

Caffeine, Heparin 및 Caffeine-heparin 처리가 한우 정자의 첨체반응에 미치는 영향

오 원 진
중부사회산업대학

Effects of Caffeine, Heparin and Caffeine-heparin on Acrosome Reaction in Korean Native Cattle Sperm

W.J. Oh

The Central Socio-Industrial College, Department of Dairy Science

SUMMARY

Effects of caffeine, heparin and caffeine-heparin treatments for in vitro capacitation of Korean Native Cattle sperm on acrosome reaction and viability were studied using the methods of Wells-Awa and Dual stain.

The results were summarized as follows:

1. The acrosome reaction of sperm when treated with caffeine after 0 to 4 hrs of preincubation were 11.0~75.7% for Wells-Awa stain, and 14.3~75.55% for Dual stain. True acrosome reaction of sperm for Dual stain was 3.0~29.2%. The viability of sperm was 62.2~27.2%.
2. The acrosome reaction of sperm when treated with heparin after 0 to 4 hrs of preincubation were 17.0~81.2% for Wells-Awa, and 14.3~75.5% for Dual Stain. True acrosome reaction of sperm for Dual stain was 1.5~26.6%. The viability of sperm was 58.6~35.8%.
3. The acrosome reaction of sperm when treated with caffeine-heparin after 0 to 4 hrs of preincubation were 13.0~83.2% for Wells Awa, and 11.0~78.5% for Dual stain. True acrosome reaction of for Dual stain was 5.1~26.3%. The viability of sperm was 60.5~30.1%.

서 론

가축에서 체외수정과 수정란 이식기술이 산업적으로 이용됨으로서 이와 연관된 유전공학 기술을 이용한 가축의 생산성 향상 및 능력개량 방법에 관한 연구가 활발해지고 있다. 특히 소의 체외수정 기술은 가장 실용성이 크며 응용범위도 넓어 이에 대한 관심이 매우 고조되고 있으며, 현재 체외수정에 의한 송아지가 분만될 정도로 많은 발전이 이루어

져왔다(Brackett 등, 1982, 1984; Lambert 등 1986; Goto 등, 1988; Fukuda 등, 1990)

이러한 체외수정 기술 개발에 있어서 가장 문제 시되고 중요한 것은 정자의 수정능력으로 소 정자의 체외수정능 획득방법이 여러 가지 보고되고 있으나 보고자에 따라 성적 차이가 심하고 아직 확실한 체외수정능 획득 방법이 확립되지 않아 소 난자의 체외수정 성적을 저하시키는 중요한 요인으로 작용하고 있다(Parrish 등, 1986). 정자가 난자와 수정되기 위해서는 자성 생식기도내에서 일정시간

을 경과하면서 생리적 및 기능적 변화가 이루어져야 하는데 이러한 현상을 정자의 수정능획득이라 한다(Austin, 1951; Chang, 1951). 그러나 실제로 정자가 난자의 투명대를 통과하여 수정이 이루어지기 위해서는 수정능획득에 이어 침체 반응이 일어나야 한다(Austin과 Bishop, 1958).

현재까지 수정능획득의 직접적인 판정 방법으로는 hyperactivation에 의한 운동성 평가 방법이 있으나 이는 hamster에서만 가능한 방법으로 알려져 있으며 소정자의 수정능획득 여부를 판정하기 위한 방법으로는 투명대 제거 햄스터 난자나(Brackett 등, 1982., Graham과 Foote, 1984), 투명대제거 소난자(Fulka 등, 1992), 또는 체외성숙 소난자를 이용하는 방법(Lenz 등, 1983; Ball 등, 1983) 등으로 정자를 난자에 수정시켜 난자내의 정자 침투율로서 직접적으로 판정하는 방법이 있다. 이처럼 정자의 체외수정능 획득 여부를 직접적으로 난자와 결합시킨 결과로 판정하는 수 밖에는 없었으나 이는 동물에 따라서 난자를 구하기가 어렵고 시간과 경비가 소요되는 문제점이 있다.

따라서 많은 연구자들이 정자의 수정능획득 여부를 알기 위해서 염색을 실시하거나 침체 반응에 따라 판정하고 이를 직접 난자와 수정시켜 확인함으로써 염색 방법에 대한 필요성을 증진시켜왔다.

