

정자활성물질의 첨가가 한우난자의 체외수정율에 미치는 영향 II. 정자침입, 체외발육율 및 산자생산에 미치는 영향

김정태 · 김계성* · 이병천[†] · 황우석
서울대학교 수의과대학

Effects of Sperm Activators on Sperm Penetration of Hanwoo Oocytes Following *In Vitro*-Insemination II. Effects of Sperm Activators on Sperm Penetration, *In Vitro* Development and Offspring Production in Hanwoo Oocytes

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

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 151-742, Republic of Korea

SUMMARY

Techniques for manipulation of spermatozoa and oocytes have been widely used for *in vitro* production(IVP) of Hanwoo. This study was conducted to examine the effects of theophylline and heparin on frozen-thawed Hanwoo sperm for enhancing the efficiency of IVP technique.

Oocytes were inseminated with frozen bull semen treated with either theophylline or heparin for examining the effect of each substance on fertilization and subsequent development. More($P < 0.05$) oocytes formed pronucleus and develop to the morula and blastocyst stages after inseminated with sperm treated with heparin than after inseminated with sperm treated with theophylline. The pregnancy rate after embryo transfer was higher after heparin treatment than after theophylline treatment, but did not differ significantly. There was no significant difference of offspring delivery between two groups.

In conclusion, theophylline and heparin can be used for enhancing the efficiency of IVP system for Hanwoo. Considering characteristics of these substances, theophylline may be useful in the artificial 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 : sperm activator, theophylline, heparin, fertilizing ability)

서 론

정자가 난자와 수정을 하기 위해서는 정자의 수정능 획득이 필수적이다. 수정능 획득 과정은 정자의 보호능과 안정성, 운동성 및 적절한 시기와 장소

이 연구는 서울대학교 발전기금 학술연구비의 지원에 의해 수행되었음.

*미국 펜실베니아 대학교 메디칼 센터(University of Pennsylvania, Medical Center, Center for Research on Reproduction and Women's Health)

[†] Correspondence

에 도달하여 침체반응을 일으키기 위해서 정자 두 부 세포막이 융합능력을 획득하는 과정이다(Zan-eveld 등, 1991). 이러한 반응 중 가장 큰 변화는 지질에서 일어나며 정자의 세포막에 고농도로 포함된 cholesterol이 정자의 세포막에 존재하는 지질 이중층의 유동성을 변화시켜 cholesterol이 제거되고, 제거된 cholesterol은 albumin과 고농도의 lipoproteins에 의해 포착된다(Langlais 등, 1985). 이러한 과정은 체내에서는 암컷 생식도관을 지나며 자연적으로 이루어지나 체외에서는 정자활성물질을 첨가하여야만 이루어진다(Bedford 등, 1983). 수정능 획득 현상은 Austin(1951)과 Chang(1951)에 의해서 최초로 보고되었으며 이들은 정자가 난자에 침입하기 위해서는 일정한 시간동안 암컷의 생식도관 내에서 머물러야 한다고 보고하였고, Iritani와 Niwa(1977)는 소의 정자를 살아있는 토끼의 생식도관 내에서 수정능 획득을 유발시켜 분리하는데 성공하였다.

체외에서 수정능획득반응을 일으키는 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 인공수정시 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.

이상에서의 같이 정자활성물질에 관한 많은 연구가 있었지만 theophylline과 heparin의 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 전술한 번식보조기법들의 효율성 증대를 위하여, 정자활성물질로 사용되어지고 있는 theophylline, pentoxifylline 및 heparin 등의 정자활성물질로 처리된 동결정자를 이용하여 체외수정을 실시한 후의 정자침입능 및 난자의 발생능 및 산자생산 등에 미치는 영향을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 한우난자의 체외수정

1) 체외성숙

난소의 채취 및 체외성숙은 Fukui(1991)등의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 공시된 난소는 도축된 한우 유래로 연령, 발정주기 및 산차를 고려하지 않고 육안적으로 정상조건을 지닌 것을 선별하였다. 도체로부터 난소를 적출하여 난소표면에 부착되어 있는 지방조직을 제거한 후 100 IU/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 함유한 30℃의 생리식염수(0.9% NaCl)에 보관상태로 3시간 이내에 실험실로 운반하고 신선한 생리식염수로 2회 이상 세정한 후 미성숙난자를 채취할 때까지 생리식염수가 담긴 비이커에 넣어 37℃ 항온수조에 정치하였다.

