

人工培養液에서 培養된 牛精자의 形態的 變化

高大煥·尹山鉉*·嚴基勳*·李景廣**·鄭吉生*

尙志大學校併設專門大學 畜產科

Morphological Changes of Bovine Epididymal Spermatozoa Incubated in Chemical Defined Medium

Ko, D.H., S.H. Yoon*, K.B. Oum*, K.K. Lee** and K.S. Chung*

Department of Animal Husbandry, Sang-Ji Junior College

SUMMARY

This experiment was carried out to investigate ultrastructural changes that occurred in bovine epididymal spermatozoa during incubation in a BO medium supplemented with 5mM caffeine.

No structural changes were observed under electron microscope in the majority of non-incubated sperm(79.8%) keeping the membrane intact. Structural changes were however observed when spermatozoa were cultured in a BO medium supplemented with 5mM caffeine, which were classified into 4 types, "intact(29.4%)", "vesiculated(45.6%)", "acrosome lost(17.8%)" and "degenerated(7.2%)" spermatozoa, respectively.

These results indicated that: 1) vesiculation of spermatozoa membrane is normal acrosome reaction and acrosome lost of spermatozoa is dead one; 2) caffeine can induce acrosome reaction of bovine epididymal spermatozoa.

I. 緒 論

哺乳動物의 精子가 卵子와 정상적으로 受精되기 위해서는 "受精能獲得(capacitation)"이라고 부르는 生理的 變化를 겪어야 하며(Austin, 1951; Chang, 1951), 이 變化는 "尖體反應(acrosome reaction)"이라고 부르는 形態的 變化에 의해 완료된다(Austin과 Walton, 1960; Gwatkin, 1977; Meizel, 1978; Bedford와 Cooper, 1978; Yanagimachi, 1981).

전형적인 尖體反應은 精子 頭部의 原形質膜과 尖體外膜이 융합하여 胞狀化되면서 尖體의 내용물인 尖體酵素가 細胞外로 방출되는 현상으로(Piko와 Tyler, 1964; Barros 등, 1967; Russel 등, 1979), 家畜

精子의 尖體反應도 이러한 양식에 따른다고 추측되고 있다. 그러나 人間精子의 경우 原形質膜과 尖體外膜의 융합에 의한 胞狀化 뿐 아니라 尖體外膜 단독의 胞狀化도 일어난다는, 尖體反應과정에 대한 異論이 제기되고 있다(Roomans와 Afzelius, 1975; Jamil과 White, 1981; Nagee 등, 1986). 소의 경우 여러 연구자들이 尖體反應 誘起後의 精子 形態를 電子顯微鏡으로 관찰하여 보고하고 있지만(Byrd, 1981; Parrish 등, 1988), 人工培養液에서 培養하여 尖體反應을 誘起한 牛精자의 形態的 變化에 대한 보고는 많지 않다.

따라서 본 실험에서는 caffeine을 함유한 人工培養液에서 培養한 牛精樂上體 精子의 形態的 變化를 조사

*建國大學校 畜產學科(Department of Animal Science, Kon-Kuk University)

**韓國科學技術研究院 遺傳工學센터(Genetic Engineering Center, KIST)

하여 그 결과의 개요를 보고한다.

II. 材料 및 方法

도축장에서 도살 직후 절취한 牛精巢로부터 精巢上體 尾部와 精管을 분리한 후 Brackett & Oliphant (BO) 液 (Brackett and Oliphant, 1975) 으로 精管을 관류하여 精巢上體 尾部의 精子를 시험관에 회수하였다. 회수한 精子는 BO 液으로 약 10배 희석하여 원심분리 (200×g, 10분간)에 의해 2회 洗淨한 후 精子를 BO 液(약 5ml)에 부유시켰다. 이 精子 부유액 일부는 원심분리하여 精子塊를 형성시킨 후 無處理 精子시료로 하였다. 남은 精子 부유액은 원심분리하여 상청액을 버리고 형성된 精子塊에 5mM caffeine 함유 BSA 불함유 BO 液을 첨가한 후 3회에 걸쳐 반복 洗淨했으며, 洗淨後의 精子塊에 상기 5mM caffeine 함유 BSA 불함유 BO 液을 첨가하여 精子濃도가 30×10^6 /ml 이 되도록 부유시켰으며, 이어 10mg/ml 의 BSA 를 함유한 BO 液으로 등량 희석한 후 (精子濃度: 15×10^6 /ml)