따라서 본 연구는 수정능획득 유기물질로 알려진 heparin, caffeine 및 caffeine-heparin을 처리하여 수정능획득 여부를 Wells-Awa 염색법(Wells와 Awa, 1970)과 이중 염색법(Didion 등, 1989)으로 염색하여 비교 검토함으로써 효과적인 수정능획득 방법을 알아보고 체외수정에 있어서 정자의 체외수정 적기 판정에 활용하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시정액

축산업 협동조합 한우 개량사업소에서 제조된 한우 종모우 동결정액 0.5ml straw를 37°C 항온수조에서 30초간 용해한 후 실험에 공시하였다.

2. 배양액의 제조

수정능획득을 위하여 BO^o (Brackett와 Oliphant, 1975)에 caffeine, heparin 및 caffeine-

heparin을 첨가하여 배양액을 각각 세척용과 배양용으로 제조하였다.

Caffeine 처리시, 세척용으로는 BSA(Bovine serum Albumin)가 들어 있지 않은 BO액에 caffeine을 10mM을 첨가하고 배양용으로는 BSA가 들어있는 BO액에 5mM을 첨가하였다. Heparin 처리시는 세척용에는 BSA를 첨가하지 않고 배양용에는 BSA를 첨가한 BO액에 각각 10 μ g/ml heparin을 첨가하고, caffeine-heparin 병용 처리시에는 세척용에는 10mM caffeine을, 배양용에는 5mM caffeine과 10 μ g/ml heparin을 BO액에 첨가하였다. 준비된 배양액은 0.2 μ m millipore filter (Gelman Sci, Inc.)로 여과하여 39°C, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도인 CO₂ 배양기에서 4시간 평형시켜 사용하였다.

3. 정자 처리와 전배양

(1) Caffeine 처리

각기 다른 두 개체의 0.5ml straw 동결 용해 정자를 혼합하여 caffeine이 10mM 함유되고 BSA가 들어 있지 않은 BO액 4ml로 희석 한 다음, 250g에서 5분간 다시 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이를 다시 5mM caffeine과 ml당 5mg BSA가 들어있는 BO액 1ml로 희석하여 정자농도 1~2 × 10⁶/ml 되게 조정된 후 39°C, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도인 CO₂ 배양기에서 각각 0, 1, 2, 3, 4시간별로 전배양한 후, 침체 반응 여부를 관찰하였다.

(2) Heparin 처리

동결 정자를 용해한 후 heparin 10 μ g/ml가 들어있고 BSA가 들어있지 않은 4ml BO액으로 희석한 다음 250g에서 5분간 원심분리하였다.

이를 2회 반복한 다음 다시 10 μ g/ml heparin, 5mg/ml BSA가 함유된 BO액 1ml로 희석하여 1~2 × 10⁶/ml 정자수를 조정된 후 각각 0, 1, 2, 3, 4시간별로 전배양을 실시하였다.

(3) Caffeine-heparin 처리

동결 용해한 정자를 caffeine 10mM이 들어있고 BSA가 첨가되지 않은 4ml의 BO액으로 희석하여 250g에서 5분간 2회 원심분리하여 상층액을 제거하고 5mM의 caffeine과 10 μ g/ml의 heparin과 5mg/ml의 BSA가 함유된 BO액에 1ml로 희석하여 각각 0, 1, 2, 3, 4시간 전배양을 실시하였다.

4. 염색 및 판정

동결 용해 정자를 caffeine, heparin 및 caffeine-heparin 처리 후 0, 1, 2, 3, 4 시간별로 전배양하여 이중염색법(Didion 등, 1989)과 Wells-Awa 염색법(Wells와 Awa, 1970)에 준하여 실시하였다.

(1) Wells-Awa 염색법

염색액은 1% eosin B 와 1% fast green FCF와 ethyl alcohol을 1:2:1.7의 비율로 혼합하여 제조하였다. 전배양한 정액 20 μ l에 염색액 20 μ l을 동량 첨가하여 38 $^{\circ}$ C에서 1분간 정착한 후 도말건조하였다. 침체의 평가는 처리당 2개의 도말 표본을 만들어 600 \times phase contrast 현미경하에서 200개의 정자를 평가하였다.

