

## Ca, BSA, Heparin, 精液의 貯藏 및 수소 個體가 精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

朴永權·任京淳  
서울大學校 農科大學

### Effects of Ca, BSA, Heparin, Semen Storage and Individual Bull on Sperm Motility and Acrosome Reaction

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

College of Agriculture, Seoul National University

#### SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of Ca, BSA, heparin, semen storage and individual bull on motility and acrosome reaction of bovine fresh sperm and sperm stored in lactose-egg yolk solution(LES) at 5°C for 4 hours, and the results obtained were as follows:

1. When sperm was incubated in SCS containing Ca, BSA, Ca + BSA, heparin, heparin + Ca, heparin + BSA, and heparin + Ca + BSA for 15 minutes, there was significant difference in sperm motility among the treatments, especially BSA showed significantly higher sperm motility than the others. Also there was significant difference in sperm acrosome reaction among the treatments, especially BSA and Ca + BSA showed significantly higher sperm acrosome reaction than the others.
2. Bull KNC 1 showed significantly higher sperm motility than KNC 1, HOL 1 and 2 in both fresh and stored semen, however KNC 1 showed significantly lower sperm acrosome reaction than KNC 1, HOL 1 and 2. Therefore, there was significant difference in sperm motility and acrosome reaction among individual bulls.
3. When KNC 1 and KNC 2 sperm were incubated in SCS and SCS + Ca, SCS + BSA, SCS + Ca + BSA, SCS + heparin, SCS + heparin + Ca, SCS + heparin + BSA, and SCS + heparin + Ca + BSA, there was significant difference in sperm motility among individual bulls, especially BSA in KNC 1 and BSA, Ca and Ca + BSA in KNC 2 showed significantly higher motility than the others. However, there was significant difference in sperm acrosome reaction among individual bulls, Ca in KNC 1 and Ca + BSA in KNC 2 showed higher acrosome reaction than the others.

(Key words: Acrosome reaction, Ca, BSA, Heparin, Semen storage, Bull)

#### I. 緒 論

精子는 卵子와 受精하기 전에 受精能獲得과 尖帽反應을 수행하게 되는데, 이 두 反應에는 Ca의 濃도와 精

子의 培養時間이 중요한 영향을 미친다고 보고되고 있다(Fraser, 1987; Yanagimachi와 Usui, 1974). 한편 精子培養液에 첨가되는 일부민은 精子의 受精能獲得과 尖帽反應을 자극한다고 보고된 바 있다(Rogers,

1978). Handrow 등(1982)과 Parrish 등(1985)은 雌性生殖道管內에 함유되어 있는 glycosaminoglycans(GAGs)중에서 heparin 이 가장 강력한 尖帽反應誘發能力을 가지고 있다고 하였으며, Lu 등(1987)도 heparin 이 體外受精率을 증진시킨다고 보고한 바 있다. 이상 언급된 Ca, BSA 및 heparin 이외에도 精子의 貯藏(Aalseth와 Saacke, 1985)과 수소개체(Graham과 Foote, 1985; Lenz 등, 1986)도 精子의 活力과 尖帽反應에 影響을 미치는 것으로 보고되고 있다.

본 實驗은 Ca, BSA, heparin, 精子의 貯藏 및 수소개체가 精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響을 조사하기 위하여 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

한우 2두(KNC 1과 2)와 홀스타인 2두(HOL 1과 2)로부터 채취한 原精液의 일부는 pH 7.4인 2.9% sodium citrate solution(SCS)으로 10배 稀釋하고, 다른 일부는 lactose-egg yolk solution(LES)으로 2배 稀釋한 다음 5°C에서 4시간 貯藏한 후 SCS로 10배 稀釋하였다. 稀釋精液은 1,200rpm 으로 10분간 遠心分離하여 상등액을 제거한 다음, 精子는 pH가 7.4로 조정된 8종의 培養液, 즉 SCS, 2mM의 Ca이 첨가된 SCS(Ca), 6mg/ml의 BSA가 첨가된 SCS

(BSA), 10 $\mu$ g/ml의 heparin이 첨가된 SCS(heparin), 등량의 Ca과 BSA가 첨가된 SCS(Ca + BSA), 등량의 Ca과 heparin이 첨가된 SCS(Ca + heparin), 등량의 BSA와 heparin이 첨가된 SCS(BSA + heparin), 그리고 등량의 Ca, BSA와 heparin이 첨가된 SCS(Ca + BSA + heparin)로 稀釋하여 精子濃도가 ml 당 5천만이 되도록 조정하였다. 稀釋精液은 39°C에서 15분간 培養한 후 精子의 活力과 尖帽反應을 조사하였다.

