

정자활성물질의 첨가가 한우난자의 체외수정율에 미치는 영향

I. 동결-융해 한우정자의 운동성과 생존성에 미치는 영향

김계성 · 김정태* · 이병천** · 황우석*

미국 펜실베이니아대학교 메디칼센터

Effects of Sperm Activators on Sperm Penetration of Hanwoo Oocytes Following *In Vitro* Insemination

I. Effects of Sperm Activators on Motility and Viability of Frozen-thawed Hanwoo Sperm

K. S. Kim, J. T. Kim, B. C. Lee[†] and W. S. Hwang

University of Pennsylvania Medical Center,

Center for Research on Reproduction and Women's Health, PA19104, U.S.A.

SUMMARY

These experiments were conducted to examine the effects of theophylline, pentoxifylline and heparin on frozen-thawed Hanwoo sperm for enhancing motility and viability of sperm.

Frozen-thawed semen collected from one bull was treated in TALP(tyrode-albuminlactate-pyruvate) containing various concentrations of theophylline and pentoxifylline. After incubated at 5% CO₂ in air atmosphere for 6 hours, the motility of sperm after the treatments was characterized by CASA(computer aided semen analysis) system. When monitored motility(MOT) and curvilinear velocity(VCL), theophylline and pentoxifylline exerted their optimal action at the concentration of 30 mM and 3 mM, respectively. No difference of sperm motility was observed when the sperm was treated with both substances compared with a single treatment of each substance. Comparison was then made for evaluating the effect of theophylline and /or pentoxifylline on the motility and viability of sperm and heparin was also examined with such substances. Although there were no significant treatment effects of each substance, high MOT and VCL values were detected in sperm treated with theophylline. In the case of sperm viability examined by an eosin-nigrosin staining, however, a significant decrease was found after the combined treatment of theophylline+pentoxifylline than after the treatment with heparin alone or no treatment(P<0.05). In conclusion, theophylline, pentoxifylline or heparin can be used for enhancing the motional characteristics and viability of frozen thawed Hanwoo semen. Considering characteristics of these substances, theophylline may be useful in the artificial

이 연구는 서울대학교 발전기금 학술연구비의 지원에 의해 수행되었음

*서울대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Seoul National University)

[†] Correspondence

insemination system, which requires vigorous sperm motility. While, heparin supporting sperm viability *in vitro* can be effectively used for improving *in vitro*-fertilization system.

(Key words : theophylline, pentoxifylline, heparin, motional characteristics, viability)

서 론

수정능 획득 현상은 Austin(1951)과 Chang(1951)에 의해서 최초로 보고되었으며 이들은 정자가 난자에 침입하기 위해서는 일정한 시간동안 암컷의 생식도 내에서 머물러야 한다고 보고하였고, Iritani와 Niwa(1977)는 소의 정자를 살아있는 토끼의 생식도관 내에서 수정능 획득을 유발시켜 분리하는데 성공하였다.

이러한 변화를 체외에서 일으키는데 필요한 정자활성물질로는 caffeine(Niwa 등, 1989), theophylline(Homonnai 등, 1976), heparin(Valencia 등, 1984), pentoxifylline(Morales 등, 1993), 2'-deoxyadenosine(Maxwell 등, 1995), kallikrein(Makler 등, 1980) 및 cAMP(Jaiswal 등, 1996) 등이 존재하며, 이 중 heparin은 glycosaminoglycan의 일종으로 자궁(Wincek 등, 1979), 난관(Stambaugh 등, 1980), 난포액(Grimek 등, 1984) 그리고 난구(Epigge 등, 1981)를 포함한 암컷의 생식도 내에서 분비되고 존재한다. 정자활성물질 중 theophylline은 methyl xanthine derivative의 일종으로 phosphodiesterase의 작용을 억제하여 정자내의 cyclic AMP를 증가시킨다(Loughlin 등, 1992). 정자활성물질 중 pentoxifylline은 3,7-dihydro-3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-1H-purine-2,6-dione으로, 일반적으로 Trental로 알려져 있고 말초 혈관질환의 치료제로 사용되며 정자에의 작용은 theophylline과 유사하다(Morales 등, 1993). 1989년 Niwa 등은 동결-융해 정액을 caffeine과 heparin이 첨가된 배지에서 미리 배양을 시키면 배양시키지 않은 정자에 비해서 유의적으로 난자로의 침입 빈도가 높았음을 밝혔다. 또한 theophylline 첨가 후 사람의 사출정액의 운동성 변화(Homonnai 등, 1976)와 자궁경 질 부위로의 인공수정 시 수태율을 비교하는 실험(Harrison 등, 1978)도 있었으며 가끔에서 caffeine의 식이성 섭취가 고환에 미치는 영향에 대한 연구가 수행되었다(Ax 등, 1976). 정자활성물질 중

heparin은 사람정자에 관하여는 수정능 획득에 미치는 영향(Valencia 등, 1984), 체외에서 난자의 분할률과 정자의 침체반응에 미치는 영향(Boyers 등, 1987)에 관한 실험 등이 행하여졌다.

