

## pH 刺戟이 소 精子的 尖帽反應에 미치는 影響

朴永植·任京淳

서울大學校 農科大學

### Effect of pH Stimulation on Acrosome Reaction of Bovine Spermatozoa

Park, Y.S. and K.S. Im

College of Agriculture, Seoul National University

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate effect of pH stimulation on acrosome reaction of bovine spermatozoa. The results obtained were as follows :

1. When sperm was sequentially washed with SHP solution of pH 7.4, 7.7 and 7.4 and incubated in mTALP solution of pH 7.4 for 120 min, 15, 30, 60 and 120 min incubations showed significantly ( $p < 0.05$ ) higher sperm acrosome reaction rate than 0 min.
2. When sperm was sequentially washed with SHP solution of pH 7.4, 8.0 and 7.4 and incubated in mTALP solution of pH 7.4 for 15 minutes, sperm acrosome reaction rate was significantly ( $p < 0.01$ ) increased until 9 min. Incubation, but not increased thereafter.
3. When sperm were separately washed with SHP solutions of pH 7.0, 7.4 and 8.0 and incubated in mTALP solution of pH 7.4 for 9 min, sperm acrosome reaction rate was 74.8, 71.8 and 93.4%. pH 8.0 showed significantly ( $p < 0.01$ ) higher sperm acrosome reaction rate than pH 7.0 and 7.4.

The results suggest that stimulation of sperm with high pH induces sperm crosome reaction.

(Key word : capacitaion, acrosom reaction, pH stimulation, bovine sperm)

#### I. 緒 論

精子 表面成分의 消失은 受精能獲得과 밀접한 관계가 있어서 精子的 洗滌은 受精率을 증가시킨다(Bondioli와 Wright, 1983a, b; Fraser, 1984; Nishimura 등, 1989). 또한 대부분 實驗에서 生理的 수준보다 높은 pH는 精자의 尖帽反應을 유발시키고 受精能獲得時間을 단축시켰다(Cherr, 1985; Hyne과 Garber, 1981; Mahi와 Yanagimachi, 1973; Murphy와 Yanagimachi, 1984). Working과 Meizel(1983)은 精자가 尖帽反應을 수행하는 동안 K과 H에 대한 精子頭部의 膜透過性이 변해서 K이 유입되고 H이 유출되거나, Mg-ATPase proton pump가 억제되어 尖

帽내 pH가 증가한다고 하였으며, Hyne(1984)은 精子 주변의 pH가 精子내의 pH를 변화시키며, 尖帽내 pH의 증가는 尖帽反應과 밀접한 관계가 있다고 하였다.

Park과 Im(1991)은 精漿의 pH보다 높은 SHP溶液으로 精자를 洗滌하였을 때 精子洗滌液내 수소이온농도와 精자의 尖帽反應率이 증가하였다고 보고한 바 있다.

본 實驗은 Na이 우점된 單純培養液(SHP)으로 精자를 反復 洗滌하고, pH를 달리한 精子洗滌液으로 精자를 노출하였을 때, 精자의 尖帽反應에 미치는 影響을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

基礎培養液 : SHP 는 145mM 의 NaCl 液에 10mM 의 HEPES 와 50 $\mu$ M 의 phenol red 를 첨가한 다음 0.22 $\mu$ m 공극을 가진 濾過紙로 濾過하였다.

### 1. pH 刺戟後 장시간 培養이 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

헤어포드 精液을 pH 7.4인 SHP 液으로 6배 稀釋하여 1,600rpm 으로 5분간 遠心分離한 다음, 정자를 pH 7.7인 SHP 液(Park 과 Im, 1991)으로 각각 동량이 되도록 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 다시 정자를 pH 7.4인 SHP 液으로 동량이 되도록 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 이와 같이 反復洗滌한 精子를 pH 7.4인 mTALP 液(Park 과 Im, 1991)으로 동량이 되도록 재부유한 다음 39 $^{\circ}$ C에서 120분간 培養하여 精子의 尖帽反應率을 조사하였다.