## III. 結果

### 1. Ca, BSA 및 heparin이 소 精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

한편 洗滌한 精子를 Ca, BSA, heparin과 이들 組合이 첨가된 培養液에서 15분간 培養하였을 때, 精子의 活力과 尖帽反應率은 Table 1과 같다.

精子의 活力은 BSA, Ca + BSA, heparin + BSA, heparin + Ca + BSA, SCS, heparin + Ca, Ca 및 heparin이 각각 55.1, 50.0, 48.2, 47.1, 45.5, 44.0, 42.6 및 36.7%로서, 처리간에 유의한( $P < 0.01$ ) 차이가 있었다. 즉 BSA와 Ca + BSA의 精子活力은 각각 55.1과 50.0%로 SCS의 45.5%보다 유의하게 높았고, heparin은 36.7%로 SCS의 45.5%보다 유의하게 낮았다. 한편 精子의 尖帽反應率은 BSA, Ca + BSA, Ca, SCS, heparin + BSA,

Table 1. Effect of Ca, BSA, heparin and these combinations on bovine sperm motility and acrosome reaction.

Treatment	Percentage	
	Motile sperm	Acrosome reacted sperm
SCS	45.5 <sup>cde</sup>	8.9 <sup>xy</sup>
Ca	42.6 <sup>e</sup>	9.1 <sup>xy</sup>
BSA	55.1 <sup>a</sup>	10.4 <sup>x</sup>
Ca + BSA	50.0 <sup>b</sup>	10.3 <sup>x</sup>
Heparin	36.7 <sup>f</sup>	8.1 <sup>y</sup>
Heparin + Ca	44.0 <sup>de</sup>	7.3 <sup>y</sup>
Heparin + BSA	48.2 <sup>bc</sup>	8.7 <sup>xy</sup>
Heparin + Ca + BSA	47.1 <sup>bcd</sup>	8.1 <sup>y</sup>

a, b, c, d, e, f: significantly different at  $P < 0.01$  in the same column

x, y: significantly different at  $P < 0.05$  in the same column

Table 2. Effect of individual bull and semen storage on bovine sperm motility and acrosome reaction

Bull	Percentage			
	Motile sperm		Acrosome reacted sperm	
	Fresh	Stored	Fresh	Stored
KNC 1	34.4 <sup>b</sup>	19.4 <sup>b</sup>	13.7 <sup>a</sup>	12.1 <sup>a</sup>
KNC 2	55.2 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	9.9 <sup>b</sup>	6.6 <sup>c</sup>
HOL 1	56.3 <sup>a</sup>	40.2 <sup>a</sup>	5.4 <sup>c</sup>	4.9 <sup>d</sup>
HOL 2	57.8 <sup>a</sup>	40.2 <sup>a</sup>	8.4 <sup>b</sup>	8.8 <sup>b</sup>
Mean	50.9 <sup>A</sup>	37.8 <sup>B</sup>	9.4 <sup>NS</sup>	8.9

a, b, c, d : significantly different at  $P < 0.05$  in the same column

A, B : significantly different at  $P < 0.05$  in the same row

NS : not significantly different ( $P > 0.05$ ) in the same row

Fresh : Fresh semen

Stored : Stored semen

KNC : Korean Native Cattle

HOL : Holstein

heparin, heparin + Ca + BSA 및 heparin + Ca 이 각각 10.4, 10.3, 9.1, 8.9, 8.7, 8.1, 8.1 및 7.3%로서 처리간에 유의한 ( $P < 0.05$ ) 차이가 있었다. 즉 BSA 및 Ca + BSA의 尖帽反應率은 각각 10.4와 10.3%로서 heparin, heparin + Ca 및 heparin + Ca + BSA의 8.1, 7.3 및 8.1%보다 유의하게 높았다.