이상에서와 같이 정자활성물질에 관한 많은 연구가 있었지만 theophylline과 pentoxifylline의 최적농도의 범위와 효과에 대해서는 학자들간에 이견이 있는 실정이다(Jaiswal 등, 1996; Loughlin 등, 1992; Fornes 등, 1993; Morales 등, 1993; Mbizvo 등, 1993; Sikka 등, 1991). 이에 본 실험에서는 정자활성물질로 사용되어지고 있는 theophylline, pentoxifylline 및 heparin의 동결융해 한우정자에 대한 효과를 검토하였다.

이를 위하여 theophylline, pentoxifylline 및 theophylline과 pentoxifylline합제의 최적사용농도를 알아보고, 최적농도의 정자활성물질로 처리된 동결정자의 운동성과 생존성 등을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 정자의 준비

실험에 공여된 한우정액은 축산업협동조합중앙회 한우개량사업본부의 종모우에서 동 사업소의 방법에 의해 채취 및 동결보존된 정액으로서, 실험에 공여 시까지 액체질소에 보관하였다.

한우정액의 융해는 37℃ 수조에서 straw를 30초간 진탕 융해시키는 급속융해법을 채택하였으며 급속융해 후 straw에 담겨있는 정액은 5 ml tube에 옮겨 밀봉한 후 37℃ 수조에 배양시키며 분석하였다. 정액은 희석시키거나 동결보호제를 제거하지 않은 상태로 실험에 공여하였다.

2. 정자활성물질의 최적 농도 결정

1) 정자활성물질이 첨가된 배지의 작성

정자활성물질이 첨가된 배지는 Fukui(1990)의 방법에 준하여 capacitation tyrode-albumin-lactate-pyruvate(TALP)로 작성하되 정자활성물질

첨가 후, 삼투압의 상승을 방지하기 위해 NaCl을 제외하였다. 작성된 배지를 15 ml tube에 분주하고 theophylline은 각각 20, 40, 60 및 80 mM이 되도록 첨가하여 정액과 1:1로 혼합 시 최종농도가 10, 20, 30, 40 mM(Jaiswal 등, 1996; Loughlin 등, 1992; Fornes 등, 1993)로 정자에 적용되도록 하였다. 정자활성물질 중 pentoxifylline은 2, 6, 10 및 20 mM이 되도록 첨가하여 정액과 1:1로 혼합 시 1, 3, 5 및 10 mM (Morales 등, 1993; Mbizvo 등, 1993; Sikka 등, 1991)이 최종농도로 적용되도록 하였다. 정자활성물질 중 theophylline과 pentoxifylline의 합제는 각각 120+12, 120+4 및 20+12가 되도록 첨가하여 정액과 1:1로 혼합시 최종농도가 60+6, 60+2 및 10+6(Loughlin 등, 1992; Mbizvo 등, 1993)이 최종농도로 적용되도록 하였다. 모든 배지는 작성 후 NaCl을 첨가하여 삼투압을 270 mOsm로, HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 7.4로 조정하였다.

2) 정액분석의 기준

정액의 분석시 각 운동특성의 정의, 단위, 정액자 동분석기의 기준, 측정항목 및 원리는 Davis(1992), Farrell(1996) 및 이 등(1997)의 사항에 준하였다.

정자의 운동성 특성은 위상차 현미경(Olympus BX-50, Japan)과 CCD 카메라(Toshiba, Japan)를 통해 연결된 국내 Medical Supply사(sperm image analyse system, SIAS) 장치로 분석하였다. 정액의 운동특성 분석시 대물렌즈의 배율은 10×로, CCD 카메라의 렌즈는 3.3×로 하였으며, Makler counting chamber(Sefi medical, Israel)상의 정 가운데 0.01 mm²의 정사각형을 프로그램상의 크기 기준에 일치시켜 계산되는 모든 수치의 기준으로 설정하였다.

정액자동분석기는 실험 전에 일정한 크기와 수가 고정되어 있는 accu-bead[®](Hamilton Thorne research, USA)를 사용하여 측정된 수가 제조자의 오차 한계 허용범위내(18 M/ml, between 15.5 and 20.5 M/ml; 35 M/ml, between 30 and 40 M/ml)로 되도록 설정하였다.

본 실험에 사용된 SIAS기종의 초기 설정치는 Table 1과 같다. 분석시 영상처리는 초당 30 frame

Table 1. Parameter settings used with semen analysis imaging system

System parameter	Value
Image sampling frequency (frame /s)	30
Duration of image capture(s)	1
Minimum motile speed(μm/s)	VSL 10
Maximum motile speed(μm/s)	VSL 250
Maximum countable number (sperm)	400
Maximum countable frame	10

VSL; straight line velocity.