### 2. pH 刺戟後 단시간 培養이 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

헤어포드 精液을 pH 7.4인 SHP 液으로 5배 稀釋하여 1,500rpm 으로 5분간 遠心分離한 다음, 정자를

pH 8.0인 SHP 液으로 동량이 되도록 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 정자를 pH 7.4인 SHP 液으로 동량이 되도록 재부유한 다음 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 이와 같이 反復洗滌한 정자를 pH 7.4인 mTALP 液으로 부유하여 39 $^{\circ}$ C에서 15분간 培養하여 精子의 尖帽反應率을 조사하였다.

### 3. pH의 刺戟이 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

헤어포드 精液을 pH 7.4인 SHP 液으로 5배 稀釋하여 1,500rpm 으로 5분간 遠心分離한 다음, 정자를 각각 pH 7.0, 7.4 및 8.0인 SHP 液으로 동량이 되도록 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다.

정자를 다시 pH 7.4인 SHP 液으로 동량이 되도록 재부유한 다음 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 이들 정자를 pH 7.4인 mTALP 液으로 부유하여 39 $^{\circ}$ C에서 9분간 培養하여 精子의 尖帽反應率을 조사하였다.

처리간의 첨모반응율의 유의차는 one way -ANOVA 에 의해서 分析하였다.

## III. 結果

### 1. pH 刺戟後 장시간 培養이 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

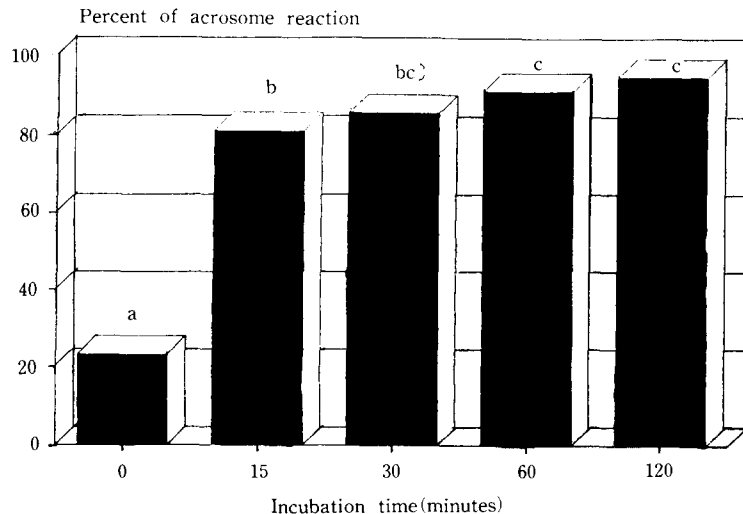


Fig. 1. Acrosome reaction rate of sperm sequentially washed with SHP solution of pH 7.4, 7.7 and 7.4 and incubated in mTALP for 0, 15, 30, 60 and 120 minutes. Different subscripts differ significantly ( $p < 0.05$ ).

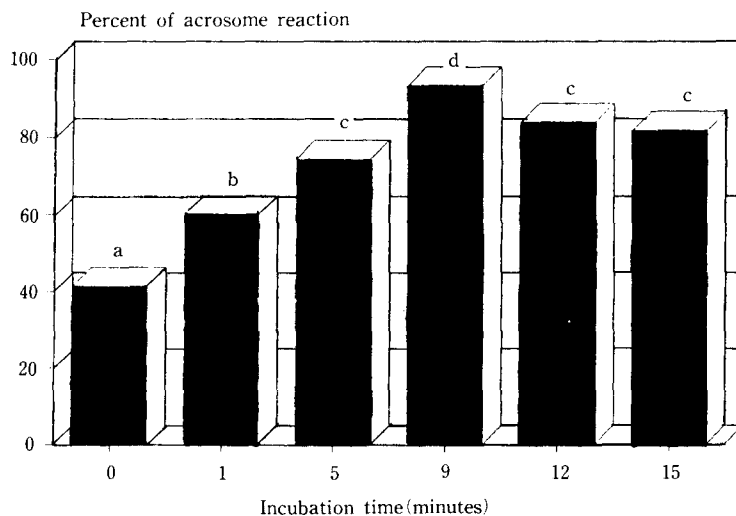


Fig. 2. Acrosome reaction rate of sperm sequentially washed with SHP solution of pH 7.4, 8.0 and 7.4 and incubated in mTALP for 0, 1, 5, 9, 12 and 15 minutes. Different subscripts differ significantly ( $p < 0.01$ )