(2) 이중염색법

정자 부유액 200 μ l와 BSA이 들어있지 않은 배양액에 녹인 0.2% trypan blue를 동량으로 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 10분간 배양하였다. 배양 후 정자는 BSA가 들어있지 않은 2ml의 배양액으로 희석하고 700g에서 6분간 원심분리하여 상층부는 제거하고 펠렛된 정자를 다시 2ml 배양액에 재부유시켜 다시 원심분리하였다. 이를 다시 1ml의 배양액으로 희석한 후, 10~20 μ l을 취하여 슬라이드에 도말한 후 40 $^{\circ}$ C에서 건조시킨 다음, Giemsa solution으로 30~40분간 염색하였다. 염색된 슬라이드는 증류수로 세척한 다음 건조시킨 후, 발삼으로 커버 글라스를 덮어 도말하였다. 한 표본당 2개의 도말표본을 만들어 한 슬라이드당 200개의 정자를 평가하였다.

(3) 판정

1) Wells-Awa 염색법

침체부위가 진한 분홍색을 띤 정자를 정상침체 정자로 하였으며 침체 소실 정자는 정자 두부가 전체적으로 분홍빛을 띤 정자로 판정하였다.

2) 이중 염색법

정자의 생사는 trypan blue 염색에 의하여 침체 후 단부가 염색되지 않은 정자를 생존정자로 하였고 침체 후반부가 푸른빛으로 염색된 정자를 사멸정자로 판정하였다. 정자의 침체반응 여부는 Giemsa에 의하여 침체부위가 분홍빛으로 염색된 것을 정상정

자로 하였고 정자의 두부가 염색되지 않은 하얀 정자를 침체반응 정자로 하였으며 침체 반응 정자중 살아있는 정자를 진정 침체반응 정자로 판정하였다.

실험성적 및 고찰

1. Wells-Awa 염색법에 의한 정자의 침체반응을

소 동결 용해정자를 caffeine, heparin 및 caffeine-heparin 처리후, 0, 1, 2, 3, 4 시간동안 전배양하여 Wells-Awa 방법에 따라 정자의 침체 반응율을 판정한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Acrosome reacton rates of Korean Native Cattle sperm by the Wells- Awa stain

Treatment	Incubation time (hrs)	AR (%)	Non-AR (%)
Caffeine	0	11.0	89.0
	1	60.7	39.2
	2	66.0	34.0
	3	64.2	35.7
	4	75.7	24.2
Heparin	0	17.0	53.0
	1	12.0	38.0
	2	69.7	30.2
	3	77.2	22.7
	4	81.2	18.7
Caffeine+ heparin	0	13.0	57.0
	1	73.0	27.0
	2	73.5	26.5
	3	80.5	19.5
	4	83.2	16.7

Caffeine 처리후 정자의 침체 반응율은 전배양시간에 따라 0~4시간에 11.0~75.7%로 증가하였고 특히, caffeine 처리 1시간 이후에 매우 높은 침체 반응율을 나타내었으며, 이후 전배양 시간에 따라 약간 증가하는 경향이였다. 정상 침체정자는 0~4시간 전배양하였을 때 59.0~24.2%로 감소하였다.

Heparin 처리후 정자의 침체 반응율은 전배양 0~4시간에 17.0~81.2%로 증가하였고 전배양 시간에 따라 점차 증가하는 것으로 나타났다. 정상 침체 정자는 전배양 시간에 따라 53.0~18.9%로 점차

감소하였다.

Caffeine-heparin 처리후 정자의 침체 반응율은 0~4시간의 전배양 시간에 따라 13.0~83.2% 침체 반응 정자가 증가하였으며 처리후 2시간까지는 비슷하였으나 3시간 이후에는 약간 증가하는 경향이였다. 정상 침체 정자는 전배양 시간에 따라 57.0~17.7%로 감소하였다.

이와 같이 정자의 체외 수정능획득 방법에 따라서 정자의 침체 반응 정자는 60.7~83.2%로나타나 처리방법에 따라 큰 차이가 없는 것으로 생각되어지나, caffeine-heparin 처리에서 약간 높게 나타났다. 또한 정자의 침체 반응율은 세 처리 모두에서 전배양 1시간에 60% 이상 나타났으며 이후 전배양 시간에 따라 약간 상승하는 경향이였다. 이와 같은 결과는 Breuer와 Wells(1977)가 소정자에 난포액을 첨가하여 0~9시간동안 전배양하였을 때 정자의 침체 반응율이 15.6~52.5%였다는 보고와 Chung 등(1988)이 소 정자를 HIS 처리후 6시간 전배양하였을 때 19~44%의 침체 반응을 보고한 결과보다는 매우 높은 성적으로 caffeine, heparin, caffeine-heparin 처리가 수정능획득 유기에 매우 유효한 물질임을 알 수 있었다.