이었고, 정자의 속도는 두부가 1초에 최소한 10μm 이상을 움직인 경우 운동성이 있는 것으로 정의하였다. 또한 정자의 최대속도는 250μm/sec로 정의하였다. 한 시야에서 최대 측정가능한 정자의 수는 400개 였으며, 한 시료를 10 개의 시야(field)까지 분석할 수 있었다. 정자의 두부 크기는 15~80개의 화소로 정의하였다.

정액분석시 현미경 stage 위에 장착된 Makler counting chamber 내부의 정액의 온도를 37℃로 유지시키기 위해 micro-warm plate(Kitazato, Japan)를 설치하거나 현미경의 stage 전체의 온도를 유지해 주는 Microscope warm stage(LEC instrument, Australia)를 사용하였으며, 현미경의 광원에 의한 온도상승은 1℃ 이하로 하였다.

시료의 분석은 이 등(1997), Davis와 Katz(1992)의 방법에 준하여 실시하였으며 검사정보 입력시 정액량은 0.5 ml(0.5 ml /straw)으로, debris rate는 0%로 하였다. 분석시 이물질이 정자로 오인되는 것을 방지하기 위해 화면상에서 실제 정자의 영상과 이진영상을 반복하여 비교하며 이진영상의 밝기와 대비를 세밀히 조절하였다. 또한 필요시에는 입력된 자료의 곡선이동경로와 평균이동경로를 확인하여 실제 정자만이 인식되었는지를 확인하였다. 정액(5μl)은 미리 가온되어 37℃로 유지된 Makler counting chamber에 넣은 후 시야 당 1초씩 5~10 개의 시야를 선택하여 시스템에 입력시켜, 1시야가 1초 노출되는 동안 30 frame을 분석하여 평균치를 계산하였다. 측정시 사용된 Makler counting chamber는 시료의 깊이가 10μm로 고정된 것이었다. 시

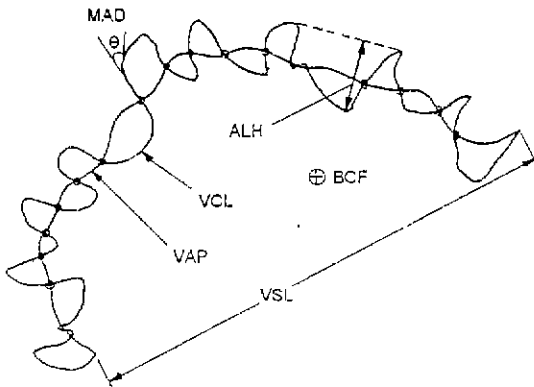


Fig. 1. Traditional measures of sperm-head swimming trajectory pattern and vigor. VCL = curvilinear velocity($\mu\text{m}/\text{sec}$); VSL = straightline velocity($\mu\text{m}/\text{sec}$); VAP = average pathway velocity($\mu\text{m}/\text{sec}$); ALH = amplitude of lateral head displacement; BCF = beat-cross frequency; MAD = mean angular displacement.

표는 운동특성의 측정시 vortex mixer로 충분히 섞었다. 모든 시료의 분석은 동일한 조건과 숙련된 2인의 실험자가 실시하였다. 한우동결정액을 용해 0, 10, 30, 60, 120 및 180분 후 각각의 운동특성을 측정하여 컴퓨터에 저장하였으며, 일련의 분석이 끝나면 저장된 자료를 분석하였다.

정액자동분석기에 의해 분석되는 정자 각각의 운동특성은 Fig. 1과 같다. 정자의 실제이동경로인 곡선경로속도(curvilinear velocity; VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), 곡선이동경로에 대한 평균 이동을 나타내는 평균경로속도(average-path velocity; VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$), 단위 시간당 시점에서 종점까지의 속도를 나타내는 직선경로속도(straight line velocity; VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$),

평균이동경로와 실제이동경로와의 측방거리차인 측정 거리(amplitude of lateral head displacement; ALH, μm), 정자 두부의 이동시 회전각의 절대값(mean angular degree; MAD, degree) 및 실제이동경로가 평균이동경로와 만나는 횟수의 시간당 비율(beat-cross frequency; BCF, Hz)을 측정하였으며, 정자의 이동궤도에 따른 이들의 정의를 정하였다.