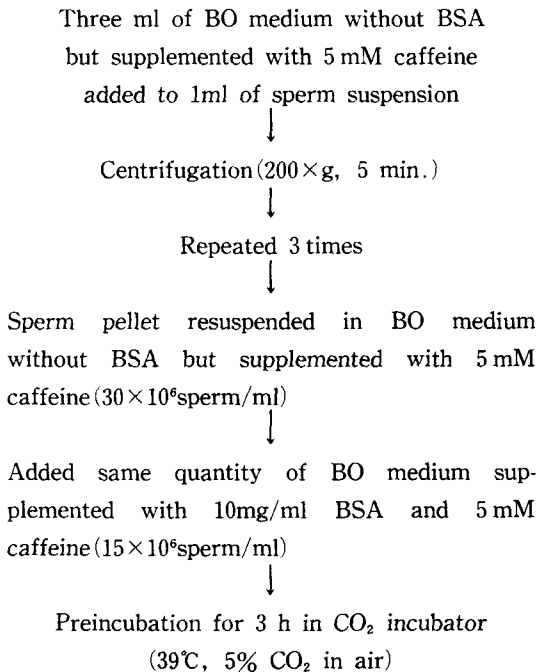


Fig. 1. Experimental procedure for in vitro acrosome reaction of bovine epididymal spermatozoa with caffeine

CO₂ 培養器 (39°C, 5% CO₂, 95% 공기)에서 3시간 前培養하였다(이하 caffeine 처리법, Fig. 1). 前培養이 끝난 精子 부유액은 원심분리하여 精子塊를 형성시킨 후 caffeine 처리 精子 시료로 하였다.

각 시료의 精子塊에 2.5% glutaraldehyde와 2% paraformaldehyde 용액 [phosphate buffer, pH 7.2]을 10배 정도 첨가하여 잘 혼합한 후 원심분리 (600×g, 10분)한 다음 상청액은 버리고 30분간 방치하여 前固定하였다. 前固定후 pH buffer washing solution 으로 10분간 세척한 다음 1% osmium feroxide [phosphate buffer pH 7.2]에서 20분간 後固定하였다. 탈수는 alcohol series와 acetone으로 하였고, Epon 812에 包埋하였다. 包埋가 끝난 시료는 LKB III ultratome의 diamond knife로 600~500Å의 超薄切片을 작성하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 1200EX (JEOL)透過 電子顯微鏡으로 관찰하였다.

III. 結果 및 考察

電子顯微鏡에서 관찰한 결과 牛精子의 尖體反應은 無反應 (unreacted; Fig. 2), 原形質膜의 膨潤 (swelling of plasma membrane; Fig. 3), 原形質膜과 尖體外膜의 融合 (Fusion between plasma membrane and outer acrosomal membrane; Fig. 4) 및 胞狀化 (vesiculation; Fig. 5)의 과정을 거쳐 誘起되는 것으로 나타났으며, 尖體離脫 (acrosome lost; Fig. 6) 精子는 尖體反應 誘起後 死滅한 것으로 추정되었다.

Table 1은 채취 직후에 固定한 牛精巢上體 精子 (Fig. 7, 8, 9)와 caffeine 처리를 실시한 精子 (Fig. 10, 11, 12)를 전자현미경 하에서 관찰한 결과로서, 채취 직후에 固定한 경우 대부분 (79.8%)의 精子는 無反應이었으나 일부에서는 胞狀化 (5.2%), 尖體離脫 (4.4%) 또는 退行 (10.6%)이 일어났다.

이와는 대조적으로 5 mM의 caffeine을 함유한 BO 培養液으로 3회 세척후 3시간 前培養한 경우(이하 caffeine 처리)에는 많은 精子에서 形態의 變化가 관찰되었다. 이들 變化는 精子의 일반적인 外觀과 尖體의 形態에 따라 4가지 形態 즉, 核에 尖體가 부착된 채로 남아 있으나 原形質膜은 精子 頭部 표면으로부터 약간

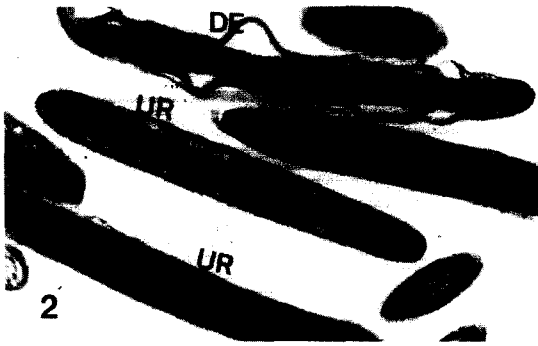


Fig. 2. Unreacted(Intact : UR) and Degenerated sperm(DE). (×25,000)