Wells-Awa 염색법은 신속하고 간편하게 정자의 침체 반응율을 판별할수 있고 그 결과가 매우 높게 나타나지만 정자의 생존 여부를 판별할 수 없는 것이 단점으로 나타났다.

2. 이중 염색법에 의한 정자의 침체반응율

소 동결 용해 정자를 caffeine, heparin 및 caffeine-heparin 처리후 0, 1, 2, 3, 4시간별로 전배양한 다음 이중 염색법으로 염색하여 정자의 생존율과 침체 반응율을 판정한 결과는 Table 2와 Fig. 1과 같다.

Caffeine 처리후 정자의 생존율은 대조구(0시간)는 62.2%이었으나 전배양 시간에 따라 39.5~27.2%로 감소하였다. 침체 반응 정자 비율은 대조구 14.3%에서 전배양 시간에 따라 57.2~75.5%로 증가하였으며, 특히 살아있는 정자중에 진정 침체 반응율은 0시간에 13.0%에서 전배양 1시간에 29.2%로 증가하였고 2시간에 20.5%로 약간 감소한 다음 큰 변화가 없었다.

Heparin 처리후 정자의 생존율은 58.6%이었으나

Table 2. Acrosome reaction rates and viability of Korean Native Cattle sperm by the Dual stain

Treatment	Incubation time (hrs)	Viability (%)	Acrosome reaction (%)	TAR* (%)
Caffeine	0	62.2	14.3	3.0
	1	39.5	57.2	29.2
	2	30.3	62.7	20.5
	3	27.2	75.5	22.1
Heparin	4	29.7	66.5	23.6
	0	58.6	12.7	1.5
	1	41.6	71.3	25.0
	2	39.5	64.2	26.6
Caffeine+ heparin	3	37.5	64.1	26.1
	4	35.8	64.8	24.9
	0	60.5	11.0	5.1
	1	32.0	73.8	20.4
Caffeine+ heparin	2	33.0	75.0	22.2
	3	31.0	78.5	26.3
	4	30.1	70.3	20.1

* TAR : True acrosome reaction

전배양 시간에 따라 41.6~35.8%로 감소하였다. 침체 반응 정자 비율은 대조구 12.7%에서 시간이 경과함에 따라 71.3~64.8%로 감소하였고, 살아있는 정자중의 진정 침체 반응율도 전배양 0시간에 11.5%에서 1시간 전배양시 25.0%로 증가하였고, 이후 전배양 시간에 따라 큰 변화가 없었다.

Caffeine-heparin 처리후 정자의 생존율은 60.5%이었으나 전배양 1시간에 32%로 감소하여 이후 4시간까지 큰 변화가 없었다. 침체 반응 정자 비율은 대조구 11.0%에서 전배양 시간에 따라 70.3~73.8%로 매우 높게 증가하였다. 살아있는 정자중 진정 침체 반응율은 대조구에서 5.1%이었으나 전배양 1시간후에 20.4%로 증가하였으며 이후는 비슷한 경향을 나타내었다.

Caffeine, heparin 및 caffeine-heparin 처리에서 정자의 생존율은 처리구 모두에서 30~40%이었으나 caffeine, heparin 처리후 정자의 생존율은 전배양 시간에 따라 약간 감소하는 경향이였고, caffeine-heparin 처리시에는 전배양 시간에 따라 큰 변화가 없었다. 정자의 침체 반응율은 각 처리구마