또한 자동정액분석기는 상기에 언급한 운동특성들을 바탕으로 곡선경로 선형도(linearity; LIN, %), 평균경로선형도(straightness; STR, %), 곡선전진율 값으로 wobble(WOB, %), 정자운동 모양의 값으로 dance(DNC) 및 dancemean(DNM, μm)를 그리고 80 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 이상의 VCL, 6.5 μm 이상의 ALH 및 65% 이하의 LIN로 정의되는 고탈력 정자(hyperactivated sperm; HYP, %)의 요소를 계산하였을 뿐만 아니라 정자의 농도(concentration; CON, million/ml) 및 운동성(motility; MOT, %)을 측정하였다. 이들의 정의는 Table 2와 같다.

3) 정액의 분석

실험 하루 전에 6 ml tube(Becton and Dickinson Co., USA)에 각각의 정자활성물질이 포함된 배지를 각각 100 μl 씩 분주한 후 CO_2 배양기 내에서 평형시켰다. 동결정액은 실험 전에 37 $^{\circ}\text{C}$ 온수에서 30 초간 급속법으로 용해한 후, 6 ml tube 에서 혼합하였다. 혼합된 정액은 전날 준비해둔 배지에 각각 100 μl 씩 분주하여 정액과 1:1비율로 혼합한 후, CO_2 배양기내에 정치시키면서 30분, 3 및 6시간 경과 후 CASA system을 이용하여 분석하고 CASA의 parameter중 정자운동성의 지표가 되는 mo-

Table 2. Effects of pentoxifylline on the kinematic parameters of frozen-thawed semen

Parameters	Before incubation	Pentoxifylline concentration(mM)*				
		0	1	3	5	10
MOT(%)	50.89	16.67	28.62	46.38	41.23	40.18
VCL($\mu\text{m}/\text{s}$)	63.24	35.56	36.72	49.95	38.66	39.22
VSL($\mu\text{m}/\text{s}$)	34.78	11.55	18.42	28.47	29.50	24.14
VAP($\mu\text{m}/\text{s}$)	41.21	15.67	23.12	32.15	30.17	28.15

* Estimated 6 hrs after incubation.

tility(MOT)와 체외수정률과 가장 연관성이 있는 curvilinear velocity(VCL)등을 검사하여(이 등, 1998) 각 정자활성물질의 최적농도를 구하였다.

3. 각각의 정자활성물질이 정자의 운동성과 생존성에 미치는 영향

1) 정자활성물질이 첨가된 배지의 작성

정자활성물질을 첨가할 배지는 capacitation TALP로서 Fukui(1990)의 방법에 준하여 작성하되 실험 1의 결과에서 얻어진 최적농도를 기본으로 배지를 작성하였다. 정자활성물질 중 theophylline은 60 mM로 pentoxifylline은 6 mM로 theophylline과 pentoxifylline의 합제(theophylline + pentoxifylline)는 각각 60과 6 mM이 포함되도록 만들었으며, heparin은 일반적으로 사용하던 농도인 200 µg/ml(신 등, 1991; 황 등, 1997; Gliedt 등, 1996)로 작성하였다. 정자활성물질이 포함된 배지는 정액과 1:1로 혼합 시 각 정자활성물질이 30, 3, (30+3) mM, 100 µg/ml의 농도가 정자에 적용되도록 하였다.

2) Computer Aided Semen Analysis(CASA)을 이용한 분석

컴퓨터 정액분석기에 의한 검사는 1, 2)의 방법과 동일하게 실시하고 동일한 시간에 정액을 도달하여 eosin-nigrosin 염색(Sharma 등, 1997)을 실시하여 정자의 viability를 구하였다.

4. 통계학적 분석

각각의 정자활성물질이 정자의 운동성과 생존성에 미치는 영향에 관한 실험의 결과는 ANOVA를 통하여 검정하였다. 유의수준은 0.05로 판단하였으며 통계 패키지는 SAS(version 6.04)를 사용하였다.

결 과

1. 정자활성물질의 최적농도 결정

각 농도의 pentoxifylline이 포함된 TALP와 정액을 배양한 후, 6시간 경과시 CASA를 이용한 정자의 운동특성 측정 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 3 mM 농도에서 MOT와 VCL 및 VAP가 각각 46.38%와 49.95 µm/s 및 32.15 µm/s로 최대치의 결과를 보였다.

각 농도의 theophylline이 포함된 TALP와 정액을 배양한 후 6시간 경과 시 CASA를 이용한 정액의 분석결과는 Table 3과 같이 30 mM농도에서 MOT와 VCL 및 VSL이 각각 23.26%와 30.32 µm/s 및 24.25 µm/s로 최대치의 결과를 나타내었다.

각 농도의 theophylline과 pentoxifylline의 합제가 포함된 TALP와 정액을 배양한 후 6시간 경과 시 CASA를 이용한 정액의 분석결과는 Table 4와 같이 (6+60) mM농도에서 MOT와 VCL이 각각 11.44%와 39.52 µm/s로 최대치의 결과를 나타내었다.