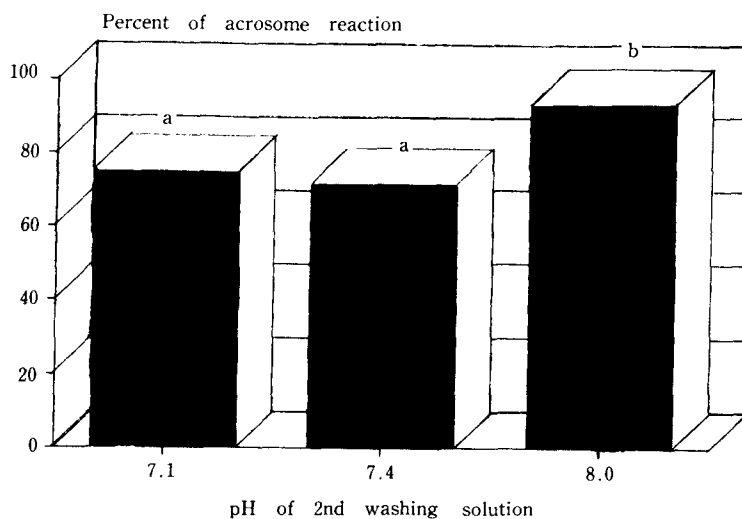


Fig. 3. Acrosome reaction rate of sperm were stimulated with SHP solution of pH 7.0, 7.4 and 8.0, and incubated in mTALP for 9 minutes. Different subscripts significantly ( $p < 0.01$ ).

精자를 pH 7.4, 7.7 그리고 7.4인 SHP 液으로 洗滌한 다음 이 정자를 pH 7.4인 mTALP 液으로 부유하여 120분간 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 Fig. 1과 같다.

反復洗滌한 精자를 mTALP 液에서 0, 15, 30, 60 및 120분간 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 각각 23.3, 80.8, 85.5, 91.1 및 94.8%로, 培養 15, 30, 60 및 120분이 0분보다 유의하게 높았다.

## 2. pH 刺戟後 단시간 培養이 精자의 尖帽反應에 미치는 影響

精자를 pH 7.4, 8.0 그리고 pH 7.4로 洗滌한 다음 정자를 pH 7.4인 mTALP 액으로 부유하여 15분간 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 Fig. 2와 같다.

反復洗滌한 精자를 mTALP 液에서 0, 1, 5, 9, 12 및 15분간 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 41.3, 60.0, 74.4, 93.4, 83.8 및 81.8%로, 9분까지는 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 증가하였으나 9분 이후는 증가하지 않았다.

## 3. pH 刺戟이 精자의 尖帽反應에 미치는 影響

精자를 pH 7.4인 SHP 液으로 1차 洗滌한 다음 pH 가 각각 7.1, 7.4 및 8.0인 SHP 液으로 2차 洗滌하고 다시 pH 7.4인 SHP 液으로 3차 洗滌한 다음 mTALP 液에서 9분간 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 Fig. 3과 같다.

精자의 尖帽反應率은 pH 7.1, 7.4 및 8.0이 각각 74.8, 71.8 및 93.4%로 pH 8.0이 pH 7.1과 7.4보다 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 높았다.

## IV. 考 察

Park 과 Im(1991)은 pH 가 높은 SHP 液으로 精자를 反復洗滌하였을 때, 精子洗滌液內 水素이온이 증가하고 精자의 尖帽反應率이 증가하였으며, 尖帽反應에 도달하는 時間이 단축되었다고 보고하였다.

Junge 등(1977)은 精子 주변의 높은 pH 는 精子膜의 表面電位를 교란시킨다고 하였으며, Hyne 등(1984)은 精子內에 농축된 Na 은 精子 주변의 Ca 과 교환된다고 보고한 바 있다.

