

Effects of Reactive Oxygen Species on DNA Stability in Human Spermatozoa

Hee Gyo Kang^{*1}, Tai Jeon Kim¹, Hyung Joon Bae¹, Hi Joo Moon¹, Myo Kyung Kim², Dong Hoon Kim², Sungwon Han², Ho Joon Lee^{2,3}, Hye Young Yang⁴ and Moon Kyoo Kim⁴

¹Department of Medical Technology, Seoul Health College, Kyunggi-do, ²Eulji Medical Science Institute, Eulji Medical Center, Seoul, ³Department of Physiology, School of Medicine, Eulji University, Taejeon,

⁴Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, Korea

This study was designed to investigate the effects of reactive oxygen species (ROS) on DNA stability in human spermatozoa. To verify human spermatozoa were incubated with xanthine-xanthine oxidase (X 100 μ M-XO 50 mIU ~ 400 mIU), H₂O₂ (125 μ M ~ 1 mM), sodium nitroprusside (SNP 0.1 μ M ~ 100 μ M) or lymphocyte. Otherwise, spermatozoa were incubated under low O₂ (5%) condition. Damage of sperm DNA was analyzed by single cell electrophoresis (Comet assay) and flow cytometry after acridine orange staining. In the presence of ROS, there was increase in DNA damage. The rate of DNA single strand breakage (9.0 \pm 1.0% ~ 46.0 \pm 4.6%) and DNA fragmentation (7.5 \pm 1.0% ~ 29.5 \pm 4.6%) were similar regardless of the kinds of ROS and exposure time. DNA damage in the lower O₂ condition (5%) was lower than ambient O₂ condition (20%). Taken together, it suggested that sperm DNA might be damaged by ROS. In the presence of ROS, increase in DNA damage and chromatin instability was obvious in spite of short exposure. Although present study reconfirmed that sperm incubation in the low concentration of ROS have the benefit in the induction of capacitation and AR, the increase in DNA damage by ROS and possible genetic problem should be considered before the human trials.

Key Words: Reactive oxygen species, Human spermatozoa, DNA instability, Single cell electrophoresis

서 론

정자의 기능을 명확하게 분석하는 것은 보조생식술시술에 결과 예측에 있어서 매우 중요한 일이다. 일반적으로 시행되고 있는 정액검사는 단순히 정자의 수, 정액의 양, 운동성 정도와 정자의 형태만을 감별할 수 있으나 정자에 내재되어 있는 염색질 또는 DNA의 상해를 감별하는 데는 역부족한 검사 방법이다. "숨겨진 상해"라 불리는 정자 핵에 관련한 상해는 그 상해정도에 따라 그리고 유발 원인에 따라 수정과정 뿐 아니라 이후 배아발생과정에 악영향을 끼치는 것으로 보고되고 있다^{1,2,23,26}.

많은 연구자들은 사람 정자의 chromatin의 상태에 대한 명확한 평가를 통해 보조생식술을 시행시에 임신 실패를 경험하게 되는 원인으로 chromatin의 이상이 관련되어 있음을 보

고하고 있다^{1,16,26,31,34}. 또한 냉동보존은 보조생식술 (ART; assisted reproductive technology)에 있어서 필수적인 과정으로 자리잡고 있으나, 이러한 냉동보존과정에서 겪게 되는 상온에서 초저온까지의 온도의 변화는 정자막, mitochondria, 핵 그리고 정자 기능에 이르기까지 심각한 상해를 유발할 소지를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 특히 해빙시에 겪게 되는 급격한 온도의 상승으로 인한 상해는 더욱 주목해야 할 것으로 여겨진다. 이러한 과정 속에서 발생되어지는 대표적인 물리적인 현상이 gas의 생성이며, 이를 통한 ROS의 생성이 냉동보존된 정자를 보조생식술에 이용하고자 할 때 DNA 상해를 유발시키는 주원인으로 추측되어진다.

정자에 있어서 ROS에 의한 영향 중 새롭게 인식되고 있는 부분이 DNA 상해에 관한 것이다. 이는 oxidative stress가 정자의 세포막을 지질과산화시켜 정자의 운동성과 난자와의 결합을 약화시키는 것 외에 수정 후 배아의 정상적인 발달 및 출생 후 전반적인 건강에 영향을 끼칠 수 있다고 사료되기 때문이다.

최근에 보고되고 있는 바에 의하면, ROS는 DNA를 산화시키고²⁰, ATP와 NADPH의 생산^{6,15} 및 DNA 응축^{28,29}에도 영향

*논문 접수: 2001년 11월 24일
수정재접수: 2001년 12월 22일

†별책 요청 저자: 강희규

이 논문은 2001년도 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었음.

을 미치는 것으로 제시되고 있다. 이는 DNA의 염기와 phosphodiester backbone들이 oxidative stress에 매우 약하며, 이들 구조의 과산화 (peroxidation)는 DNA의 가닥 (strand)의 교차 (cross-linking)와 끊김 (break)의 원인이 될 수 있기 때문이다. 이러한 변화 또는 상해는 일반적인 DNA의 전사 (transcription), 복제 (replication) 등에 영향을 미치기 때문이다. 이러한 oxidative DNA가 어떤 기관에서는 노화와 연관^{4,10)}이 있는 것으로 보고되고 있기도 하며, 이러한 DNA 상해가 암, 심장질환 그리고 유전되어지는 돌연변이 등과 연관 있는 것으로 알려지고 있다^{8,10,19,36)}. 생쥐에 있어서는 ROS가 초기배아의 발생에 영향을 끼치는 것으로 알려졌다^{14,27)}. 따라서 상해받은 DNA를 가진 정자는 초기유산율의 증가, 태아기형 등과 같은 결과를 초래할 수 있다고 보고되고 있다^{18,34)}. 그러므로 심하게 oxidative Stress로 인해 DNA가 상해를 받은 정자는 남성불임의 생화학적 하나의 요인으로 간주하여, 정자 내적으로 생성되어지는 ROS에 의한 영향과 ROS의 종류, 노출량, 시간 등에 따라 어떤 문제가 야기되어지는가를 확인하고 이를 남성불임 진단과정에 활용할 가치가 있다고 사료된다.