Table 4. Effects of pentoxifylline(P) and theophylline(T) on Hanwoo sperm motility and motion kinematics

Parameters	P + T (mM)*		
	2 + 60	6 + 60	6 + 10
MOT(%)	9.27	11.44	10.35
VCL(µm/s)	37.35	39.52	36.25
VSL(µm/s)	18.24	20.34	21.78
VAP(µm/s)	28.26	25.24	23.48

* Estimated 6 hrs after incubation.

Table 3. Effects of theophylline on the kinematic parameters of frozen-thawed semen

Parameters	Before incubation	Theophylline concentration(mM)*				
		0	10	20	30	40
MOT(%)	49.87	11.84	14.38	15.79	23.26	21.88
VCL(µm/s)	64.12	24.8	27.07	28.84	30.32	26.45
VSL(µm/s)	33.65	8.47	15.34	16.27	24.25	22.56
VAP(µm/s)	40.22	12.28	20.74	22.38	30.84	31.65

* Estimated 6 hrs after incubation.

2. 각각의 정자활성물질이 정자의 운동성과 생존성에 미치는 영향

정자활성물질의 최적농도를 구하기 위한 실험의 결과 선정된 최적농도의 정자활성 물질과 기존에 일반적으로 사용하던 농도의 heparin, 그리고 대조군으로 정자활성물질이 포함되지 않은 정액의 배양 시간대별 검사결과는 Table 5와 같다. 배양 전 시간대에 걸쳐 MOT와 VCL은 정자활성물질의 처리에 따른 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 theophylline 처리군에서 가장 높은 수치를 나타내었다. 생존율의 경우 각각의 물질의 단독처리효과는 측정 시간대의 전역에서 유의적으로 나타나지 않았다. 그러나 처리 후 3 및 6 시간 경과시의 측정치에서 heparin 처리군과 대조군이 pentoxifylline과 theophylline 합계에 비해서 유의적으로 높은 효과를 보였다.

고 찰

포유동물의 정자는 사출 후 암컷의 생식도를 통과하면서 수정능을 획득한다. 수정능획득이란 침체 반응을 준비하기 위한 정자 두부의 원형질막의 변화 및 hyperactivation으로 명명되는 운동성의 변화이다(Yanagimachi, 1989). 그 중요한 단계로 peripheral glycoproteins의 점진적인 제거와 변

형, integral glycoproteins의 재배열, membrane cholesterol의 환원 및 특정 membrane phospholipid의 조성과 분포의 변화를 들 수 있다(Gordon, 1994).

본 실험에서는 정자의 이러한 변화를 체외에서 일으키기 위하여 정자활성물질을 사용, 정자의 운동성과 생존성을 검토하였다.

정자활성물질 중 theophylline의 최적농도를 알아보기 위한 실험에서는 각각 20, 40, 60, 그리고 80 mM 농도의 theophylline이 함유된 TALP와 대조군으로 theophylline이 첨가되지 않은 TALP를 사용하였으며 배양 6시간 후 CASA를 이용하여 분석을 실시하였다. 분석 결과 30 mM 농도에서 정자의 MOT와 VCL 및 VSL이 최대치를 나타내었다.

이러한 결과는 면양에서 theophylline의 효과를 실험한 Jaiswal(1996) 등의 보고와 일치하지만 사람의 정액에 적용하여 20 mM에서 최대치의 효과를 나타낸 Loughlin(1992)등의 결과와는 상이한 것이며 정상인의 정자에서는 10 mM, 저수태능의 사람에서 20 mM의 농도가 최고의 효과를 보였던 Chan(1983)의 결과와도 상이하였다. 이는 종간의 차이, 또는 정자활성물질을 적용한 방법상의 차이로 추측된다. 소에 대한 연구보고는 접할 수 없어 직접 비교할 수 없었다. Loughlin(1992)은 theophylline이 정자의 운동성 증가뿐 아니라 투명대 제거 hamster 난자로의 침입률도 향상시켰다고 보

Table 5. Effects of sperm activators on motility(MOT), curvilinear velocity(VCL) and viability* of frozen-thawed sperm

Parameters		Control	Heparin	Pentoxifylline	Theophylline	Pentoxifylline+
						Theophylline
MOT(%)	0.5hrs	37.73	44.94	50.65	59.77	54.64
	3hrs	21.57	29.83	24.12	34.05	24.80
	6hrs	11.26	14.53	13.09	18.09	11.44
VCL($\mu\text{m}/\text{s}$)	0.5hrs	39.93	43.08	45.84	59.02	55.72
	3hrs	36.58	43.00	37.75	44.98	39.52
	6hrs	24.58	27.38	26.97	30.50	23.76
Viability(%)	0.5hrs	70	68	63	62	57
	3hrs	50 ^a	51 ^{a,b}	29	32	17 ^c
	6hrs	40 ^a	42 ^{a,b}	17	16	12 ^c

* Estimated 0.5, 3 and 6 hrs after incubation.