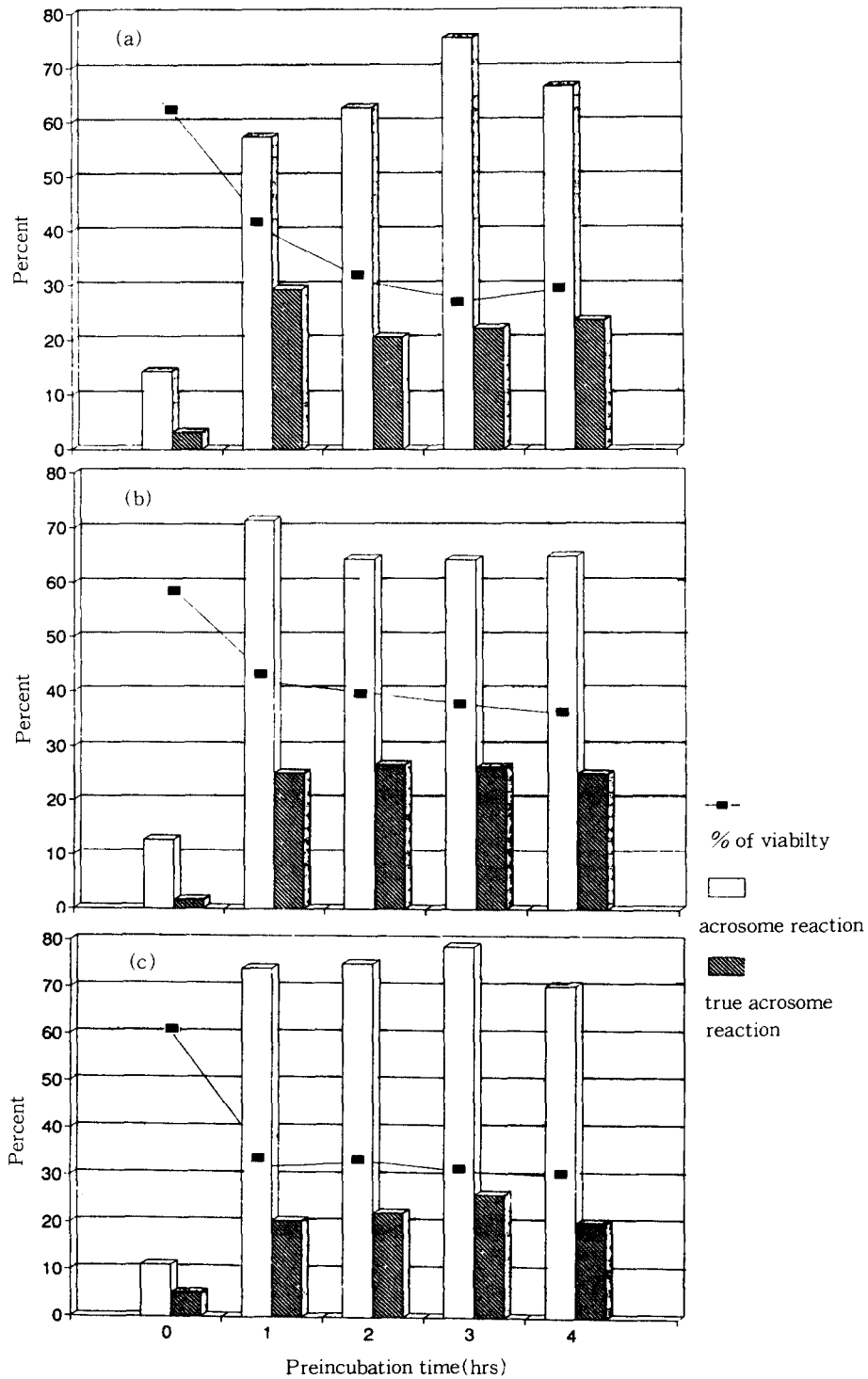


Fig. 1. Changes in percentage of viability and acrosome reaction sperm at various incubation time under caffeine(a), heparin(b) and caffeine-heparin(c) treatment

다 57.2~78.5%로 나타났으며 처리후 전배양 1시간 이후에는 큰 차이가 없었다.

이중 염색법에서 나타난 것과 같이 살아있는 정자중의 진정 침체 반응율이 각 처리후 전배양 1시간 이후에는 일정하게 나타난 것으로 보아 정자 체외 수정의 적기는 처리후 1시간 정도인 것으로 생각된다.

이와 같은 결과는 Parrish등(1985, 1988)이 naphtol yellow S, erythrosin B로 염색하여 나타난 침체 반응율과는 비슷하였으나, 정자의 생존율은 매우 낮았다. 또한 Didion과 Grave(1986)가 진정 침체 반응율이 전배양 6시간에 31.5%로 증가하였다는 결과와 Didion 등(1989)이 dual stain으로 calcium ionophore A23187 처리시 살아있는 정자중 진정 침체 반응 정자의 비율이 2.0~28.2% 증가하였다는 보고와 비슷한 결과를 나타내었다.

