21/38	55.3(38-62) ^{ad}	85.7	
	1: 15	34/48	70.8(48-96) ^{bc}	73.5	
Control	-	40/53	75.5(68-92)	81.6	

a, b, c: $p < 0.005$ d: $p < 0.01$ e: $p < 0.05$

Table 3. Inhibition effect of epididymal sperm supernatant on the ability of capacitated mouse spermatozoa to fertilize zona-intact and zona-free eggs in vitro

Medium for fertilization	Zona	Eggs fertilized		Maximal nuclear development (%)	Polyspermy rate (%)
		No.	% (Range)		
Control	+	24/32	78.1(69-88) ^a	75.6	2.3
	-	42/42	100	100.0	54.2
Supernatant	+	7/40	17.5(5.0-25) ^a	42.8	0.0
	-	36/35	97.2	100.0	42.6

a: $p < 0.005$

Table 4. In vitro fertilizing ability of unwashed and washed epididymal mouse sperm suspensions preincubated for 30min in control or Ca^{2+} free media

Preincubation time (min)	Washed	Eggs fertilized		Maximal unclear development (%)
		No.	% (Range)	
Control	-	9/23	39.1(28-48) ^a	36.1
	+	17/31	54.8(42-76)	82.0
Ca-free	-	1/30	3.3(0-6.3) ^a	3.3
	+	7/28	25.0(17.2-32)	11.8

a : $p < 0.005$

상층액을 획득한후 1:5와 1:15의 비율로 희석 첨가하여 체외수정을 실시하였을때의 성적이 표 2에 나타나있다.

5분간 전배양후에 획득된 정소상층액을 1:5와 1:15로 희석첨가하여 체외수정을 실시하였을때의 수정율은 각각 15.6 및 32.6%였고, 30분간 전배양된 상층액을 첨가배양하였을때의 수정율은 각각 20.0 및 42.2%였으며 120분간 전배양된 상층액의 첨가시에는 각각 85.7 및 73.5%였다. 한편 대조군의 수정율은 81.6%로서 5, 30분간 전배양후 획득된 상층액을 첨가하여 체외수정을 실시하였을때의 수정유보다 유의하게 높은것으로보아 정소상체정액의 상층액에는 수정을 방해하는 물질이 존재하며 이들 물질은 시간지남에 따라 불활성화되는것을 알수있었다.

대조군 및 30분간 전배양후에 획득된 정소상체 정자의 상층액을 배양액과 1:1로 희석하여 체외수정을 실시하였을때 투명대의 유무에 따른 수정율 및 다정자침입율이 표 3에 나타나있다. 대조군에 있어서 투명대가 존재할때의 수정율은 75.6%, 다정자침입율이 2.3%를 나타냈으나 투명대제거시 각각 100.0 및 54.2%로서 유의한 다정자침입율을 보였다. 또한 상층액이 첨가된 배양액에서의 체외수정율은 투명대가 존재할때 42.8%의 수정율 나타냈는데 이는 대조군의 수정율보다 유의하게낮았다($p < 0.005$). 투명대제거시에는 100.0%의 수정율 및 42.6%의 다정자침입율을 보였다. 일반 또는 Ca^{2+} 이 함유되어있지 않은 배양액에서 30분간 정소상체정자의 전배양후 상층액의 제거 유무에 따른 체외수정시의 성적이 표 4에 나타나있다. 대조군에 있어서 상층액이 제거되지 않았을때 39.1%의 수정율을 나타냈으나 상층액의

제거시 54.8%의 수정율을 보인반면 Ca^{2+} 가 함유되어있지 않은 배양액에 전배양후의 체외수정율은 상층액의 세척시 25.0%, 배세척시 3.3%의 수정율을 나타냈다. 즉 정자의 수정능을 얻기위해서는 Ca^{2+} 가 중요한 이온이며, 상층액의 제거시 수정율이 높아졌다($p < 0.005$).

고 찰

Austin(1951)과 Chang(1982)에 의해 정자는 자성생식기도에서 수정능력에이 획득되어야 난자를 수정시킬 수 있다는 보고아래 수정능력의 유기 또는 억제에 관한 많은 연구들이 진해되어왔다. 정자의 운반수단인 정장은 정자의 수정능력에 영향을 미치는 여러물질이 함유되어있다.