^{a,b,c} Different superscripts in the same line differ significantly(P<0.05).

고하여 theophylline이 운동성의 증가뿐만 아니라 침체반응에도 작용함을 입증하였다. 정자활성물질 중 theophylline은 세포내 calcium의 이동, cyclic AMP의 세포내 고농도 축적에 의한 phosphodiesterase의 억제 그리고 adenosine 수용체를 방해하는 작용 등이 있다 (Jiang, 1984). 그러나 정자의 운동성을 증가시키는 정확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않으며 세포내의 cyclic AMP의 증가에 의한 것으로 추측되고 있다 (Rzich, 1987). theophylline이 정자의 기능을 향상시키는 기전에 관해서는 추가연구가 수행되어야 될 것으로 생각된다.

정자활성물질 중 pentoxifylline은 methylxanthine유도체로서 phosphodiesterase를 억제하여 cAMP의 파괴를 방지한다. 그 결과 세포내 cAMP가 증가되고 cAMP는 정자의 운동성을 향상시키는 것으로 알려져 있다 (Tash, 1983). 정자활성물질 중 pentoxifylline의 최적농도를 알아보기 위한 실험에서는 정자활성물질을 정액에 첨가하고 배양한 후 6시간 경과시에 CASA를 이용하여 분석하였다. 분석결과 6 mM농도의 pentoxifylline이 첨가된 TALP와 희석한 정액에서 MOT와 VCL 및 VAP가 최대치의 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 Jayaprakash(1997) 등이 보고한 pentoxifylline이 정자의 운동성과 침체반응을 촉진한다는 결과와는 부합하며 동결보존된 사람 정액을 이용한 Mbizvo (1993)의 실험에서의 결과(3 mM)와도 일치하였다. 그러나, 사람 정액을 이용, biggers(1971)의 배지를 사용한 Morales(1993)의 결과와는 상이한 결과를 보였다. 이러한 차이는 TALP배지를 사용한 본 실험과 배지조성간의 상이에 기인한 것으로 사료되며 이에 관하여는 추가연구가 수행되어 원인을 규명하여야 할 것으로 생각된다.

정자의 운동성 및 생존율에 대한 각각의 정자활성물질의 효과를 알아보는 실험에서 운동성의 경우 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았으나 theophylline으로 처리한 정자가 6시간의 배양기간 동안 우수한 경향을 나타내었다. 생존율의 경우 대조군과 비교한 각각의 정자활성물질 단독처리효과는 측정시간대의 전역에서 인정되지 않았다. 단지 3 및 6시간의 측정치에서 대조군과 heparin 처리군이 theophylline과 pentoxifylline의 합제에 비하여 유

의적으로 높은 결과를 나타내었는데 ($P < 0.05$). 이러한 결과로 보아 각각의 물질은 정자활성의 증가에 따른 생존성의 저하를 야기하지는 않지만, theophylline과 pentoxifylline의 합제의 경우 지나치게 고농도의 정자활성물질의 적용으로 인하여 정자에 상해를 입힌 것으로 사료된다. 정자활성물질 중 heparin은 glycosaminoglycan, 일명 GACs로 정자세포막의 생리학적 변화를 촉발시켜서 침체반응을 일으키고 정자의 수정능 획득 및 난자와의 수정에 영향을 미친다 (Wincek, 1979). 자가방사기록법을 사용하여 heparin의 수용체가 정자의 세포막에 존재하며 heparin이 체외에서 수정능 획득의 후반 과정과 정자 핵의 팽윤을 일으킬 수 있다는 보고도 있다 (Delgado, 1982). 난관을 통과시킨 정자와 swim up으로 처리한 2종류의 균을 heparin이 첨가된 배지와 무첨가 배지에 교차 배양하여 체외수정율 실시하였을 때 swim up으로 처리한 균에서는 heparin첨가가 정자의 난자로의 침입과 수정률을 높였으나 난관을 통과시킨 정자에서는 heparin처리 영향이 미치지 못하였다는 보고도 있다 (Rosenkranz, 1995). 이는 암컷 생식도내에 존재하는 내인성 heparin (Stambaugh, 1980)과 체외수정 시 사용하는 heparin의 작용은 동일한 것으로 사료된다. 암컷 생식도관내에서 정자의 수정능 획득은 decapacitation factor에 의한 Ca_2^+ -ATPase의 활성 저하와 fertilization promoting peptide와 adenosine에 의한 adenylyl cyclase의 증감 그리고 Na^+ , Cl^- , HCO_3^- 등으로 인한 pH ion의 증가에 의해서 주도된다. 침체반응은 zona glycoprotein 3와 Na^+ , Cl^- , HCO_3^- 와의 결합, zona glycoprotein 3와 progesteron에 의한 Ca_2^+ channel의 활성화, 그리고 Ca_2^+ channel을 통한 Ca_2^+ 의 유입에 의한 phosphoinositodase C와 diacylglycerol의 증가에 의해 일어난다 (Fraser, 1998). 그러므로 체외에서 heparin을 이용한 수정능 획득과 침체반응의 기전도 이와 유사할 것으로 생각되나 추가 실험을 통하여 규명되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 번식보조기법 중 정자의 운동성이 중요시되는 인공수정에는 theophylline이, 정자의 생존성과 침체반응이 중요시되는 체외수정에는 heparin이 정자활성물질로서 효과적이라고 생

