

Tumor Necrosis Factor-Alpha가 정자운동성에 미치는 직접 영향의 부족

인하대학교 의과대학 산부인과학교실, 순천향대학교 의과대학 비뇨기과학교실*

송은섭 · 임영구 · 송운섭*

The Lack of a Direct Effect of Tumor Necrosis Factor-Alpha on Sperm Motility

Eun-Seop Song, Young-Ku Lim and Yun Seob Song*

Department of Obstetrics and Gynecology Inha University College of Medicine, Incheon, Korea, *Department of Urology, Soonchunhyong University College of Medicine, Seoul, Korea

= Abstract =

Male genital tract inflammatory conditions may be associated with unexplained infertility. The presence of cytokine such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) was reported in the semen of infertile men. However, the effect of these cytokines on human sperm function is still unclear. The purpose of this study was to investigate the in-vitro effects of TNF-alpha on human sperm motility with computer assisted sperm analysis. Washed sperm from 16 normal men were incubated without and with TNF- α (0.1, 10, 1000 ng/ml). The changes of parameters of sperm motility were recorded at different time intervals (0, 5, 24 hour). There was no significant change of parameters of sperm motility in the incubation with TNF- α . It is suggested that TNF- α alone does not interfere with the sperm motility and more studies are needed.

Key Words: Tumor necrosis factor-alpha, Sperm motility

서 론

최근 염증세포들이 불임을 유발하는 기전으로 cytokine의 역할이 제기되었다 (Anderson *et al.*, 1982; Plente *et al.*, 1994). Seminal plasma에서 interleukin-1, interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), Interferon- γ 등의 cytokine을 측정하여 cytokine과 생식력과의 관계를 밝히려는 시도가 이루어지고 있다 (Anderson & Hill, 1988; Hussenet *et al.*, 1993).

남자의 생식기 감염과 비특이적 감염은 설명되지 않는 불임과 관련될 수 있다. 불임 남자군에서의 TNF- α 와 같은 cytokines가 존재함이 알려졌으

며, 남자의 비뇨생식기관에서 유리되는 cytokines는 정자의 기능 및 생식에 영향을 미친다. TNF- α 수치가 높을수록 정자의 운동성이 낮음이 보고되었다 (Gruschwitz *et al.*, 1996). 그러나 이러한 cytokines가 인간의 정자 기능에 미치는 영향의 기전은 아직 잘 알려져 있지 못하다. 남성의 수태력을 결정하는 가장 중요한 단일 요소는 정자의 운동성이며 (Balsco, 1984; Dohlberg, 1988), 최근 컴퓨터 정자분석기의 개발로 정자의 움직임에서 특수한 운동지수의 측정이 가능해져 정자의 운동성 측정이 정밀해졌다 (Barrat *et al.*, 1993). 이에 저자는 TNF- α 가 정자의 운동성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TNF- α 투여 후 정자운동지수의 변화를 조사하였다.

대상 및 방법

1997년 1월부터 1997년 12월까지 인하대병원 산부인과를 방문한 환자의 배우자 중에서 가임력이 확인된 남자 16명으로부터 정액을 얻어 Ham's F10 (Gibco, Grand island, NY)에서 배양하였으며, 'swim up' 기법을 사용하여 운동성이 우수한 정자를 이용하였다. 정자의 운동성은 Hamilton-Thorne사의 컴퓨터 정자검사기를 이용하여 평균속도 (average path velocity; VAP), 두상변위 (amplitude of lateral head displacement; ALH), 진동수 (beat cross frequency; BCF) 등의 운동지수를 측정하였다. 배양 전의 운동지수를 기준으로 하여 5시간 및 24시간 배양 후 운동지수는 배양 전의 운동지수의 백분율로 나타내었다. 정자의 숫자가 10^6 /

ml 되도록 하여 준비하여 배양액을 plate의 2개의 well에 0.1 ml씩 넣었고, human recombinant tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)를 구입하여 (R & D Systems, Minneapolis, MN), TNF- α 투여군에는 TNF- α 를 1000 ng/ml, 10 ng/ml, 0.1 ng/ml의 농도가 되도록 배양액에 투여하였다. 대조군과 TNF- α 투여군으로 준비된 배양판을 5% CO₂의 습도가 맞춰진 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 대조군과 TNF- α 투여군에서 컴퓨터 정자분석기를 이용하여 5시간제 및 24시간제에 정자의 운동지수를 측정하였다. 결과의 분석에서 변화의 비교는 t test를 이용하였다.