즉 정소상체 두부에서 운동력을 얻은 정자는 정자자체내에 존재하는 물질들에 의해서 운동성이 조절되기도 하나 정자가 처해있는 자성 또는 응성생식기도내의 환경이 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려져왔다. Oliphant와 Brackett(1979)는 정장단백질에 대한 항혈청이 즉시 사출된 정자와는 결합하나 자궁에서 12시간 배양된 정자와는 결합하지 않는다고 하며, 이는 정자표면에 피복되어 있는 정소상체 또는 정장단백질이 제거되었기 때문이라 하였다. Rozin(1987)은 Subfertile 남성의 정자를 가임능력을 지닌 남성의 정장에 일정시간 배양하여 인공수정을 실시한 결과 좋은 성적을 얻었는데 이는 정장에 의해 정자의 운동력이 향상된 결과라고 하였다. 그러나 Cohen등(1982b)에 의하면 가임능력을 지닌 남성정장의 첨가시 약간의 운동성의 증가를 제외하고는 어떠한 영향도 끼치지 않는다고 하였다. 비록 몇몇 연구자들에 의해 heterologous한 정장의 첨가가 정자의 운동성에 좋은 영향을 끼친다고 한반면 대부분 연구자들은 정장의 첨가가 정자의 운동성증가에 영향을 끼치지않았으며 정자에 해롭다고하였다. 본 연구에서도 정장과 유사물질인 정소상체 정자상층액의 첨가시 난자의 수정율이 낮아지는 것으로보아 정자의 수정능 유기를 방해하는 것으로 사려되다.

포유동물의 정자는 정소상체부위로 이동함에 따라 성숙과 운동능력을 획득하게되며 정소상체 미부에서 수정능력을 보유하게 된다. Blandau와 Rumery(1961)에 의하면 정소상체 두부의 쥐정자는 운동력을 지니고 있으나, 수

정능력을 갖지 못하다. 미부를 통과한 후에다 수정능력을 지닌다고 한다. 수정은 정자가 난자의 투명대를 통과하고 난자의 세포질에 침입하여 수정을 일으키는데 필요한 기능적 변화로서 사정즉시 수정능을 갖지 못하나 자성생식기도 또는 체외배양에 의해 일정시간후 수정능력 획득과 침체반응을 거치면서 난자를 수정시킬 수 있는 능력을 지니게 된다(Jonson, 1975; Yanagimarchi, 1981). 생쥐배의 체외수정에 있어서 정소상체 정액 추출물의 첨가시 난자의 수정율이 현저하게 감소되는데 이를 수정능력억제효과(decapacitating effect)라고 한 반면(Oliphant & Brackett, 1979), Gwatkin(1974)는 정소상체 정액의 추출물이 정자의 수정능을 유지하며 과립세포가 제거된 난자의 체외수정에는 이들 물질이 필요하다고 했다. 수정능을 유지한 토기정자를 정장이 함유되어있는 배양액에서 배양되었을 때 이들 정자는 가역적으로 수정능을 잃는다고 하며(Bedford & Chang, 1962) 수정능력억제 인자가 lysin을 포함하는 peptide라고 한 반면 다른 연구자들은 거대단백 또는 당단백이며 원심분리에 의해서 이들물질이 제거된다고 하였다. 본 실험에 있어서도 120분간 전배양으로 수정능을 유지한 저아에 정소상체 정자의 상층액을 첨가배양하여 체외수정을 실시하였을 때 난자의 수정율이 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.

Bedford(1970)는 수정능 억제인자가 투명대를 뚫고 정자의 침투능에 필요한 침체반응부위에 결합하여 정자의 침투능을 억제하며, Dukelow등(1969)과 Kamwar등(1979)은 여러가지 축 및 인간의 정장에 수정능 억제인자가 존재함으로써 체외수정 및 인공수정시 정장이 제거되어야 한다고 하였다. Yanagimarchi(1981)는 체외수정에 있어서 난자와 정자의 반응 뿐만 아니라 침체반응에 Ca^{2+} 이온이 필수적이며, 정자가 충분한 제거능을 하기 위해서는 적어도 30-60분간 Ca^{2+} 이온에 노출되어야 수정능을 유지할 수 있다고 하였다(Fraser, 1977, 81, 82, 83). 본 실험에서도 Ca^{2+} 이온이 함유되어있지 않은 배양액에서 정자가 전배양 되었을 때 대조군(78.1%)보다 현저히 낮은 17.5%의 수정율을 보였다.

이상과 같이 정자의 전배양시간, 정소상체 정자 상층액의 첨가 및 Ca^{2+} 이온의 유무에 따라서 난자의 수정율에 현저한 변화를 보여주었다.