각되며 정자활성물질을 적용하는 방법을 달리한 후의 효과와 정자활성물질이 수정능획득과 침체반응을 유발시키는 기전에 관해서는 추가연구를 통한 규명이 필요할 것으로 생각된다.

적 요

번식보조기법의 효율성 증대를 위하여, 정자활성물질로서 사용되어지고 있는 theophylline, pentoxifylline 및 heparin의 동결융해 한우정자에 대한 효과를 검토하기 위하여 본 연구를 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

각 농도의 pentoxifylline이 포함된 TALP와 정액을 배양한 후 6시간 경과 시 CASA를 이용한 정액의 분석결과는 3 mM 농도에서 MOT와 VCL이 각각 46.38%과 49.95 $\mu\text{m}/\text{s}$ 로 최대치의 결과를 보였다. 각 농도의 theophylline이 포함된 TALP와 정액을 배양한 후 6시간 경과 시 CASA를 이용한 정액의 분석결과는 30 mM 농도에서 MOT와 VCL이 각각 23.26%과 30.32 $\mu\text{m}/\text{s}$ 로 최대치의 결과를 보였다.

각 정자활성물질이 정자의 운동성과 생존성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험의 결과에서, 운동특성의 경우 각각의 물질로 처리한 정자의 MOT와 VCL은 배양 전 시간대에 걸쳐 유의적으로 증감하지 않았으나 theophylline 처리군에서 가장 우수한 효과를 나타내었다. 생존율의 경우 단독처리군에서는 측정시간대 전역에서 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 3 및 6시간의 측정치에서는 heparin 처리군과 대조군이 theophylline과 pentoxifylline의 합제에 비하여 유의적으로 높은 효과를 나타내었다($P < 0.05$).

이상의 결과로 보아 번식보조기법 중 정자의 운동성이 중요시되는 인공수정에는 theophylline이, 정자의 생존성과 침체반응이 중요시되는 체외수정에는 heparin이 정자활성물질로서 효과적이라고 사료된다.

참고문헌

- Austin CR. 1951. Observation on the penetration of sperm in to the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res., B4:697-698.
- Ax RL, Collier RJ and Lodge JR. 1976. Effect of dietary caffeine on the testis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. J. Reprod. Fertil., 47(2):235-238.
- Biggers JD, Whitten WK and Whittigham DG. 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In: Methods in mammalian embryology. Daniel J.D.(ed) Freeman, San Francisco, pp.86-116.
- Boyers SP, Tarlatzis BC, Stronk JN and DeCherney AH. 1987. Fertilization and cleavage rates of heparin-exposed human oocytes *in vitro*, and the effect of heparin on the acrosome reaction. Fertil. Steril., 48(4):628-32.
- Chan SY, Tang LC and Ma HK. 1983. Stimulation of the human spermatozoal fertilizing ability by dibutyryl 3',5'-CAMP and theophylline *in vitro*. Arch. Androl., 11(1):19-23.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. Nature, 168:697-698.
- Davis RO, Niswander PW and Katz DF. 1992. New measures of sperm motion. I. Adaptive smoothing and harmonic analysis. J Androl., 13:139-152.
- Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Merchant H and Rosado A. 1982. Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. Arch. Androl., 8(2):87-95.
- Eppig JJ. 1981. Regulation by sulfated glycosaminoglycans of the expansion of cumuli oophori isolated from mice. Biol. Reprod., 25:599.
- Farrell PB, Foote RH and McArdle MM. 1996. Media and diluents procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis(CASA). J Androl., 17:293-300.