본 實驗은 精자를 높은 pH 에 짧은 시간 노출하여 尖帽反應을 효율적으로 유발하려고 실시하였는 바, 높

은 pH 로 자극을 받은 精자는 培養時間이 증가함에 따라서 尖帽反應率이 급속히 증가하였다. 특히 높은 pH 에 刺戟받은 정자는 培養후 짧은 시간 내 尖帽反應을 나타내었다. 이상의 보고들과 본 實驗의 結果로부터 높은 pH 에 의해서 유발된 精子膜의 表面電荷의 교란은 精子內外로 이온轉送과 proton 을 流出시키며, 精자로부터 proton 의 流出은 尖帽膜內 pH 의 증가와 精子洗滌液內 proton 농도의 증가와 밀접한 관계가 있는 것으로 추론된다. 또한 proton 유출로 인한 精子膜 內외의 이온 不均衡을 해소시키기 위해서 精子內로 Na 이 流入되는 것으로 사료된다.

한편 精子內에 축적된 Na 은 mTALP 液의 Ca 과 교환됨으로서 精子內 Ca 의 流入이 조장되고, 精子內에 농축된 Ca 은 尖帽膜內 pH 의 증가와 더불어 精자의 尖帽反應을 誘發시킬 뿐만 아니라 첨모반응에 도달하는 시간을 단축시키는 것으로 생각된다.

## V. 摘 要

本 實驗은 pH 의 刺戟이 精자의 尖帽反應에 미치는 影響을 조사하기 위하여 실시하였으며, 그 結果는 다음과 같다.

1. 精자를 pH 7.4, 7.7 그리고 7.4인 SHP 液으로 洗滌하고 pH 7.4인 mTALP 액에서 120분간 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 培養 15, 30, 60 및 120분이 0분보다 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 높았다.
2. 精자를 pH 7.4, 8.0 그리고 7.4인 SHP 液으로 洗滌하고 pH 7.4인 mTALP 액에서 15분간 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 培養 9분까지는 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 증가하였으나 9분 이후부터는 증가하지 않았다.
3. 精자를 pH 7.0, 7.4 및 8.0인 SHP 液으로 각각 洗滌하고 pH 7.4인 mTALP 액에서 9분 배양했을 때 精자의 尖帽反應率은 74.8, 71.8 및 93.4%로서 pH 8.0이 pH 7.0과 7.4보다 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 높았다.

그러므로 높은 pH 의 刺戟은 精자의 尖帽反應을 유도시키는 것으로 示唆된다.

## VI. 引用文献

1. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, Jr. 1983 a. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. J. Anim. Sci. 57: 1001-1005.
2. Bondioli, K.R. and R.W. Wright, Jr. 1983 b. *In vitro* fertilization of ovulated and ovarian oocytes. J. Anim. Sci. 57: 1006-1012.
3. Cherr, G.N. 1985. Gamete morphology, physiology and interaction in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. A.B.A. 53: 844.
4. Fraser, L.R. 1984. Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface associated inhibitory component. J. Reprod. Fert. 72: 373-384.
5. Hyne, R.V. 1984. A bicarbonate and calcium induction of rapid guinea-pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. A.B.A. 53: 416.
6. Hyne, V.R. and D.L. Garbers. 1981. Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7.8. Biol. Reprod. 24: 257-266.
7. Hyne, R.V., R.E. Higginson, D. Kohlman and A. Lopata. 1984. Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea-pig sperm acrosome reaction. J. Reprod. Fert. 70: 83-94.
8. Junge, W. 1977. Membrane potentials in photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 28: 503-536.
9. Mahi, C.A. and R. Yanagimachi. 1973. The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. J. Reprod. Fert. 35: 55-66.
10. Murphy, S.J. and R. Yanagimachi. 1984. The pH dependence of motility and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. Gamete Res. 10: 1-8.
11. Nishimura, K., H. Matsunaga, Y. Fujitani and S. Kitano. 1989. Improvement of fertilizable of frozen spermatozoa in bovine *in vitro* fertilization. Jap. Reprod. Tech. Res. 9: 107-109.
12. Park, Y.S. and K.S. Im. 1991. Effects of pH of washing solution, washing frequency and individual bull on protone concentration in the sperm washed solution and sperm acrosome reaction. Korean J. Animal Reprod. 15: 7-13.
13. Working, P.K. and S. Meizel. 1983. Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. J. Reprod. Fert. 18: 275-286.