지금까지 정자의 염색질의 상태 및 DNA의 상해 여부를 알아볼 수 있는 방법은 복잡하고 그 결과의 신빙도가 많이 떨어지는 것들이었으며, 임상적으로 이용하는데 적합하지 못하였다. 그러나 최근 들어 정자의 chromatin integrity와 관련된 기능을 확인하는데 있어 주목받고 있는 방법론이 sperm chromatin structure assay (SCSA)와 각각의 세포에서의 DNA의 single strand breakage를 확인하는데 있어 그 정확성이 높은 것으로 여겨지는 single cell gel electrophoresis (comet assay) 방법이다. 이러한 방법들은 지금까지와 달리 다량의 정자에서 그 결과를 도출함으로써 결과의 이용가치를 높여주고 있다^{12,13)}. SCSA는 flow cytometry를 이용하여 acid-induced denaturation 시킨 정자의 염색질의 susceptibility를 형광 염색약인 acridine orange의 특성을 이용하여 확인하는 방법으로 자동화, 객관성, 정교함, 빠른 속도 등의 장점을 가지고 있어 그 이용가치가 높은 방법론으로 보고되고 있으나 사람에게는 제한적으로 적용되고 있는 실정이다^{7,9,12,13)}.

아직까지 보조생식술 시행에 있어서 냉동보존 되어진 정자를 이용한 경우 발생하게 되는 DNA의 상해 여부와 ROS와의 관계에 대해서는 정립된 바가 없다. 이에 대표적인 ROS 발생물질인 H₂O₂, xanthine-xanthine oxidase, NO 발생인자인 sodium nitroprusside, leukocyte와 같은 ROS 발생인자들을 처리했을 때와 ROS 발생이 자연적으로 감소하리라 예측되어지는 저산소농도 (5% O₂) 상태에서 정자의 염색질 상해정도를 SCSA 방법을 이용하여 알아봄으로써 사람 정자의 염색질 안정성 저해정도를 확인하고자 하며, 또한 comet assay 방법을 이용하여 DNA의 상해정도를 알아봄으로써 정자의 보조생식술 이용시의 결과 예측인자로서 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 배양액

실험에 사용된 배양액은 Ham's F-10에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. H₂O₂, xanthine-xanthine oxidase, sodium nitroprusside 등과 comet assay에 사용된 low melting agarose (LMA), normal melting agarose (NML), DMSO, 그리고 flow cytometry에 사용된 acridine orange (AO) 및 TNE 완충용액 시약들은 Sigma (St Louis, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다.

2. 정자의 처리

반응성 산소종이 수정능력 획득, 침체반응 및 DNA에 미치는 영향을 알아보기 위해서 반응성 산소종으로 superoxide anion은 xanthine (X) -xanthine oxidase (XO) system을 X (100 μM), XO (50 mIU ~ 400 mIU) 처리하였고, hydroperoxide는 H₂O₂를 125 μM ~ 1 mM까지 처리하였으며, nitric oxide는 NO donor인 sodium nitroprusside를 0.1 μM ~ 100 μM 처리하였다. 또한 남성불임요인의 하나로 알려진 leukocytospermia에 대한 영향을 알아보기 위해 lymphocyte를 농도별로 1×10⁶/ml ~ 4×10⁶/ml까지 처리하였다. 일반적인 배양기내 산소농도인 20% O₂ 농도를 생체내 농도와 유사한 5% O₂ 농도로 낮추어서 배양한 후 결과를 분석하였다.

정액은 비뇨기과로 불임을 주소로 내원한 환자에게서 동의서를 받고 정액검사 후 남은 정액을 냉동보관하여 보관한 뒤 해빙하여 실험에 사용하였다. 해빙 후 정자를 얻기 위해 3개 층 (50-90-100%)으로 구성된 percoll 방법으로 2회 원심분리하여 움직이는 정자를 획득하였다. 원심분리는 1000 rpm에서 20분간 1회, 1200 rpm에서 5분간 1회씩 시행하였다. 각각의 실험군에 10×10⁶개의 정자를 분주하여 실험에 사용하였다. 정자를 각각의 실험군에 분주한 후 5% CO₂, 37°C의 배양기와 5% O₂, 5% CO₂, 37°C chamber에 넣어 0, 30분, 1시간, 3시간, 6시간 동안 배양하였다.