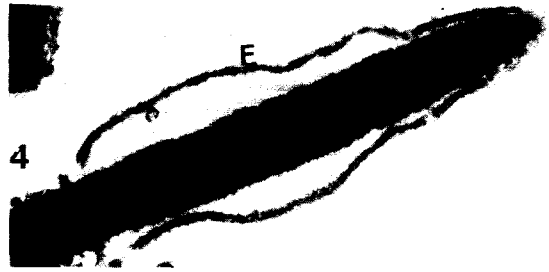


Fig. 4. Fusion(F) between sperm plasma membrane and outer acrosomal membrane. (×50,000)



Fig. 3. Swelling(S) of sperm plasma membrane. (×25,000)



Fig. 5. Vesiculation(V) of sperm plasma membrane and outer acrosomal membrane. (×50,000)

Plate I. Electron micrograph of the stage of acrosome reaction in bovine epididymal spermatozoa, which were preincubated for 3 hours in BO medium supplemented with 5 mM caffeine after washing 3 times.

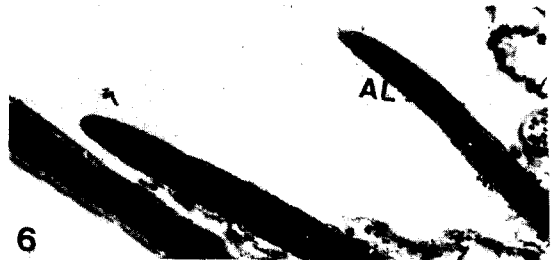


Fig. 6. Acrosome lost of sperm. (×25,000)

Table 1. Morphological change of bovine epididymal spermatozoa preincubated for 3 hours in BO medium supplemented with 5 mM caffeine

	No. of sperm showed morphological change in acrosome			
	Intact (%)	Vesiculated (%)	Acrosome lost (%)	Degenerated (%)
Control	399 (79.8)	26 (5.2)	22 (4.4)	53 (10.6)
With caffeine	147 (29.4)	228 (45.6)	89 (17.8)	36 (7.2)

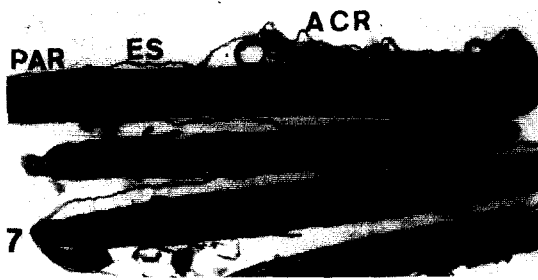


Fig. 7. The acrosome cap region(ACR), the equatorial segment(ES) and postacrosomal region(PAR) remain intact. (25,000)

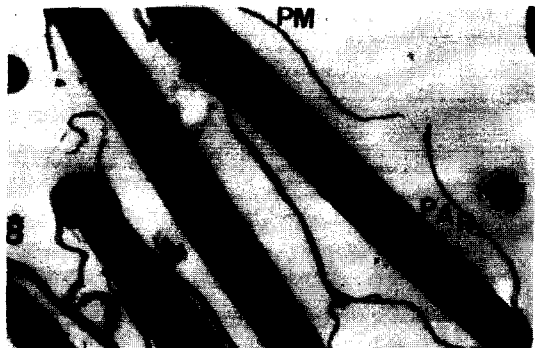


Fig. 8. The swelling of plasma membrane (PM) around the sperm head. The cell membrane of postacrosomal region(PAR) was abnormally separated. (X25,000)

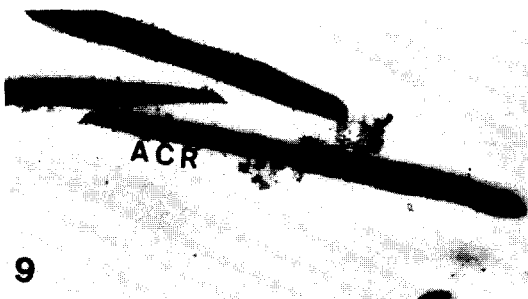


Fig. 9. The outer acrosomal membrane was completely separated from inner acrosomal membrane and laked at the acrosomal cap region(ACR). (X12,500)

Plate II. Electron micrograph of bovine epididymal spermatozoa soon after collection.