미성숙난자의 채취 및 세정은 W-TCM199(Gibco BRL Inc., USA)을, 체외성숙배양에는 10%의 FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL, Paisely, UK), 15 mM sodium bicarbonate, 2.5 µg/ml의 FSH(follicular stimulating hormone, Antrin®, Denka Pharm., Japan) 및 1 µg/ml estradiol(Sigma Co., USA)을 첨가한 TCM199을 사용하였다.

미성숙난자는 18 gauge 주사침을 장착한 10 ml 주사기로 W-TCM199을 흡인, 주사침과 주사기의 내강을 세정한 후 난소의 소난포(직경 2~7 mm)로부터 난포액과 함께 흡인, 채취하였다. 난자를 포함

한 난포액을 플라스틱 petri dish(100×20 mm, Becton Dickinson Labware, USA)에 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하였다. 미성숙난자는 Leibfried와 First(1979)의 분류기준에 준하여 난구세포가 치밀하며 2층 이상 부착되어 있고 세포질이 균일한 난자를 선발하였다.

성숙배양에는 4-well plate를 사용하였으며 배양 전 각 well에 500 μ l의 성숙배양용 TCM199을 넣어 배양기 내에 정치시켰다. 선발한 미성숙난자는 W-TCM199으로 3회, 성숙배양용 TCM199으로 1회 세정하여 각 well 당 20~50개를 첨가하여 39°C, 5% CO₂ incubator 내에서 24시간 성숙배양 하였다.

2) 체외수정

정자의 swim-up, 원심세정, 난자의 세정 및 체외수정에 이용한 배양액은 TALP(Table 1)로서 Fukui(1990)의 방법에 준하여 작성하였다. 모든 배양액은 실험 하루 전에 CO₂ 배양기 내에서 평형시켰다.

정자의 처리 및 체외수정은 Fukui(1990)의 방법에 준하여 체외성숙 22시간에 다음과 같이 실시하

Table 1. Composition of mSOF^a for bovine embryo culture *in vitro*

| Component | Units | Volume |
|---------------------------------|-------------|--------|
| NaCl | mM | 107.7 |
| KCl | mM | 7.2 |
| NaHCO ₃ | mM | 25.1 |
| KH ₂ PO ₄ | mM | 1.2 |
| Na-lactate (60% syrup) | mM | 3.3 |
| Na-pyruvate | mM | 0.3 |
| CaCl ₂ | mM | 1.7 |
| MgCl ₂ | mM | 0.5 |
| Glucose | mM | 1.5 |
| Phenol red | μ g /ml | 5.0 |
| BSA ^b | mg /ml | 8.0 |
| EAA ^c | % | 2.0 |
| NEAA ^d | % | 1.0 |

^a Modified synthetic oviduct fluid.

^b Bovine serum albumin(fatty acid free, fraction V).

^c Essential amino acids.

^d Non-essential amino acids.

였다. 한우 동결정액(0.5 ml /straw)은 축협중앙회 한우개량사업소로부터 공급받았으며 각 정액 straw는 37°C의 온수에 30초간 용해한 후 5 ml의 플라스틱 시험관(Becton Dickinson Labware, USA)에 혼합하였다. 용해한 정자 중 일부의 운동성을 실제 현미경 하에서 확인한 후 미리 작성한 0.8 ml의 capacitation-TALP(pH 7.4)가 들어있는 8~10개의 플라스틱 시험관 저 부에 pasteur pipette으로 0.2 ml의 정액을 분주한 후 5% CO₂ 배양기내에 1시간 정치시켜 swim-up 처리하였다. 상층 액 중 0.6~0.7 ml를 흡입하여 15 ml의 원심관(Becton Dickinson Labware, USA)에 모은 후 2회 원심 세정하였다(600×g, 5분). 정자는 hemocytometer를 사용, 50×10⁶개 /ml의 농도로 희석하고 미리 제작해 둔 정자활성물질이 첨가된 capacitation-TALP를 동량 첨가하였다. 정자와 정자활성물질을 혼합한 후 5% CO₂ 배양기내에 15분간 정치함으로써 수정능 획득을 유도하였다.

정자처리 개시 전 플라스틱 petri dish(60×15 mm, Corning Costar Co., USA)에 *In vitro* fertilization(IVF)-TALP(pH 7.8)로 43 μ l의 미소적을 만든 후 mineral oil(Sigma Co., USA)을 도포하여 5% CO₂ 배양기내에 정치시켰다. 정자의 swim-up 처리 중 체외성숙난자는 W-TALP(pH 7.4)로 3회 세정한 후 5~8개의 난자를 3 μ l의 배양액과 함께 흡입, 수정용 미소적에 주입하여 5% CO₂ 배양기내에 정치시켰다. 수정능획득 과정이 완료된 정자희석액은 정자가 2.0×10⁶개 /ml가 되도록 각각의 미소적 내에 4 μ l씩 주입하였으며, 5% CO₂ 배양기내에서 24시간 체외수정을 실시하였다. 정자활성물질은 각각 viability와 MOT, VCL에 우수한 효과를 보인 heparin과 theophylline을 사용하였다.