3. Alkaline single cell gel (Comet) assay

Hughes (1997)의 방법으로 single cell gel electrophoresis (comet assay)를 시행하였다. 녹는점이 높은 agarose (NMA)를 증류수에 1% (w/v)가 되게 고온에서 녹인 후 충분히 frosted 되어진 slide에 75 μl를 떨어뜨린 후 cover slide를 덮고 4°C에서 3~5분간 굳혀 첫번째 층을 만든다. 녹는점이 저온인 agarose를 증류수에 0.5%가 되게 녹인 후 준비되어진 5~10 μl의 정자액과 75 μl의 0.5% LMA를 잘 섞은 후 cover slip를 제거한 첫번째 층 위에 떨어뜨린 후 다시 4°C에서 굳혀 두번째 층을 만든다. 이에 첫번째 층을 만드는 방법과 동일하게 LMA를 이용하여 세번째 층을 만든 후 lysing 용액 (2.5 M NaCl, 100 mM

Na₂EDTA, 10 mM Tris pH 10)에 4°C에서 최소 1시간 동안 담가둔 후 전기영동을 시행하였다. Lysing 용액은 사용하기 직전에 1% Triton X-100을 250 µl 첨가하고, DNA를 탈응축시키기 위해 dithiothreitol (DTT)를 최종농도가 10 mM이 되게 첨가한 후 사용하였다. Slide를 수평형 전기영동판 위에 가지런히 정렬한 후 전기영동 용액 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13)을 부은 후 DNA가 풀어질 수 있도록 20~40분간 정지한 뒤 25 V에서 10분간 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 후 slide를 꺼내 중화용액 (neutralizing solution)에서 5분씩 3회 중화시킨 후 ethidium bromide로 염색한 후 Nikon Eclipse E600 형광현미경에서 515~560 nm 필터를 이용하여 관찰하였다. 대조군의 염색양상을 기준으로 하여 slide 당 200개의 정자를 개수한 후 정상군의 DNA 끝림 길이의 1.5배 이상의 끝림이 있는 경우를 손상군으로 구분하여 백분율을 구하였다.

4. Flow cytometric analysis

Evenson과 Jost의 방법 (1994)을 변형하여 SCSA를 시행하였다. 정자를 각각의 실험군에 분주한 후 5% CO₂, 37°C의 배양기 또는 5% O₂, 5% CO₂, 37°C chamber에 넣어 0, 30분, 1시간, 3시간, 6시간 동안 배양하였다. 배양되어진 정자를 300 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 10% glycerol이 들어있는 TNE 완충용액 (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 1 ml를 첨가하여 재 혼합한 후 flow cytometry (FCM) 분석을 시행할 때까지 -80°C 저온 냉동고에 각각의 숫자로 표시한 후 보관하였다. 사용되어진 정자는 최종농도가 2×10⁶/ml이 되도록 조정하였다. 모든 실험군들은 FCM 분석 시에 잘게 부순 얼음 위에서 해빙한 후 DNA *in situ* denaturation을 시행한 후 acridine orange (AO) 염색액을 0.2 ml 첨가하여 염색한 후 FCM 분석을 시행하였다. DNA *in situ* denaturation은 pH 1.4의 detergent 용액 (0.17% Triton X-100, 0.15 M NaCl, 0.08 N HCl)을 0.4 ml 첨가하여 30초간 시행한 후 6 mg/l의 AO가 포함되어 있는 재 염색액 (0.1 M citric acid, 0.2 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, pH 6.0)을 1 ml 첨가하여 최소 3분간 염색시킨 후 FCM으로 분석하였다. 각각의 실험군들은 6W Ar ion laser가 장착되어진 FACS Vantage (Becton Dickinson, San Jose, USA)를 이용하여 488 nm에서 분석하였다. 실험군을 FACS에 삽입하여 DNA가 double strand인 것들은 녹색형광 (530±30 nm)으로, single strand인 것은 적색형광 (>630 nm)으로 발광되어지는 것을 검출하였다. 적색형광의 증가분을 산출하여, 이를 acid 처리시 DNA에 부착되어진 protamine이 탈락되어 그 부분의 double strand가 single strand로 끊어져 AO에 의해 염색되어진 것으로 간주하였고 이를 DNA 절편화 (fragmentation)으로 표시하였다 (Fig. 1). 아무런 처리도 하지 않은 대조군을 scattergram 분석하여 산출되어진 histo-

gram에서 평균적으로 (4회 반복 시행) 방출되어지는 적색형광 증가분 (M2)을 FACS Vantage 내 장착되어진 프로그램으로 산출하였다. 모든 실험군은 초당 1000개의 정자를 분석하여 총 100,000개의 정자를 분석하였다.

5. 통계적 분석

통계적 유의성은 Chi-square test를 사용하였으며, 유의수준을 5%로 하여 p값이 0.05 보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다.

결 과

1. 정자내 DNA single strand breakage 분석

1) H₂O₂ 처리군

H₂O₂를 125 µM ~ 1 mM를 1시간에서 6시간까지 처리하여 DNA single strand breakage를 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 DNA single strand breakage는 H₂O₂에서 125 µM ~ 1 mM 처리군 (22.0±2.0, 23.7±1.5, 26.3±1.5, 31.0±3.6%)이 대조군 (14.0±1.7%)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.01). 처리농도간에는 1 mM 처리군이 DNA single strand breakage가 가장 높게 나타났다. 3시간 처리군에서는 1 mM 처리군 (49.0±6.6%)에서만 유의한 DNA single strand breakage의 증가가 나타났으며 (p<0.01), 1 mM 이하 처리군에서는 대조군 (24.3±4.5%)과 차이가 없는 것으로 나타났다. 6시간 처리군에서는 500 mM 처리군 (40.7±7.5%)과 1 mM (45.0±5.0%) 처리군에서 대조군 (26.7±5.1%)에 비해 유의하게 높은 DNA single strand breakage가 일어나고 있음을 보여주고 있다. 각각의 처리군에서 1시간에서 6시간까지의 처리시간에 따른 DNA single strand breakage 변화양상은 전반적으로 처리시간에 따라 증가되는 양상을 보이고 있으며, 특히 500 mM과 1 mM 처리군에서는 DNA single strand breakage가 유의한 증가를 보여주고 있다 (p<0.05). 대조군에서도 처리시간이 3시간을 경과하면서 DNA single strand breakage가 증가 (24.3±4.5 ~ 26.7±5.1%) 되어지는 양상을 보여주고 있다 (Table 1).

2) Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO) 처리군

X (100 µM) -XO (50 mIU ~ 400 mIU)를 1시간에서 6시간까지 처리한 결과는 다음과 같다. 1시간 처리시 X-XO 처리군 (13.3±1.5, 14.3±2.1, 15.0±2.6, 15.3±0.6%)에서의 DNA single strand breakage의 변화양상은 대조군 (14.0±1.7%)과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서도 처리시간에 따른 X-XO 농도간의 DNA single strand breakage의 변화는 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. 대조군을 포함한 모든 처리군에서 처리시간이 늘어감에 따라 DNA single strand breakage의 증가양상이 나타났으며, 특히 XO를 400 mIU 처리한 군에서 유의한 증가가 관찰되었다

Table 1. Effect of H₂O₂ on DNA damage of ejaculated human sperm suspension incubated for 1, 3 and 6 hr by single cell gel electrophoresis

Treatment	Time (hr)		
	1	3	6
Control	14.0±1.7 ^a	24.3±4.5	26.7±5.1 ^a
H ₂ O ₂ Conc.			
125 μM	22.0±2.0*	23.7±2.1	24.3±4.0
250 μM	23.7±1.5**	25.7±2.1	24.3±3.2
500 μM	26.3±1.5** ^b	29.0±1.0	40.7±7.5** ^b
1 mM	31.0±3.6** ^c	49.0±6.6** ^c	45.0±5.0**

[†]Data are presented as means±SEM (n=4). *p<0.01, **p<0.001; compared with untreated control suspension.

[‡]Different superscripts indicate a significant difference (p<0.01) (Chi-square test) between data in the same raw.

Table 3. Effect of sodium nitroprusside on DNA damage of ejaculated human sperm suspension incubated for 1, 3 and 6 hr by single cell gel electrophoresis

Treatment	Time (hr)		
	1	3	6
Control	14.0±1.7 ^a	24.3±4.5	26.7±5.1 ^a
Sodium nitroprusside			
0.1 μM	21.7±5.7	26.3±2.1	27.7±0.6
1 μM	17.7±3.8	23.3±4.2	21.3±6.1
10 μM	24.3±2.1*	25.0±1.0	21.0±1.0
100 μM	26.0±2.0**	25.0±2.7	26.7±1.5

[†]Data are presented as means±SEM (n=4). *p<0.01, **p<0.001; compared with untreated control suspension.

[‡]Different superscripts indicate a significant difference (p<0.01) (Chi-square test) between data in the same raw.

Table 2. Effect of xanthine-xanthine oxidase on DNA damage of ejaculated human sperm suspension incubated for 1, 3 and 6 hr by single cell gel electrophoresis

Treatment	Time (hr)		
	1	3	6
Control	14.0±1.7 ^a	24.3±4.5	26.7±5.1 ^a
X (μM) / XO (mIU)			
100 50	13.3±1.5	21.0±1.0	20.0±2.0
100 100	14.3±2.1	25.0±1.0	22.7±2.1
100 200	15.0±2.6	22.3±2.5	26.7±3.5
100 400	15.3±0.6	28.7±1.5	30.0±1.7

[†]Data are presented as means±SEM (n=4).

[‡]Different superscripts indicate a significant difference (p<0.01) (Chi-square test) between data in the same raw.

Table 4. Effect of lymphocytes on DNA damage of ejaculated human sperm suspension incubated for 1, 3 and 6 hr by single cell gel electrophoresis

Treatment	Time (hr)		
	1	3	6
Control	14.0±1.7 ^a	24.3±4.5	26.7±5.1 ^a
Lymphocyte			
1×10 ⁶ /ml	9.0±1.0 ^b	27.7±0.6	27.3±0.6 ^b
2×10 ⁶ /ml	11.3±0.6 ^c	27.0±1.0	28.7±1.2 ^c
3×10 ⁶ /ml	12.7±2.1 ^d	30.3±1.5	37.3±3.1 ^d
4×10 ⁶ /ml	12.0±1.0 ^e	33.3±1.5	46.0±4.6** ^e

[†]Data are presented as means±SEM (n=4). *p<0.01, **p<0.001; compared with untreated control suspension.

[‡]Different superscripts indicate a significant difference (p<0.01) (Chi-square test) between data in the same raw.

(Table 2, p<0.05).

3) Sodium nitroprusside (NO donor) 처리군

NO를 0.1 μM ~ 100 μM까지 처리한 결과는 다음과 같다. 1시간 처리시 NO 처리농도 (21.7±5.7, 17.7±3.8, 24.3±2.1, 26.0±2.0%)에 따른 DNA single strand breakage가 대조군 (14.0±1.7%)에 비하여 다소 증가하는 양상을 보여주고 있으나 통계적으로 유의한 증가는 없는 것으로 나타났다. 3시간 처리군 (26.3±2.1, 23.3±4.2, 25.0±1.0, 25.0±2.7%)과 6시간 처리군 (27.7±0.6, 21.3±6.1, 21.0±1.0, 26.7±1.5%)에서는 NO 처리농도에 따른 변화가 대조군 (24.3±4.5, 26.7±5.1%)과 차이가 없는 것으로 나타났다. NO 처리결과에서 흥미로운 점은 초기 1시간 처리군에서는 DNA single strand breakage가 증가한 양상을 보였으나, 처리시간이 3시간, 6시간으로 늘어나는 것에 따른 동반 증가현상은 나타나지 않는 것이다 (Table 3).