전반적으로 Ca 과 heparin보다 BSA가 첨가된 精液에서 활력이 높았으며, heparin보다 BSA가 첨가된 精液에서 尖帽反應率이 높았다.

## 2. 수소개체와 精液의 貯藏이 精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

수소개체와 精液의 貯藏이 精子活力과 尖帽反應에 미치는 影響은 Table 2와 같다.

新鮮精液의 精子活力은 KNC 1이 34.4%로 KNC 2, HOL 1 및 HOL 2의 55.2, 56.3 및 57.8%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 낮았는데, 貯藏精液에서도 精子의 活力은 KNC 1이 19.4%로 KNC 2, HOL 1 및 HOL 2의 44.0, 40.2 및 40.2%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 낮았다. 한편 新鮮精液의 精子 尖帽反應率은 KNC 1이 13.7%로 KNC 2, HOL 1 및 HOL 2의 9.9, 5.4 및 8.4%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았으며, 貯藏精液의 精子 尖帽反應率도 KNC 1이 12.1%로 KNC 2, HOL 1 및 HOL 2의 6.6, 4.9 및 8.8%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았다. 즉 精子의 活力과 尖帽

反應은 新鮮精液과 貯藏精液이 공히 수소개체간에 차이가 있었다.

전반적으로 精子의 活力은 新鮮精液이 50.9%로 貯藏精液의 37.9%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았으나, 精子의 尖帽反應率은 新鮮精液이 9.4%로 貯藏精液의 8.1%와 유의한 차이가 없었다.

## 3. 尖帽反應 誘發因子가 한우 精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

한우의 精液을 Ca, BSA, heparin 및 이들 組合이 첨가된 培養液에서 培養하였을 때, 精子의 活力과 尖帽反應率은 Table 3과 같다.

精子 活力은 KNC 1에서, BSA가 48.3%로 heparin 單獨 및 混用の 25.0~31.7%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았으며, KNC 2에서는 BSA, Ca + BSA 및 Ca 이 각각 63.3, 63.3 및 60.0%로서 heparin의 43.3%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았다.

한편 精子의 平均 活力은 KNC 2가 55.2%로서 KNC 1의 34.4%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았다. 한편 精子의 尖帽反應率은 KNC 1에서, Ca 이 17.2%로 heparin + Ca + BSA의 9.5%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았으나, KNC 2에서는, Ca 이 4.7%로 Ca + BSA의 15.9%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 낮았다. 한편 精子의 平均 尖帽反應率은 KNC 1이 13.7%로 KNC 2의 9.9%보다 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 높았다.

전반적으로 精子의 活力과 尖帽反應은 수소개체간에

Table 3. Effect of AR-inducing factors on fresh sperm motility and acrosome reaction of Korean Native Cattle

Treatment	Percentage			
	Motile sperm		Acrosome reacted sperm	
	KNC 1	KNC 2	KNC 1	KNC 2
SCS	36.7 <sup>ab</sup>	56.7 <sup>ab</sup>	15.6 <sup>xy</sup>	10.7 <sup>xy</sup>
Ca	36.7 <sup>ab</sup>	60.0 <sup>a</sup>	17.2 <sup>x</sup>	4.7 <sup>y</sup>
BSA	48.3 <sup>a</sup>	63.3 <sup>a</sup>	15.4 <sup>xy</sup>	12.3 <sup>xy</sup>
Ca + BSA	40.0 <sup>ab</sup>	63.3 <sup>a</sup>	13.2 <sup>xy</sup>	15.9 <sup>x</sup>
Heparin	31.7 <sup>b</sup>	43.3 <sup>b</sup>	13.5 <sup>xy</sup>	6.2 <sup>xy</sup>
Heparin + Ca	30.0 <sup>b</sup>	48.3 <sup>ab</sup>	14.6 <sup>xy</sup>	5.6 <sup>xy</sup>
Heparin + BSA	25.0 <sup>b</sup>	53.3 <sup>ab</sup>	10.8 <sup>xy</sup>	9.4 <sup>xy</sup>
Heparin + Ca + BSA	26.7 <sup>b</sup>	53.3 <sup>ab</sup>	9.5 <sup>y</sup>	14.1 <sup>xy</sup>
Mean	34.4 <sup>B</sup>	55.2 <sup>A</sup>	13.7 <sup>X</sup>	9.9 <sup>Y</sup>