2. 정자의 수정능에 미치는 최적의 정자활성물질의 영향

체외수정을 실시한 후 수정란은 18시간 후에 미소적으로 부터 세정용 배양액으로 옮겨 pipetting하여 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거한 후 aceto-orcein 염색(Sahoo 등, 1998)을 실시한 다음 위상차 현미경 하에서 검경하여 난자로 침입한 총 정자 수, 정자 두부의 팽대, 암수 전핵 형성률

및 다정자 침입률 등을 검사하였다.

1) 체외수정란의 염색

슬라이드글라스에 커버글라스 크기로 4개의 점을 파라핀으로 찍고 그 중심에 4~10개의 수정란을 놓은 후 커버글라스를 덮고 파렛팁 등을 이용하여 난자를 누른다. 슬라이드글라스와 커버글라스 사이로 고정액(cacodylate buffer)을 통과시킨 후 10~15분간 정치시킨 후 생리식염수와 에탄올 및 aceto-orcein용액(아세트산 45ml + orcein 1g + 증류수 55ml)을 차례로 통과시키고 현미경 하에서 관찰한다.

3. 한우난자의 초기발생에 미치는 최적 점자활성물질의 영향

1) 체외배양

배양액은 modified synthetic oviduct fluid (SOF) 배지(Table 2)를 사용하여 petri dish(30×15 mm, Corning Costar Co., USA)에 30 μl의 미소적을 만든 후 mineral oil(Sigma Co., USA)을 도포하여 5% CO₂ 배양기 내에 정치시켰다.

수정과정을 거친 난자를 CO₂ 배양기 내에서 24시간 동안 배양한 후 미소적으로부터 세정용 배양액으로 옮겨 pipetting하여 난자에 부착되어 있는 정자 및 난구세포를 제거하였다. 난자는 mSOF 배지를 사용하여 전 배양한 각 미소적 당 6~10개씩 첨가하여 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다.

2) 발생능 검사

체외배양이 끝난 수정란을 5% CO₂ 배양기에 배양하면서 하루에 3회씩 검사를 실시하여 2세포기, 8세포기, 16세포기, 상실배, 그리고 배반포에 도달하는 수정란의 수를 조사하였다.

4. 수정란 이식 및 임신 감점

정상 발정 상태를 나타내고 발정주기 6~8일째인 수란우를 준비하여 직장검사법으로 황체검사를 실시한 후 이식하였다. 황체검사는 황체가 존재하는 위치 및 황체의 상태를 평가하여 A, B, C 등급으로 분류하였으며 A 등급으로 분류된 수란우에 한하여

이식을 하였으며 수정란이식에 이용된 수정란은 수정란 1~2개를 10% FCS가 첨가된 D-PBS 용액과 함께 0.25ml straw에 충전하여 이식하였다.

이식방법은 자궁경관 경유에 의한 비외과적 방법으로 실시하였다. 이식 전 수란우의 제 2, 3 미추사이에 2% lidocain 5ml 주사하여 후구 부위 국소마취를 시키고, 수정란이 충전된 straw를 수정란 이식 주입기에 장전하여 플라스틱 피복체(Sheath, IMV, France)를 씌우고, 수정란이식 주입기가 질을 통과할 때 오염물질이 주입기에 붙어 자궁 내로 주입되는 것을 방지하면서 이식하였다.

수정란이식은 황체가 존재하는 자궁각의 선단 부위까지 주입기를 삽입하여 수정란을 주입하였다.

수정란 이식 후 발정 재귀 여부에 의해서 임신 여부를 1차적으로 확인하였으며 이식한 후 2~3개월 경과 후 직장검사법에 의하여 임신 여부를 최종 확인하였다.

5. 통계학적 분석

정자활성물질에 노출된 정자의 수정능과 이 정자로 수정된 난자의 발생률은 two sample t-test로 검정하였다. 유의수준은 0.05로 판단하였으며 통계 패키지는 SAS(version 6.04)를 사용하였다.