4) Lymphocyte 처리군

Lymphocyte를 1×10⁶/ml ~ 4×10⁶/ml까지 처리한 군에서의 처리농도 및 처리시간에 따른 결과는 다음과 같다. 1시간 처리시 lymphocyte 처리농도에 따른 DNA single strand breakage의 변화양상은 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. 3시간 처리군에서는 3~4×10⁶/ml을 처리한 군 (30.3±1.5, 33.3±1.5, 37.3±3.1, 46.0±4.6%)에서 대조군 (24.3±4.5, 26.7±5.1%)에 비해 변화양상이 증가하는 것으로 보이나 통계적으로 유의한 차이는 아닌 것으로 나타났다. 6시간 처리군에서는 4×10⁶/ml을 처리한 군 (46.0±4.6%)에서 통계적으로 유의하게 DNA single strand breakage가 대조군 (26.7±5.1%)에 비해 높게 유발되는 것으로 나타났다 (p<0.01). 대조군을 제외한 모든 처리군에서 3시간 처리 이후부터 DNA single strand breakage가

유의하게 증가하는 것으로 나타났다 (Table 4, $p < 0.01$).

5) Low (5%) O₂ 처리군

Low (5%) O₂를 시간별로 처리하여 대조군 (20%)과 비교한

Table 5. Effect of low (5%) or ambient (20%) oxygen tension on DNA damage of ejaculated human sperm suspension incubated for 1, 3 and 6 hr by single cell gel electrophoresis

Treatment	Time (hr)		
	1	3	6
5% oxygen	14.0±1.7 ^{*a}	24.3±4.5 ^{**}	26.7±5.1 ^{**a}
20% oxygen	8.0±1.0	12.0±2.7	11.7±4.7

[†]Data are presented as means±SEM (n=4). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$; compared with untreated control suspension.

[‡]Different superscripts indicate a significant difference ($p < 0.01$) (Chi-square test) between data in the same row.

결과는 다음과 같다. 5% O₂ 처리군 (8.0±1.0, 12.0±2.7, 11.7±4.7%)은 1시간부터 6시간까지의 모든 처리시간에서 대조군 (14.0±1.7, 24.3±4.5, 26.7±5.1%)에 비해 낮은 DNA single strand breakage 양상을 보여주고 있다. 특히, 대조군은 처리시간이 늘어남에 따른 DNA single strand breakage가 늘어나는 양상을 보여주는데 반하여, 5% O₂ 처리군에서 처리시간 전반에 걸쳐 차이가 없음을 보여주고 있다. 3시간 (12.0±2.7%)과 6시간 처리시 (11.7±4.7%)에는 5% 처리군이 대조군 (24.3±4.5, 26.7±5.1%)에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보여주고 있다 (Table 3~5, $p < 0.01$).