결 과

1. VAP

5시간제 대조군의 VAP 값 (평균±표준편차, %) 72 ± 10.4 와 비교한 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml, TNF- α 0.1 ng/ml 투여 후 5시간제의 VAP 값은 71 ± 10.0 , 61 ± 16.8 , 71 ± 16.1 이었고, 24시간제 대조군의 VAP 값 33 ± 5.4 와 비교한 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml, TNF- α 0.1 ng/ml 투여 후 24시간제의 VAP 값은 34 ± 8.2 , 33 ± 8.3 , 30 ± 3.8 이었다. 대조군과 비교하여 TNF- α 투여 후 VAP 값은 유의한 차이가 없었다 (Figure 1).

2. ALH

5시간제 대조군의 ALH 값 (평균±표준편차, %) 98 ± 17.4 와 비교한 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α

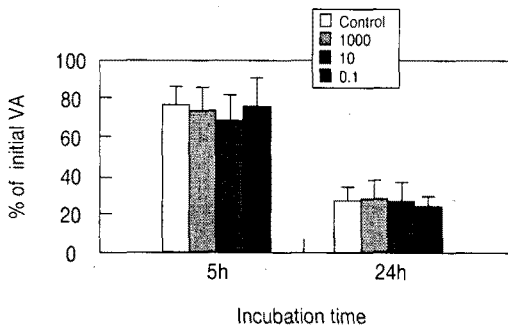


Figure 1. The comparison of sperm average path velocity between control and TNF- α administered group during 5 hour and 24 hour incubation period.

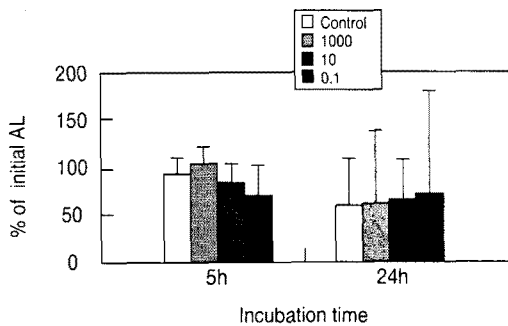


Figure 2. The comparison of sperm amplitude of lateral head displacement between control and TNF- α administered group during 5 hour and 24 hour incubation period.

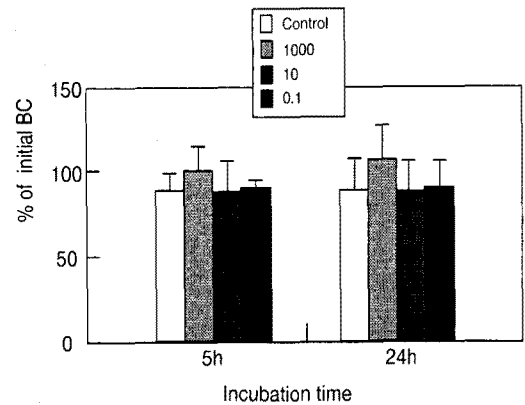


Figure 3. The comparison of sperm beat across frequency between control and TNF- α administered group during 5 hour and 24 hour incubation period.

10 ng/ml, TNF- α 0.1 ng/ml 투여 후 5시간째의 ALH 값은 108 ± 25.4 , 90 ± 18.5 , 79 ± 25.9 이었고, 24시간째 대조군의 ALH 값 55 ± 59.1 과 비교한 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml, TNF- α 0.1 ng/ml 투여 후 24시간째의 ALH 값은 57 ± 95.2 , 67 ± 51.6 , 70 ± 114.7 이었다. 대조군과 비교하여 TNF- α 투여 후 ALH 값은 유의한 차이가 없었다 (Figure 2).

3. BCF

5시간째 대조군의 BCF 값 (평균 \pm 표준편차, %) 88 ± 10.3 과 비교한 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml, TNF- α 0.1 ng/ml 투여 후 5시간째의 BCF 값은 99 ± 13.2 , 88 ± 16.3 , 90 ± 8.0 이었고, 24시간째 대조군의 BCF 값 87 ± 19.4 와 비교한 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml, TNF- α 0.1 ng/ml 투여 후 24시간째의 BCF 값은 97 ± 29.0 , 82 ± 25.4 , 83 ± 25.5 이었다. 대조군과 비교하여 TNF- α 투여 후 BCF 값은 유의한 차이가 없었다 (Figure 3).