- Fornes MW, Barbiery AM and Burgos MH. 1993. Sperm motility loss induced by gossypol:relation with OH, scavengers, motile stimulators and malondialdehyde production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195 (3):1289-1293.
- Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:40-46.
- Gliedt DW, Rosenkrans CF Jr, Rorie RW and Rakes JM. 1996. Effects of oocytes maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *J. Dairy Sci.*, 79(4):532-535.
- Gordon I. 1994. Use of embryos and oocytes in commercial practice and research. In: Gordon I, (ed.), *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford: Cab. International, 355-441.
- Grimek HJ, Bellin ME and Ax RL. 1984. Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 30:397.
- Harrison RF. 1978. Insemination of husband's semen with and without the addition of caffeine. *Fertil. Steril.*, 29(5):532-34.
- Homonnai ZT, Paz G, Sofer A, Kraicer PF and Harell A. 1976. Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, 21(3):162-70.
- Jaiswal BS and Majumder GC. 1996. Cyclic AMP phosphodiesterase: a regulator of forward motility initiation during epididymal sperm maturation. *Biochem. Cell. Biol.*, 74 (5):669-674.
- Jayaprakash D, Kumar KS, Shivaji S and Sesthagiri PB. 1997. Pentoxifylline induced hyperactivation and acrosome reaction in spermatozoa of golden hamsters: changes in motility kinematics. *Hum. Reprod.*, 12(10): 2192-9.
- Jiang CS, Kilfeather SA, Pearson RM. 1984. The stimulatory effects of caffeine, theophylline, ipinetheophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 18:258-262.
- Davis RO and Katz DF. 1992. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl.*, 13:81-86.
- Loughlin KR and Agarwal A. 1992. Use of theophylline to enhance sperm function. *Arch. Androl.*, 28(2):99-103.
- Makler A, Makler E, Itzkovitz J and Brandes JM. 1980. Factors affecting sperm motility. IV. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and other metabolically active compounds. *Fertil. Steril.*, 33(6):624-630.
- Maxwell WM, Robinson SJ, Roca J, Molnia FC, Sanchez-Partida LG and Evans G. 1995. Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, cAMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7 (5):1081-1087.
- Mbizvo MT, Johnston RC and Baker GH. 1993. The effect of the motility stimulants, caffeine, pentoxifylline, and 2-deoxyadenosine on hyperactivation of cryopreserved human sperm. *Fertil. Steril.*, 59(5):1112-1117.
- Morales P, Llanos M, Yovich JL and Vigil P. 1993. Pentoxifylline increase sperm penetration into zona-free hamster oocytes without increasing the acrosome reaction. *Andrologia*, 25(6):359-362.
- Niwa K, Park CK and Ohgoda O. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fertil.*, 86 (2):577-582.
- Rosenkranz C and Holzmann A. 1995. The influ-

- ence of semen preparation and culture medium on the success of IVF in cattle. Zentralbl. Veterinarmed. A., 42(2):139-143.
- Rzich JV, Gill H, Van Arsdalen K, Hypolite J and Levin RM. 1987. Objective assesment of the effect of caffeine and sperm motility and velocity. Fertil. Steril., 48:891-893.
- Sharma RK, Seifarth K and Agarwal A. 1997. Comparison of single- and two-layer percoll separation for selection of motile spermatozoa. Int. J. Fertil. Womens. Med., 42(6):412-7.
- Sikka SC and Hellstrom WJ. 1991. The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. J. Androl., 12(3):165-170.
- Stambaugh R and Mastroianni L Jr. 1980. Stimulation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) proacrosin activation by oviduct fluid. J. Reprod. Fertil., 59:479.
- Tash JS and Means AR. 1983. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagella motility. Biol. Reprod., 28:75-104.
- Valencia A, Wens MA, Merchant H, Reyes R and Delgado NM. 1984. Capacitation of human spermatozoa by heparin. Arch. Androl., 12 suppl.:109-13.
- Wincek TJ, Parrish RF and Polakoski KL. 1979. Fertilization : a uterine glycosaminoglycan stimulates the conversion of sperm proacrosine to acrosine. Science, 203:553.
- Yanagimachi R. 1989. Sperm capacitation and gamete interaction. J. Reprod. Fert. Supple., 38:27-33.
- 이성수, 장명상, 안창석. 1997. 한우 종모우의 정액 성상에 관한 연구. 한국동물유전육종학회지. 1. 1:39-48.
- 이강남, 노상호, 윤기영, 용환율, 이강남, 신태영, 이병천, 황우석. 1997. 정액자동분석기를 활용한 동결융해 한우정자의 운동특성. 대한수의학회지, 37(3)부록:158.
- 신태영, 조충호, 황광남. 1991. 과립막세포와의 co-culture가 소 난포란의 체외수정과 분할에 미치는 영향. 한국수정란이식연구회지. 6:25-32.
- 황우석, 노상호, 이병천. 1997. 핵이식을 이용한 복제송아지 생산에 관한 연구 II. 효율적인 복제수정란 생산을 위한 난자의 활성화, 공여핵의 세포주기 조절 및 적정 배양조건. 대한수의학회지, 37:639-645.

(접수일 : 2000. 4. 5 / 채택일자 : 2000. 4. 29)