2 정자내 염색질 구조 (sperm chromatin structure) 분석

1) H₂O₂ 처리군

H₂O₂를 125 μM ~ 1 mM를 30분에서 6시간까지 처리하여

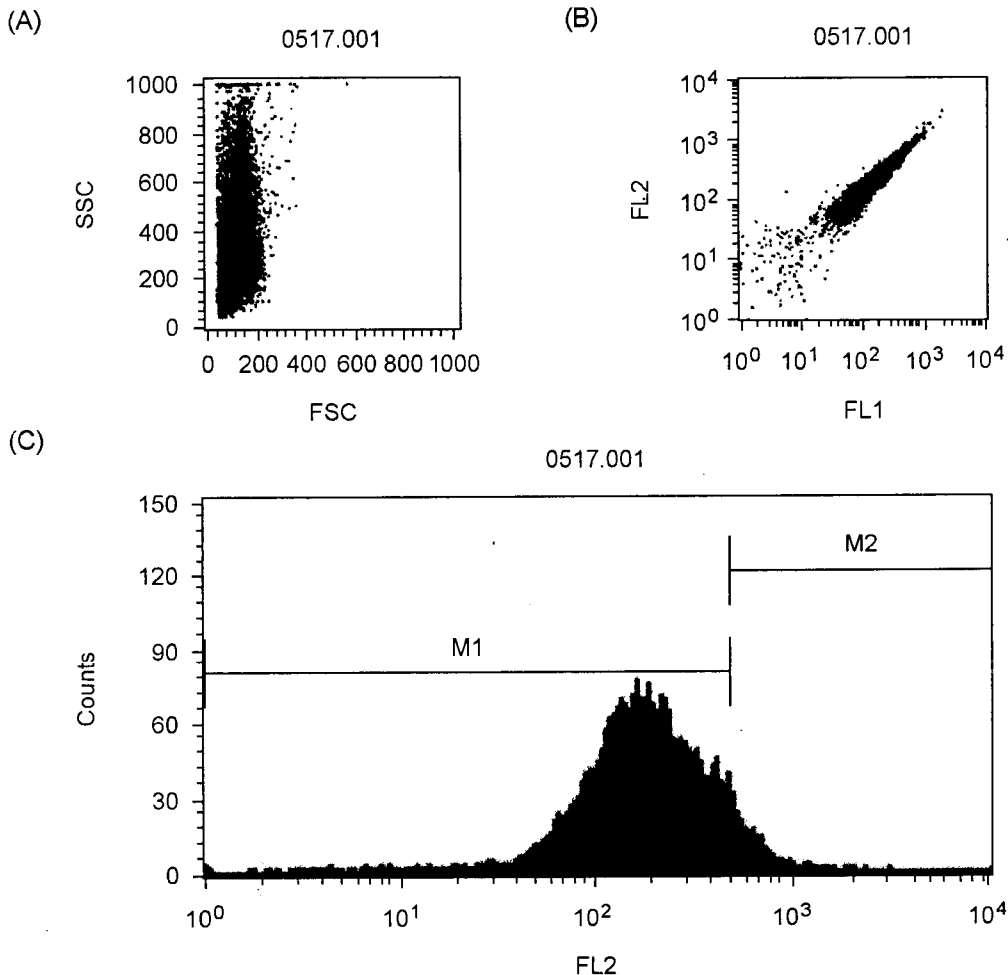


Fig. 1. Flow cytometric histogram of frozen-thawed ejaculated human sperm. (A) A total of 100,000 events were measured and accumulated in the histogram, each dot representing one sperm cell and (B) green and red fluorescence distributions, from one frozen-thawed human sperm cell measured by the flow cytometric (FCM) sperm chromatin structure assay (SCSA). (C) The fraction of cells with red fluorescence is indicated M2 in the histogram.

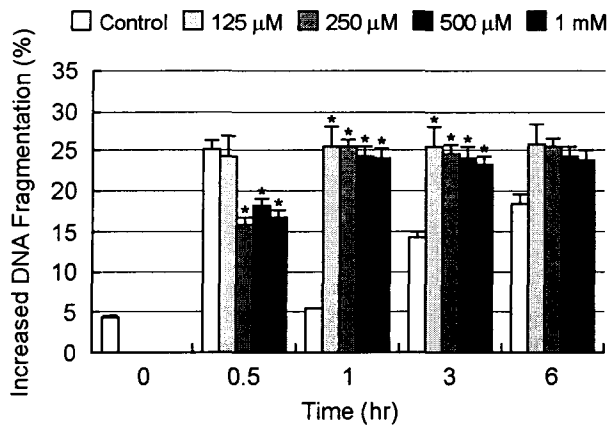


Fig. 2. Flow cytometric histogram of ejaculated human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3, and 6 hr in the presence of H₂O₂. (A) 0.5 hr of incubation; (B) 1 hr of incubation; (C) 3 hr of incubation; (D) 6 hr of incubation; (E) comparison of the percentage of sperm with DNA fragmentation obtained after sperm chromatin structure assay (SCSA) analysis. Data are presented as means ± SEM (n=3). (*) p<0.01; compared with untreated control.

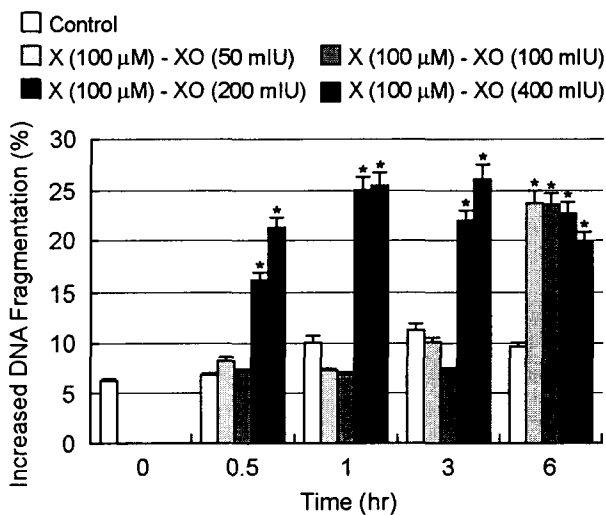


Fig. 3. Flow cytometric histogram of ejaculated human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3, and 6 hr in the presence of xanthine-xanthine oxidase. (A) 0.5 hr of incubation; (B) 1 hr of incubation; (C) 3 hr of incubation; (D) 6 hr of incubation; (E) comparison of the percentage of sperm with DNA fragmentation obtained after sperm chromatin structure assay (SCSA) analysis. Data are presented as means ± SEM (n=3). (*) p<0.01; compared with untreated control.

DNA fragmentation을 알아본 결과는 다음과 같다. 30분 처리군에서 DNA fragmentation은 H₂O₂에서 125 μM ~ 1 mM 처리군 (24.4±3.5, 15.9±3.2, 18.0±4.5, 16.7±3.6%)까지 모든 처리군에서 대조군 (6.6±3.7%)에 비해 유의하게 높게 나타났다. 1시간 처리군에서 DNA fragmentation은 H₂O₂를 처리한 모든 군에서 대조군 (5.2±4.7%)에 비해 유의하게 높게 나타났다

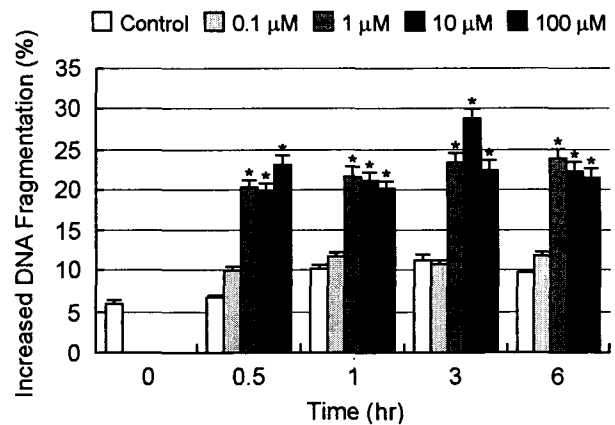


Fig. 4. Flow cytometric histogram of ejaculated human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3, and 6 hr in the presence of sodium nitroprusside. (A) 0.5 hr of incubation; (B) 1 hr of incubation; (C) 3 hr of incubation; (D) 6 hr of incubation; (E) comparison of the percentage of sperm with DNA fragmentation obtained after sperm chromatin structure assay (SCSA) analysis. Data are presented as means ± SEM (n=3). (*) p<0.01; compared with untreated control.