결 론

생쥐의 정소상체 정자의 전배양시간의 길이, 정소상체 추출물의 첨가 및 배양액내 Ca^{2+} 이온의 유무등 여러조건에 따라 체외수정을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정자의 전배양시간이 5, 30 및 120분 일 때 정자의 세척시 체외수정율이 각각 0, 0, 32.5, 37.1%였고 세척시 4, 6, 56.4 및 88.2%를 나타냈다.

2. 정소상체 상층액을 1:5와 1:15로 첨가배양했을 때 5분간 전배양후 채취된 상층액의 첨가군의 수정율은 각각 15.6, 32.6%였고 30분간 전배양후 채취된 상층액 첨가군의 체외수정율은 20.0, 42.2%였으며, 120분간 전배양후 획득된 상층액 첨가군은 각각 55.3, 70.3%로서 대조군의 75.5%보다 낮은 수정율을 나타냈다.

3. 체외수정 배양액에 추출액의 첨가유무에 따른 체외수정율은 투명대가 존재할 때 42.8와 75.6%로 첨가군에서 낮은 수정율을 나타냈다.

4. 배양액내의 Ca^{2+} 이온이 조제하지 않을 때 대조군보다 낮은 수정율을 나타냈다(세척시; 25.0:30.1%, 비세척시; 3.3:30.1%).

인 용 문 헌

- Austin CR: Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951, B4: 581-596.
- Bedford JM: Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Suppl* 1970, 2: 128-158.
- Bedford JM, Chang MC: Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high speed centrifugation. *Am J Physiol* 1962, 202: 179-181.
- Blandou RJ, Rumery RE: Fertilizing capacity of rat spermatozoa recovered from various segments of the epididymis. *Anat Rec* 1961, 139: 209(abt).
- Brackett BG, Oliphant G: Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975, 12: 260-274.
- Chang MC: A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature Lond* 1982, 168: 258-259.
- Cohen J, Webber RFA, Van der Vijver JCM,

- Zeilmaker GH : Fertilizina ability and motility of spermatozoa and from fertile and infertile men after exposure to heteroioogous seminal plasma. In *Hafez ESE Semmk(eds)* 1982b, pp53-62.
- Dudenhausen E, Talbot P: Detection and kinetics of the normal acrosome reation of the mouse sperm. *Gamete Res* 1982, 6 : 257-265.
- Dukelow WR, Chernoff HN, Wiuiams WL: Properties of decapacitation factor and presence in varioul species. *J Reprod Fertil* 1967, 14:393.
- Eng LA, Cliphant G : Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol Reprod* 1978, 19 :1803-1094.
- Fleming A, Wai P : Effect of whole and fractionated epididymal fluid on acrosome reaction and fertilization. *Biol Reprod* 1978, 18 : Abstr 77A.
- Fraser Lr : Motility patterns in mouse spermatozoa in before and after capacitation *J Exp Zool* 1977, 202 : 439-444.
- Fraser LR : Dibutyryl cyclic AMP decrease capacitation and fertilization in vitro. *J Reprod Fert* 1981, 62 : 63-72.
- Fraser LR : Ca is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Androl* 1982, 3 : 412-419.
- Fraser LR : Mouse sperm capacitation assessed by kinetics and morphology of fertilization in vitro. *J Reprod Fert* 1983a, 69 : 419-428.
- Gwatin RBL, Andersen CF Williasms DT : Capacitation of mouse spermatozoa in vitro: inverve of epididymal secretion and cumulus oophorus. *J Reprod Fert* 1974, 41 : 253-256.
- Johnson MH : The macro molecular organization of membranes and its bearing on event leading up to fertilization. *J Reprod Fert* 1975, 44 : 167-184.
- Kanwar KC, Yanagimarch R, Lopata A : Effect of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozca. *Fertol Steril* 1979, 31 : 321.
- Oliphant G, Brackett BG : Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extracts. *Fert Steril* 1979, 31 : 321-327.
- Reddy JM, Audhya TK : Properties of a highly purified antifertility factor from human seminal plasma. *Biol Reprod* 1982, 27 : 1076-1983.
- Yanagimarchi R : The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitaion. *J Reprod Fert* 1970, 23 : 193-196.
- Yanagimarchi R : Mechanisms of fertillization in mammals In Mastroianni L Bigger SD (eds) : "Fertilization and Embryonic development In vitro". *New York: Plenum Press* pp81-182.