결 과

정자활성물질인 theophylline과 heparin 으로 처리한 정자를 체외수정에 공여하여 체외수정배양 18시간 후의 난자를 aceto-orcein 으로 염색하여 체외수정능을 검사하였다(Table 2). 정자활성물질 중 theophylline 처리군에서는 정자의 두부 팽대율은 57.1%로 유의적으로 높았으나 전핵형성률은 28.6%로 낮았고 heparin 처리군에서는 전핵형성률이 62.1%로 유의적으로 높았다.

정자활성물질인 theophylline과 heparin 으로 처리한 정자를 체외수정에 공여한 후 체외수정배양 18시간에 난구세포를 제거한 난자를 7일간 배양하여 발생능을 검사하였다(Table 3). 2세포기에서 16세포기까지의 발육능에는 유의적인 차이가 없었으나 상실배에 도달하는 비율에서는 heparin 처리군이 16.3%로 theophylline 의 7.1%에 비하여 유의

Table 2. Penetration of oocytes by spermatozoa treated with heparin or theophylline

| Treatment groups | No. of oocytes(%) | | | |
|------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|
| | Total penetrated | Enlarged sperm head | Male /female pronucleus | No. of polyspermy |
| Heparin | 20(100) | 8(27.6) ^a | 18(62.1) ^a | 2(6.9) |
| Theophylline | 14(100) | 8(57.1) ^b | 4(28.6) ^b | 0(0) |

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

Table 3. Development of Hanwoo oocytes fertilized by spermatozoa treated with heparin or theophylline

| Treatment groups | No. of oocytes developed(%) | | | | |
|------------------|-----------------------------|-----------|----------|-----------------------|-----------------------|
| | 2-cell | 8-cell | 16-cell | Morulae | BL ^A |
| Heparin | 250(100) | 137(54.8) | 93(37.2) | 63(25.2) ^a | 61(24.4) ^a |
| Theophylline | 84(100) | 55(65.5) | 29(34.5) | 6(7.1) ^b | 4(4.8) ^b |

^A BL=blastocysts.

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

Table 4. Production of offsprings after transfered of embryos derived from Hanwoo oocytes fertilized by spermatozoa treated with heparin or theophylline

| | No(%) of transfered embryo | No(%) of pregnant cow | No(%) of offspring |
|--------------|----------------------------|-----------------------|--------------------|
| Heparin | 55(100) | 37(67.3) | 30(54.5) |
| Theophylline | 4(100) | 3(75.0) | 2(50.0) |

적으로 높았다.

정자활성물질인 theophylline과 heparin으로 처리한 정자를 체외수정에 공여한 후 배반포에 도달한 수정란을 수란우에 이식하여 임신 여부 및 산자생산에 미치는 영향을 검사하였다(Table 4). 임신율은 theophylline을 사용한 수정란이 높았으며 출산율은 heparin을 사용한 수정란이 높았으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

고 찰

포유동물의 정자는 사출 후 암컷의 생식도를 통과하면서 수정능을 획득한다. 수정능획득이란 침체반응을 준비하기 위한 정자 두부의 원형질막의 변화 및 hyperactivation으로 명명되는 운동성의 변화이다(Yanagimachi, 1989).

본 실험에서는 정자의 이러한 변화를 체외에서 일으키기 위하여 정자활성물질을 사용, 정자의 수정능에 미치는 영향과 난자의 발육능 및 임신율과

산자생산에 미치는 영향을 검토하였다.

Loughlin(1992)은 theophylline이 정자의 운동성 증가 뿐 아니라 투명대 제거 hamster 난자로의 침입률도 향상 시켰다고 보고하여 theophylline이 운동성의 증가뿐만 아니라 침체반응에도 작용함을 입증하였다. 정자활성물질 중 theophylline은 세포내 calcium의 이동, cyclic AMP의 세포내 고농도 축적에 의한 phosphodiesterasa의 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). 이러한 theophylline이 정자의 기능을 향상시키는 기전에 관해서는 추가연구가 수행되어야 될 것으로 생각된다.

정자활성물질 중 heparin은 glycosaminoglycan, 일명 GACs로 정자 세포막의 생리학적 변화를 촉발시켜서 침체반응을 일으키고 정자의 수정능획득 및 난자와의 수정에 영향을 미친다(Wincek, 1979). 자

가방사기록법을 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 무 첨가 배지에 교차 배양하여 체외수정을 실시하였을 때 swim up으로 처리한 균에서는 heparin첨가가 정자의 난자로의 침입과 수정률을 높였으나 난관을 통과시킨 정자에서는 heparin처리가 영향을 미치지 못하였다는 보고도 있다(Rosenkranz, 1995). 이는 암컷 생식도내에 존재하는 내인성 heparin(Stambaugh, 1980)과 체외 수정 시 사용하는 heparin의 작용은 동일한 것으로 사료된다. 암컷 생식도관내에서 정자의 수정능 획득은 decapacitation factor에 의한 C_2^+ -ATPase의 활성화저하와 fertilization promoting peptide와 adenosine에 의한 adenyl 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.