(p<0.01). 처리농도간에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 3시간 처리군 (25.4±3.5, 24.5±3.6, 24.2±4.7, 24.0±3.6%)에서도 대조군 (11.2±4.8%)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.01). 6시간 처리군 역시 3시간 처리군과 유사한 양상을 보여주고 있다. 각각의 처리군에서 30분에서 6시간까지의 처리시간에 따른 DNA 절편화 변화양상은 30분 처리군에서 저농도 처리군 (125, 250 μM)에서 DNA 절편화의 증가가 두드러질 뿐 나머지 처리군에서는 처리시간이 늘어남에 따른 DNA 절편화의 증가는 차이가 없는 것으로 나타났으나, 대조군에 비해서는 유의하게 높은 것으로 나타났다 (Fig 2, p<0.01).

2) Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO) 처리군

X (100 μM) -XO (50 mIU ~ 400 mIU)를 30분에서 6시간까지 처리한 결과는 다음과 같다. 30분 처리시 X-XO 처리군 중에서 낮은 농도를 처리한 군에서는 대조군과 차이가 없었으나, 고농도 처리군 (XO; 200~400 mIU)에서의 DNA 절편화의 변화양상은 대조군 (10.0±2.7%)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.01). 1시간과 3시간 처리군에서도 낮은 농도 처리군에서는 차이가 없었으나, 고농도를 처리한 군에서는 DNA 절편화의 변화양상이 대조군에 비해 다소 높은 것으로 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 6시간 처리군에서는 처리된 모든 군에서 대조군에 비해서 높게 나타났다. 처리시간에 따른 X-XO 농도간의 DNA 절편화의 변화는 낮은 농도 군에서는 차이가 없었으나, 고농도를 처리한 군에서는 처리시간에 따라 DNA fragmentation이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

3) Sodium nitroprusside (NO donor) 처리군

NO를 0.1 μM ~ 100 μM까지 처리한 결과는 다음과 같다.

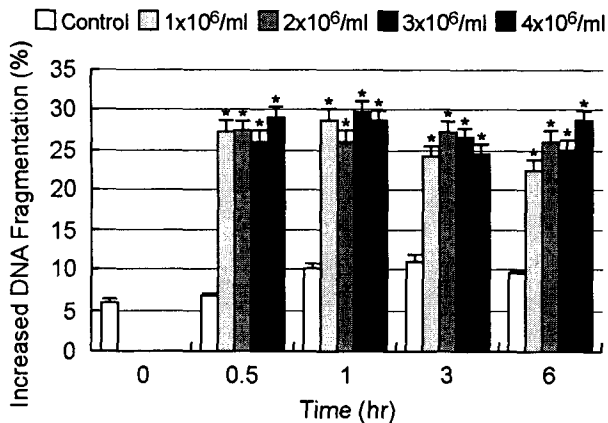


Fig. 5. Flow cytometric histogram of ejaculated human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3, and 6 hr in the presence of lymphocytes. (A) 0.5 hr of incubation; (B) 1 hr of incubation; (C) 3 hr of incubation; (D) 6 hr of incubation; (E) comparison of the percentage of sperm with DNA fragmentation obtained after sperm chromatin structure assay (SCSA) analysis. Data are presented as means \pm SEM (n=3). (*) $p < 0.01$; compared with untreated control.

30분에서부터 6시간 처리군까지 처리농도에 따른 DNA 절편화 변화양상은 저농도군 (0.1 μ M)을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보여주고 있으며, 처리시간에 따른 변화양상은 30분 처리시의 상해정도가 유지되어지는 양상을 보여주고 있다 (Fig. 4, $p < 0.01$).

4) Lymphocyte 처리군

Lymphocyte를 1×10^6 /ml ~ 4×10^6 /ml까지 처리한 군에서의 처리농도 및 처리시간에 따른 결과는 다음과 같다. 30분에서부터 6시간 처리군까지 처리농도에 따른 DNA 절편화 변화양상은 모든 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보여주고 있으며, 처리시간에 따른 변화양상은 30분 처리시의 상해정도가 유지되어지는 양상을 보여주고 있다. 즉, NO 처리군과 유사한 양상을 보여주고 있으나, 처리농도간의 차이가 없다는 점이 다른 것으로 나타났다 (Fig. 5, $p < 0.01$).

5) Low (5%) O₂ 처리군

5% O₂를 시간별로 처리하여 대조군 (20% O₂)과 DNA 절편화 변화양상을 비교한 결과는 다음과 같다. 5% O₂ 처리군과 대조군 사이에 처리시간에 따른 DNA 절편화 변화양상은 차이가 없는 것으로 나타났다. 다만 대조군에서 3시간부터 DNA fragmentation이 증가하는 경향을 보이고 있으나, 5% O₂ 처리군에서는 초기 30분 처리시의 DNA 절편화 양상에서 변화가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 6).