a, b : x, y : significantly different at P<0.05 in the same column

A, B : X, Y : significantly different at P<0.05 in the same row

차이가 있었으며, Ca, BSA, heparin 및 이들 조합이 精子的 活力에 미치는 영향도 수소개체에 따라서 다르게 나타났다.

#### IV. 考 察

精子培養液에 첨가되고 있는 알부민(Rogers, 1978)은 精子膜의 일부 성분을 제거하고(Fraser, 1985), 培養液내 중금속과 착염화하며(Aounuma 등, 1982), 직접 精子膜의 二重構造를 혼란시켜(Lucy, 1984), 精子的 尖帽反應을 유발시키는 것으로 보고되고 있다. Byrd(1981)는 BSA가 mTALP 溶液에서 2시간 培養된 精子的 尖帽反應을 유의하게 증진시켰다고 하였다. 본 實驗에서도 BSA 單獨 및 混用처리구에서 精子的 活力이 높게 유지되면서, 尖帽反應이 촉진되었다.

精子尖帽反應因子로서 가장 많이 研究되어온 칼슘은 기니피 精子(Yanagimachi와 Usui, 1974) 또는 생쥐 精子(Fraser, 1982; 1987)의 尖帽反應을 유발한다고 보고된 바 있으나, Byrd(1981)는 소 精子에 있어서 칼슘의 尖帽反應誘發效果를 인정하지 않았다. 본 實驗에서 칼슘은 개체에 따라서 精子的 尖帽反應을 유발하였는데, 이러한 結果로부터 칼슘에 의한 精子的 尖帽反應은 각 수소간에 차이가 있는 것으로 사료된다.

한편 heparin은 精子的 尖帽反應誘發因子로(Handrow 등, 1982; Parrish 등, 1985), 또는 受精能獲得誘發因子로(Parrish 등, 1988) 논쟁이 되고 있는 바, 본 實驗에서는 尖帽反應誘發能力이 인정되지 않았다.

Ax 등(1985)은 수소개체의 受胎能力간의 차이를 體外에서 培養된 精子的 尖帽反應을 통해서 평가하려고 시도한 바 있다. 또한 많은 연구에서 卵黃稀釋液으로 부유한 精液의 尖帽反應率을 조사하여 수소개체의 受精能을 예시한 바 있다. (Davis와 Foote, 1987; Graham과 Foote, 1985; Lenz 등, 1986).

본 實驗에서 精子的 尖帽反應率은 수소개체간에 차이가 있었으며, 이러한 차이는 新鮮精液에서 뿐만 아니라 貯藏된 貯藏精液에서도 동일한 경향을 보였다. Aalseth와 Saache(1985)는 소 精子를 난구액에 부유하여 4°C에서 1일간 貯藏하였을 때, 精子的 첨단부위가 변형되지 않았다고 보고한 바 있는데, 본 실험에서도 精子的 尖帽反應率은 新鮮精液과 貯藏精液간에 유의한 차이가 없었다. 그러므로 新鮮精液뿐만 아니라 貯藏精液의 尖帽反應을 동시에 조사함으로써 수소개체의 受精能을 효과적으로 예견할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 摘要

본 實驗에서는 Ca, BSA, heparin 과, 精液의 體外 貯藏, 및 수소개체가 新鮮精子 및 卵乳液에 부유되어 5°C에서 4시간 貯藏된 貯藏精子的 活力과 尖帽反應에 미치는 影響을 조사하였던 바, 그 結果는 다음과 같다.