Table 1과 2에서 나타난 바와 같이 heparin, caffeine 및 caffeine-heparin 처리후 침체반응 정자는 Wells-Awa 염색법이나 이중 염색법 모두에서 전배양 1시간에 매우 높게 나타났으며 두 염색법 간에는 큰 차이가 없었다. 그러나 Parrish 등(1986)이 heparin 처리에서 좋은 성적을 얻을 수 있다는 보고와 Niwa와 Ohgoda등(1988)이 caffeine 단독 처리보다 caffeine-heparin 병용처리함으로써 침체 반응율이 향상되었다는 결과와는 상이하였다. 그러나 이중 염색법에서 침체 반응 정자중 진정 침체 반응 정자의 비율이 각 처리후 1시간 이후에 20~30%로 감소하여 큰 변화가 없는 것으로 보아 정자 체외 수정능 획득 과정에서 침체 반응이 유기된 정자는 곧 사멸하는 것으로 생각된다. 이와 같이 정자의 cell cycle은 정상 정자에서 수정능 획득 정자로 변하고 이어서 진정 침체 반응 정자로 변한 다음 사멸된다는 Didion 등 (1989)의 결과와 매우 유사하였다.

결 론

한우 동결정자의 체외수정능 획득을 위하여 caffeine, heparin 및 caffeine-heparin을 처리하여 정자의 침체 반응율과 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Wells-Awa와 이중 염색법을 이용하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. Caffeine 처리시 정자의 침체 반응율은 전배양

0-4시간에 Wells-Awa 염색에서는 11.0-75.7%이었고 이중염색에서는 14.3~75.5%이었으며 진정 침체 반응 정자는 3.0~29.2%이었다. 정자의 생존율은 62.2~27.2%이었다.

2. Heparin 처리시 정자의 침체 반응율은 전배양 0~4시간에 Wells-Awa 염색에서는 17.0~81.2%이었고 이중염색에서는 12.7~71.3%이었으며 진정 침체 반응 정자는 1.5~26.6%이었다. 정자의 생존율은 58.6~35.8%이었다.

3. Caffeine-heparin 처리시 정자의 침체 반응율은 전배양 0~4시간에 Wells-Awa 염색에서 13.0~83.2%이었고 이중염색에서는 11.0~78.5%이었으며 진정 침체 반응 정자는 5.1~26.3%이었다. 정자의 생존율은 60.5~30.1%이었다.

참고문헌

- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci., Res. Ser. B 4: 581-586.
- Austin CR, and Bishop MWH 1958. Role of rodent acrosome and perforatorium in fertilization. Proc. R. Soc. Ser. B 149:241-248.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod. 28:717-725.
- Brackett BG, Bousquest D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27:147-158.
- Brackett BG and Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12:260-274.
- Brackett BG, Keefer LL, Troop SG, Donawick WJ and Bennett KA. 1984. Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization. Theriogenology. 21:224.

- Breur DJ and Wells ME. 1977. Effects of *in vitro* incubation of bovine spermatozoa in bovine follicular fluid. J. Anim. Sci., 44:262-265.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes, Nature. 168:697-698.
- Chung YC, Kim CK, Choo IY, Chung KS, Lee KS, Yoon JT and Pang, MG. 1988. Assessment of fertilizing ability of Korean Native Bull by *in vitro* fertilization with bovine follicular oocytes. Genet. Engin. Research. 1 (1):23-29.
- Didion BA, Dobrinsk JR, Giles JR and Graves CN. 1989. Staining procedure to detect viability and true scroosome reaction in spermatozoa of various species. Gamet. Research. 22:51-57.
- Didion BA and Graves CN. 1986. *In vivo* capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrus and diestrus cows. J. Anim. Sci., 62:1029-1033.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K and Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42:114-119.
- Fulka J , Pavlok A and Fulka J. 1982. *In vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes mature in culture. J. Reprod. Fert. 64:495-499.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Nakanishi Y and Ogawa K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryo derived from *in vitro* fertilization of vitro maturation follicular oocytes. J. Reprod. fert. 83:753- 758.
- Graham JK and Foote RH. 1984. *In vitro* fertilization of zona free hamster ova liposome-treated bovine sperm:fertility assay Biol. Reprod. 30(Suppl. 1)112abstr.
- Lambert RD, Sirard MA, Bernard C, Belend R, Rioux JE, Leclec O, Menard DP and Bedoya M. 1986. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. Theriogenology. 25:177-233.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML and First NL. 1983. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. Biol. Reprod. 29:173-179.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology. 30:733-741.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. Theriogenology. 24:537-549.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL , Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 25(4): 591-600
- Parrish JJ, Susko-parrish MA and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38:1171-1180.
- Wells ME and Awa OA. 1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermtozoa. J. Dairy Sci. 53: 227-232.