분리된 無反應精子(29.4%), 尖帽部에서 原形質膜과 尖體外膜間에 胞狀化가 일어났으나 赤道部에서 後帽部에 이르기까지는 어떠한 形態의 變化도 보이지 않은 胞狀化 精子(45.6%), 尖體外膜이 尖體內膜으로부터 완전히 분리되었고 尖帽部가 전체적으로 결여된 尖體離脫 精子(17.8%) 및 尖體가 核에 부착되어 있으나 後帽部の 細胞膜이 비정상적으로 분리된 退行 精子(7.2%)로 분류되었다.

본 실험의 결과로부터 caffeine 처리한 牛精子의 頭部에서는 사출직후의 精子와는 명확하게 다른 形態의 變化가 밝혀졌다. 특히 尖體 頭帽部에 인정되는 胞狀化는 이제까지 보고된 다른 많은 哺乳動物 精子의 尖體反應에 대한 形態的 특징(Piko와 Tyler, 1964; Barros 등, 1967; Bedford, 1968; Soupart와 Strong, 1974; Yanagimachi와 Usui, 1974; Szollosi와 Hunter, 1978; Mori와 Uchida, 1981; Imai 등, 1983; Crozet, 1984; Song 등,

1987)과 잘 일치하고 있다.

Fig. 12에서 보는 바와 같이 胞狀化는 形態의 上이한 2종류의 膜, 즉 原形質膜과 尖體外膜間의 膜融合에 의해 일어난다는 것이 시사되었고, 또 이 尖體反應은 尖體 頭帽部 전체의 소실(Fig. 6)등 精子의 退行에 수반되어 일어나는 變化와는 명확히 구별되는 것으로, 폐지 및 산양 精子의 尖體反應에 대한 Imai 등(1983)의 보고와 일치하고 있다.

한편 본 실험에 있어서 caffeine 처리 精子의 尖體反應 誘起率(45.36%)은 10 μ g/ml의 heparin을 첨가한 TALP 培養液에서 9.5시간 培養한 牛精子의 尖體反應率이 45 \pm 6%이었다는 Parrish 등(1988)의 보고와 일치하고 있다.

본 실험에서 尖體反應이 誘起된 牛精子의 赤道部는 양호하게 유지되어 있었다(Fig. 10, 11). 이는 Imai 등(1983)이 돼지 精子의 尖體反應 誘起後, 赤道部가 양호하게 유지되고 있었다는 보고와 일치하고 있으며,



Fig. 10. The vesiculation(V) of the acrosome. The acrosomal contents disperse and the microtubule like structure appear in the acrosomal cap region(ACR). Post acrosomal region(PAR) remains intact. (X25,000)



Fig. 11. The progressed membrane vesiculations(V) of the acrosomal cap region. The equatorial segment(ES) remains intact.

Fig. 12. Membrane vesiculation resulting from fusing of the plasma membrane (PM) and the outer acrosomal membrane(OAM) is seen in the acrosomal cap region. (X45,000)



Plate III. Electron micrograph of bovine epididymal spermatozoa preincubated for 3 hours in BO medium supplemented with 5 mM caffeine after washing 3 times.

돼지 精子는 赤道部 위에 尖體內膜과 尖體外膜을 견고히 결합시키고 있는 膜內 骨格이 존재한다는 사실 (Russel 등, 1980)로 미루어 생각할 때 牛精子의 赤道板 部位에도 尖體 內外膜 사이를 견고히 결합시키고 있는 膜內 骨格이 존재하는 것으로 여겨진다.

본 실험의 결과는 caffeine을 첨가한 BO 培養液이 牛精子의 尖體反應을 誘起시킨다는 것을 시사하고 있으며, 上記의 방법으로 尖體反應을 誘起한 牛精子가 體外 成熟시킨 牛卵細胞과 受精하여 68.4%의 受精率을 얻 으므로서(高, 1990), caffeine 처리 牛精子의 尖體反應 誘起는 生理學的인 의미를 갖는 變化라고 思慮된다.

IV. 摘要

본 試驗은 caffeine을 함유한 人工 培養液에서 培養한 牛精巢上體 精子의 形態的 變化를 透過 電子顯微鏡으로 관찰하였다.