1. Ca, BSA, Ca + BSA, heparin, heparin + Ca, heparin + BSA 및 heparin + Ca + BSA 가 첨가된 SCS에서 15분간 培養한 精子的 活力은 처리간에 유의차가 인정되었으며, BSA 가 다른 처리보다 유의하게 높았다. 한편 精子的 尖帽反應率은 처리간에 유의차가 인정되었으며, BSA 와 Ca + BSA 가 다른 처리보다 유의하게 높았다.
2. 精子的 活力은 新鮮精液과 貯藏精液 공히 KNC 1이 KNC 2, HOL 1과 2보다 유의하게 낮았으나, 尖帽反應率은 KNC 1이 KNC 2, HOL 1과 2보다 유의하게 높았다. 즉 精子的 活力과 尖帽反應率은 공히 수소개체간에 차이가 있었다.
3. KNC 1과 KNC 2의 新鮮精자를 SCS, SCS + Ca, SCS + BSA, SCS + Ca + BSA, SCS + heparin, SCS + heparin + Ca, SCS + heparin + BSA 및 SCS + heparin + Ca + BSA 용액에 각각 15분간 培養하였을 때, 精자의 活力은 수소개체간에 유의한 차이가 있었는데, KNC 1에서는 BSA 가 다른 처리보다 유의하게 높았으나, KNC 2에서는 BSA, Ca + BSA 및 Ca 이 다른 처리보다 유의하게 높았다. 한편 精자의 尖帽反應率은 역시 수소개체간에 유의한 차이가 있었으며, KNC 1에서는 Ca 이, KNC 2에서는 Ca + BSA 가 다른 처리보다 높았다.

(主要語: 尖帽反應, Ca, BSA, heparin, 精자의 貯藏, 수소개체)

## VI. 引用文獻

1. Aalseth, E.P. and R.G. Saacke. 1985. Morphological change of acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4°C, J. Reprod. Fert. 74: 473-478.
2. Aonuma, S., M. Okabe, Y. Kishi, M. Kawaguchi and H. Yamada. 1982. Capacitation inducing activity of semen albumin in fertilization of mouse ova *in vitro*. J. Pharm. Dyn. 5: 980-987.
3. Ax, R.L., K. Dickson and R.W. Lenz. 1985. Induction of acrosome reaction by chondroitin sulfates *in vitro* corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. J.D.S. 68: 387-390.
4. Byrd, W. 1981. *In vitro* capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. J. Exp. Zool. 215: 35-46.
5. Davis, A.P. and R.H. Foote. 1987. Relationship of sire fertility to acrosome-reacted and motile spermatozoa after treatment with liposomes. J.D.S. 70: 850-857.
6. Fraser, L.R. 1982. Ca is required for mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J. Androl. 3: 412-419.
7. Fraser, L.R. 1985. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. J. Reprod. Fert. 74: 185-196.
8. Fraser, L.R. 1987. Minimum and maximum extracellular Ca requirements during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81: 77-89.
9. Graham, J. and R.H. Foote. 1985. Capacitating bull sperm and predicting their fertility in a test tube. Adv. Anim. Breeder 33: 6.
10. Handrow, R.R., R.W. Lenz and R.L. Ax. 1982. Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 107: 1326-1332.
11. Lenz, R.W., J. Martin and R.L. Ax. 1986. Prediction of nonreturn rates Holstein bulls by evaluating occurrence of acrosome reaction *in vitro*. J. D. S. 69(Suppl.): 226.

12. Lu, K.H., I. Gordon, M.P. Boland and T.F. Crosby. 1987. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro*. A.B.A. 55: 400.
13. Lucy, J.A. 1984. Do hydrophobic sequences cleaved from cellular polypeptides induce membrane fusion reactions *in vivo*? FEBS. Lett. 166: 223-231.
14. 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.
15. 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.
16. Rogers, B.J. 1978. Mammalian sperm capacitation and fertilization *in vitro*: A critique of morphology. Gamete Res. 1: 165-223.
17. Yanagimachi, R. and N. Usui. 1974. Calcium dependence of acrosome reaction and activation of guinea-pig spermatozoa. Exp. Cell Res. 89: 161-174.