고 찰

세균만이 아니라 세균에 의한 정세관 상피의 손상 및 부고한 폐쇄 등이 동반되어야 감염에 의한 남성불임의 원인으로 받아들여져 왔으나 (McConnell, 1987), 세균만에 의한 정자의 운동성의 감소가 *in vitro* 실험에서 관찰된다 (Taegue *et al.*, 1971). 백혈구의 존재 및 백혈구로 인하여 유리되는 물질들에 의하여 정자의 운동성의 저하가 제기되고 있다 (McConnell, 1987; Taegue *et al.*, 1971). 골반내 장기의 기계적인 이상이 없는 상태에서 자궁내막증이 동반된 불임여성의 경우, 골반 내에서 발견되는 복수삼출액에는 백혈구의 수와 백혈구의 분비물질이 증가되어 있고, 이러한 복수삼출액이 여성에서의 출산저하와 관련되며, 세포성분이 제외된 복수삼출액에서도 정자운동성이 저하됨이 보고되었다 (Oak *et al.*, 1985; Burke, 1987; Soldati *et al.*, 1989; Eisenmann *et al.*, 1989). 백혈구가 제외되어도 백혈구에 의해 분비되어 증가되어 있는 물질만에 의해서도 정자의 운동성이 저하됨을 알 수 있다.

염증이나 자가면역, 감염 등에 의하여 정로 면역세포들은 hydrogen peroxide나 reactive oxygen, nitrogen intermediates 등과 같은 비특이적 독성물질을 유리하고, 이들 유리물질에 정자가 노출되

면 정자의 기능에 이상을 가져와 생식기능을 저하시킨다고 알려져 왔으나, 최근 염증세포들이 불임을 유발하는 기전으로 cytokine의 역할이 제기되었다 (Anderson *et al.*, 1982; Plente *et al.*, 1994). 최근 seminal plasma에서 IL-1, IL-2, TNF, IFN- γ 등의 cytokines을 측정하여 cytokine과 생식력과의 관계를 밝히려는 시도가 이루어지고 있다 (Anderson & Hill, 1988; Husenet *et al.*, 1993).

불임남성의 정액에서 관찰되는 염증세포의 증가는 정로에 풍부한 세포면역이 존재함을 의미하며, 정액내의 면역학적 물질들은 정자의 운동성 감소와 연관된다 (Anderson, 1990). 정액내 백혈구가 증가되어 있는 불임군에서 interleukin-2와 interleukin-8의 값이 높았다는 보고가 있으며 (Shimoya *et al.*, 1993; Sikka *et al.*, 1995), 정자가 TNF에 의하여 정자운동성의 장애가 발생한다는 보고도 있고 (Hill *et al.*, 1987; Hill *et al.*, 1989; Anderson, 1990), TNF를 정자와 함께 배양하면 정자의 운동성이 저하되며, 이 경우 항TNF 항체를 배양액에 투여하면 운동성 저하가 다시 회복되었다는 보고도 있다 (McConnell, 1987; Eisermann *et al.*, 1988; Berkowitz *et al.*, 1988). 그러나 Haney 등 (Haney *et al.*, 1992)과 Fedder와 Ellermann-Eriksen (Fedder & Ellermann-Eriksen, 1995)은 TNF- α 는 정자의 운동성에 영향을 미치지 못하였다고 보고하여, cytokines와 같은 염증인자에 대한 연구는 면역학적 원인으로 야기된 생식력 저하의 해결에 중요하지만 cytokine이 정자의 운동성에 미치는 영향은 아직 확실하지 않다.

남성의 수태력을 결정하는 가장 중요한 단일 요소는 정자의 운동성이다 (Balsco, 1984; Dohlberg, 1988). 최근 컴퓨터 정자분석기의 개발로 정자의 움직임에서 평균속도 (average path velocity; VAP), 두상변위 (amplitude of lateral head displacement; ALH) 및 진동수 (beat cross frequency, BCF) 등의 특수한 운동지수의 측정이 가능해져 정자의 운동성 측정이 정밀해졌다 (Barratt *et al.*, 1993). Swim up 기법은 시험관 아기 프로그램에 있어서 우수한 운동성을 가진 정자의 분획을 얻는데 유용하므로 본 연구에서의 정자의 운동성에 대한 cytokine의 영향을 조사하는데 이용되었다. 투여되는 TNF- α 의 농도는 Haney 등 (Haney *et al.*, 1992)과 Fedder와 Ellermann-Eriksen (Fedder & Ellermann-Eriksen, 1995)의 연구를 참고하여 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml 및 TNF- α 0.1 ng/ml 세가지

다른 농도로 하여 농도 차이에 따른 정자운동성의 변화를 보았으며 정자의 배양은 24시간 시행하였다.