電子顯微鏡에서 관찰한 결과 채취 직후의 無培養 精子는 대부분(79.8%)에서 구조상의 變化없이 원형 그대로의 原形質膜을 유지하고 있었으나 5mM의 caffeine을 함유한 BO 培養液에 3시간 培養한 精子는 尖體의 구조상 4가지 形態로 분류되었다. 즉 無反應, 胞狀化, 尖體離脫 및 退行으로서 각각 29.4%, 45.

6%, 17.8% 및 7.2%였다.

이러한 결과는 精子膜의 胞狀化가 정상적인 尖體反應이며 尖體離脫 精子는 死滅精子라는 것과 caffeine 이 牛精巢上體 精子의 尖體反應을 誘起시킬 수 있다는 것을 示唆하고 있다.

V. 引用文獻

1. Austin, C.R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* 4: 581-596.
2. Austin, C.R. and G.W. Walton. 1960. Fertilization. In *Marshall's Physiology of Reproduction*, Edited by AS Parkes, vol. 1, pt.2. London, Longmans and Green, p.310.
3. Barros, C., J.M. Bedford, L.E. Franklin and C.R. Austin. 1967. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 34: C1.
4. Bedford, J.M. 1968. Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. *Am. J. Anat.* 123: 329-358.
5. Bedford, J.M. and G.W. Cooper. 1978. Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs. In *Cell Surface Reviews*, vol. 5(Membrane fusion), Edited by G. Poste and G.L. Nicolson. Amsterdam. North-Holland, p.65.
6. Brackett, B.G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12: 260-274.
7. Byrd, W. 1981. *In vitro* capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 215: 35-46.
8. Chang, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the follicular tubes, *Nature (Lond.)* 168: 697-698.
9. Crozet, N. 1984. Ultrastructural aspects of *in vitro* fertilization in the cow. *Gamete Res.* 10: 241-251.
10. Gwatkin, R. B. L. 1977. Fertilization mechanisms in man and mammals, Plenum Press, New York.
11. Imai, H., C.I. Kim, K. Niwa and A. Iritani. 1983. Morphological changes of boar and goat spermatozoa incubated in the isolated uterus from a mating gilt. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 29: 94-98.
12. Jamil, K. and I.G. White. 1981. Induction of acrosome reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. *Arch. Androl.* 7: 283.
13. Meizel, S. 1978. The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach, in: *Development in Mammals* (M.H. Johnson, ed.), Vol. 3, pp.1-64, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
14. Mori, T. and T.A. Uchida. 1981. Ultrastructural observations of fertilization in Japanese longfingered bat, *Miniopterus schreibersii fuliginosus*. *J. Reprod. Fert.* 63: 231-235.
15. Nagae, T., R. Yanagimachi, P.N. Srivastava and H. Yanagimachi. 1986. Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 45(5): 701-707.
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.
17. Piko, L. and A. Tyler. 1964. Fine structural studies of sperm penetration in the rat. *Proc. Vth Intern. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Trento, 2: 372-377.
18. Roomans, G. and B.A. Afzelius. 1975. Acrosome vesiculation in human sperm. *J. Submicrosc. Cytol.* 7: 61.
19. Russel, L., R.N. Peterson and M. Freund. 1979. Morphologic characteristics of the chemically induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 32: 87.
20. Song, H.B. and Akira Iritani. 1987. Ultrastructural observations of acrosome

- reaction of goat spermatozoa preincubated in the hamster uterus. Korean J. Anim. Reprod. 11(1) : 26-32.
21. Soupart, P. and P.A. Strong. 1974. Ultrastructural observation on human oocytes fertilized *in vitro*. Fertil. Steril. 25 : 11-44.
 22. Szollosi, D. and R.H.F. Hunter. 1978. The nature and occurrence of the acrosome reaction in spermatozoa of the domestic pig, *Sus scrofa*. J.Anat. 127 : 33-41.
 23. Yanagimachi, R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals, in: Fertilization and embryonic development *in vitro* (L. Mastroianni and J.D. Biggers, eds.), pp. 81-182, Plenum Press, New York.
 24. Yanagimachi, R. and N. Usui. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp. Cell. Res 89 : 161-174.
 25. 高大煥. 1990. 牛精巢上體 精子的 體外受精能獲得에 관한 研究. 建國大學校 博士學位論文.