정자의 수정능에 미치는 최적농도의 정자활성물질의 영향에 관한 실험에서는, theophylline 첨가 시 정자 두부의 팽대율은 높았으나 전핵형성률은 낮았고 heparin 첨가 시에는 전핵형성률이 유의적으로 높았다($P < 0.05$). 또한 theophylline과 heparin의 첨가가 난자의 초기 발생에 미치는 영향에 관한 연구에서 2 세포기에서 16 세포기까지의 발육률은 각 정자활성물질의 첨가군이 큰 차이를 보이지 않지만 배반포에 이르는 비율은 heparin 사용군에서 유의적으로 높았다($P < 0.05$). 이는 heparin을 포함한 sulfated glycosaminoglycan이 정자의 DNA 전사와 합성을 촉진하는 역할을 하는데 기인하는 것으로 추측된다(Delgado, 1980; Heston, 1975). 최적농도의 정자활성물질을 사용하여 생산

된 수정란을 수란우에 이식하여 임신율과 산자생산에 미치는 영향을 검사한 실험에서는 유의적인 차이를 보이지 않아서 배반포까지 발육이 끝난 수정란의 임신율과 산자발생에는 큰 영향이 없다고 생산된다. 이러한 결과는 heparin 혹은 theophylline 처리정자 침입 난자가 정상적으로 이식적합기까지 발생한다면, 이후의 태아발생에 영향을 미치지 않음을 의미한다. 즉 상기물질들은 다양한 가축번식 program에 안전하게 이용될 수 있으며 향후 인공 수정 및 체외수정-수정란 이식기법에 상기물질이 적극적으로 안전하게 활용될 수 있음을 의미한다.

이상의 결과로 보아 번식보조기법 중 정자의 운동성이 중요시되는 인공수정에는 theophylline이, 정자의 생존성과 침체반응이 중요시되는 체외수정에는 heparin이 정자활성물질로서 효과적이라고 생각되며 정자활성물질을 적용하는 방법을 달리한 후의 효과와 정자활성물질이 수정능 획득과 침체반응을 유발시키는 기전에 관해서는 추가연구를 통한 규명이 필요할 것으로 생각된다.

적 요

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

정자활성물질을 처리한 정자의 수정능을 검사한 실험결과, theophylline처리군에서 정자의 두부 팽대율이 57.1%로 유의적으로 높았으나 전핵형성률은 28.6%로 낮았고 heparin 처리군에서는 전핵형성률이 62.1%로 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

정자활성물질을 처리한 정자를 공여하여 수정시킨 난자의 발육능을 실험한 결과 2세포기에서 16세포기까지의 발육능에는 유의적인 차이가 없었으나 상실배에 도달하는 비율에서는 heparin처리군이 16.3%로 theophylline의 7.1%에 비하여 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

정자활성물질로 처리한 정자를 공여하여 수정시킨 수정란을 수란우에 이식하여 임신율과 산자생산을 비교하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

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.
- Bedford JM. 1983. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals, *Biol. Reprod.*, 28:108-20.
- 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.
- 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.
- 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, 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.
- Harrison RF. 1978. Insemination of husband's semen with and without the addition of caffeine. *Fertil. Steril.*, 29(5):532-34.
- Heston WDW, Zirkin BR, Coffey DS. 1975. Release of chromatin template restriction in rabbit spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64:162-168.
- 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.
- Langlais J and Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete. Res.*, 12:183-224.
- Leibfried L and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Loughlin KR and Agarwal A. 1992. Use of theophylline to enhance sperm function. *Arch. Androl.*, 28(2):99-103.
- 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 infl-

- uence 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, Levin RM. 1987. Objective assesment of the effect of caffeine and sperm motility and velocity. Fertil. Steril., 48:891-893.
- Sahoo TK, Mohanty DN, Mohanty BN, Barik AK. 1998. Attachment of spermatozoa to *in vitro* matured bovine oocytes in TCM-199 and MEM media. Indian J. Exp. Biol., 36(4):367-70.
- 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.
- Valencia A, Wens MA, Merchant H, Reyes R and Delgado NM. 1984. Capacitation of human spermatozoa by heparin. Arch. Androl., 12suppl.: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. Suppl., 38:27-33.
- Zaneveld LJD, De jonge CJ and Anderson RA. 1991. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum. Reprod., 6:1265-74.

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