본 연구에서 TNF- α 1000 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml 및 TNF- α 0.1 ng/ml 세 가지 다른 농도로 투여 후 5시간제와 24시간제인 군에서 정자운동지수들의 유의한 감소가 일어나지 않아 TNF- α 투여는 정자의 운동성에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. Cytokine은 동일한 cytokine이 여러 다른 세포에 각기 다른 작용을 하거나 서로 다른 cytokine 들이 동일한 세포에 유사하게 작용하며 혹은 서로 다른 cytokine이 상승작용 또는 길항작용 등을 다양하게 나타낸다. 그러므로 한 가지 종류의 cytokine을 투여 후 투여된 cytokine에 의한 영향을 알아보는 것은 어려움이 있을 것으로 생각된다. 그러므로 많은 대상인원, 다른 cytokines와의 복합투여와 장시간 배양 등의 연구가 더 필요할 것으로 생각되며 이러한 시도를 통하여 cytokine이 정자의 운동성에 미치는 영향이 밝혀지면 면역학적 원인으로 야기된 생식력 저하의 해결에 많은 희망을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

정자의 운동성에 영향을 줄 수 있는 것으로 예측되는 TNF- α 를 정자에 투여하여 TNF- α 가 정자의 운동지수를 변화시킬 수 있는지를 조사한 바, TNF- α 투여 후 정자운동성의 변화는 관찰되지 않았다. 이상에서 TNF- α 는 정자의 운동성에 변화를 단독으로 설명하기에는 불충분할 것으로 생각되며, 많은 대상인원, 다른 cytokines와의 복합투여와 장시간 배양 등에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

- Anderson DJ, et al: Immunity to tumor associated antigens in vasectomized men. *J Natl Cancer Inst* 1992, 66, 551-554.
- Anderson DJ, Hill JA: Cell-mediated immunity in infertility. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988, 17, 22-25.
- Anderson DJ: Cell-mediated immunity and inflammatory processes in male infertility. *Arch Immunol Ther Exp* 1990, 38, 79-83.
- Balsco L: Clinical tests of sperm fertilizing ability. *Fertil Steril* 1984, 41,177-81.
- Barratt CLR, Tomlinson MJ, Cooke ID: Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertil Steril* 1993, 60, 520-5.
- Berkowitz RS, Hill JA, Kurts CB, Anderson DJ: Effect of products of activated leukocyte (lymphokines and monokines) on the growth of malignant trophoblast cells in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1988, 158, 199-203.
- Burke RK: Effect of peritoneal washings from women with endometriosis on sperm velocity. *J Reprod Med* 1987, 32, 743-6.
- Dohlberg B: Sperm motility infertile men and males in infertile units: In vitro test. *Arch Androl* 1988, 20, 509-13.
- Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odemm RR, Colins JL: Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* 1988, 50, 573-9.
- Eisermann J, Register KB, Strickler RC, Collins JL: The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro. *J Androl* 1989, 10, 270-4.
- Fedder J, Ellermann-Eriksen S: Effect of cytokines on sperm motility and ionophore-stimulated acrosome reaction. *Arch Androl* 1995, 35, 173-185.
- Gruschwitz MS, Brezinschek R, Brezinschek HP: Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males. *J Androl* 1996, 17, 158-63.
- Haney AF, Hughes SF, Weinberg JB: The lack of effect of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1-alpha, and interferon-gamma on human sperm motility in vitro. *J Androl* 1992, 13, 249-53.
- Hill JA, et al: Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril* 1987, 47, 460-463.
- Hill JA, Cohen J, Anderson DJ: The effects of lymphokines and monokines on human fertilizing ability in the zona-free hamster egg penetration test. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 160, 1154-1158.
- Hussenet F, et al: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 in normal and infected human seminal fluid. *Hum Reprod* 1993, 8, 409-412.

- McConnell JD: The role of infection in male infertility. *Prob Urol* 1987, 1, 467-470.
- Oak MK, Chantler EN, VaughaniWilliams CA, Elstein M: Sperm survival studies in peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and unexplained infertility. *Clin Reprod Fertil* 1985, 3, 297-303.
- Plente M, de Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect sperm motility. *Fertil Steril* 1994, 62, 387-392.
- Shimoya K, Taniguchi T, Matsuzaki N, Saji F, Tsutsui T, Tanizawa O: Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leukospermia. *Fertil Steril* 1993, 59, 885-8.
- Sikka S, Rajasekaran M, Hellstrom W: Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. *J Urol* 1995, 153, 500A.
- Soldati G, Piffaretti-Yanez A, Campana A, Marchini M, Luerti M, Balerna M: Effect of peritoneal fluid on sperm motility and velocity distribution using objective measurements. *Fertil Steril* 1989, 52, 113-9.
- Teague NS, Boyarsky S, Glenn GF: Interference of human sperm motility by *Escherichia coli*. *Fertil Steril* 1971, 22, 281-286.
-