고 찰

반응성 산소종에 의한 DNA의 상해 또는 불안정성의 증가에 대한 연구는 초기 단계이다. Sakkas³²⁾ 등에 의하면, 핵의

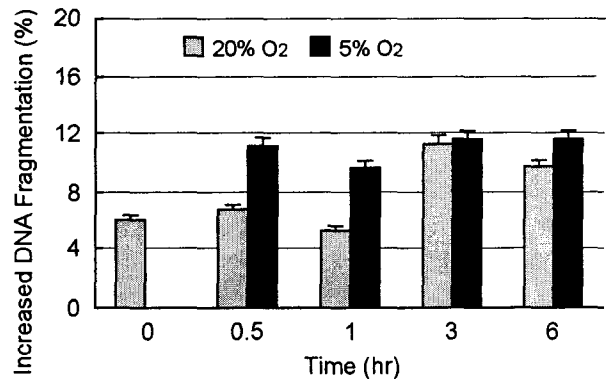


Fig. 6. Flow cytometric histogram of ejaculated human sperm suspension incubated under low (5%) or ambient (20%) oxygen tension after incubation for 0.5, 1, 3, and 6 hr. (A) 0.5 hr of incubation; (B) 1 hr of incubation; (C) 3 hr of incubation; (D) 6 hr of incubation; (E) comparison of the percentage of sperm with DNA fragmentation obtained after sperm chromatin structure assay (SCSA) analysis. Data are presented as means \pm SEM (n=3). (*) $p < 0.01$; compared with untreated control.

packaging은 정자형성 (spermiogenesis) 초기부터 진행되어져 온 매우 정교하고, 복잡한 과정을 거치면서 주된 핵 단백질인 histone이 protamine으로 대체되어지는 과정이다^{21,26)}. Sakkas³³⁾ 등에 의하면, 정자의 염색질을 일반 세포의 1/200 정도까지 응축시키는 과정은 histone이 protamine으로 대체되면서 protamine의 cysteine 분자간의 disulfide 결합에 의해 이루어지며, 이 과정에서 DNA의 ligation과 cutting 과정을 복잡하게 거치게 된다. 정상적인 정자형성과정에서 일어나는 DNA single strand breakage를 *in situ* nick translation¹⁾, TUNEL assay, single cell electrophoresis (Comet assay) 등의 방법으로 확인할 수 있다.

지금까지 보고에 의하면 사람 정자에서, comet assay를 통한 DNA single strand breakage 정도와 SCSA를 통한 염색질의 불안정성 (instability) 간에는 확실한 관련이 있는 것으로 알려졌다. 즉 본인의 결과에서도 일치하는 결과를 얻었다. 즉 반응성 산소종에 의해 야기되는 DNA single strand breakage를 ($9.0 \pm 1.0 \sim 46.0 \pm 4.6\%$)과 DNA 절편화율 ($7.5 \pm 1.0 \sim 29.5 \pm 4.6\%$)에 있어서 산소종의 종류 및 처리시간에 대한 결과들이 거의 같은 양상을 보여주고 있었다. 이러한 결과들은 DNA의 상해는 곧 정자의 염색질의 불안정성을 야기하게 되고, 이러한 불안정성은 수정 후 수정란의 유전적 결함을 야기하는 원인으로 작용할 것으로 사료된다.

지금까지 보조생식술에 있어서 정자의 핵 성숙도는 남성의 임신능력에 있어 중요한 요인으로 여겨져 왔으며, 주된 검사의 종류였다. 그러나 지금까지의 정자의 핵 성숙도를 가름하는 가장 큰 척도는 정자의 형태였다. 즉, 형태가 정상적이지 못한 경우는 정자형성과정 중에 핵 응축과정에 있어 문제가 있었던 경우로 판단하였고, 수정시에 문제를 야기시키

는 것으로 보고되어 왔다^{16,24}). 또한 응축이 제대로 일어나지 못한 정자나 DNA 상해를 입은 정자는 탈응축과정에 문제를 야기시켜 수정에 실패하는 것으로 보고되고 있다^{31,33}).

사정된 정자의 DNA에 핵 또는 mitochondria 수준의 기형이 존재한다는 것은 밝혀진 일들이며^{30,32}), 자연적인 DNA 상해 정도는 약 10% 정도로 보고되고 있다^{21,32,33}). 또한 본 실험에서도 대조군의 DNA single strand breakage와 DNA 절편화율은 동결 및 해빙한 정자임에도 10~15% 정도임을 확인할 수 있었다. 비정상적인 정자요인들을 가지고 있는 남성들에게서 발견되어지고 있는 이러한 기형들은 보조생식술 (ART; assisted reproductive technology) 분야에서 상당한 위험성을 수반하고 있는 ICSI라는 방법으로 임신이 시도되고 있다.

이러한 ICSI 방법을 이용한 수정법은 숙련된 전문가의 손에 의해 시행되어지고 있기는 하지만 완벽하게 검증되어지지 못한 정자가 수정에 참여하고 있다는 것은 사실이다. 한편, 지금까지의 ICSI에 관한 많은 보고에 의하면, 비정상적인 DNA를 가진 정자가 지금까지 시행되어져 온 보조생식술 진행과정에서 충분히 제거되어지고 있기 때문에 정자의 탈응축이라든지 전핵의 형성이 정상적으로 진행되어진다고 여길 수 있지만²⁵), 사람의 경우, 수정난이 4-세포기가 될 때까지는 모계에서 전해져 온 DNA에 의해서 발생이 진행되어지는 것으로 알려져 있기 때문에²) 정자 DNA의 상해는 사람의 경우, 착상시기에 이르러서야 영향을 끼칠 것으로 보고⁹)하고 있으며, 그 영향이 미치는 범위에 대해 예견할 수 있다고 사료된다.

아직까지 정자의 DNA 절편화의 원인은 정자형성과정에서의 문제 이외는 불분명한 상태이지만, 반응성 산소종에 의한 체세포에서의 DNA 상해는 보고되어지고 있다³). 본 실험에서도 superoxide anion, hydroperoxide, nitroxide와 같은 다양한 반응성 산소종들에 의한 농도-시간에 따른 DNA 상해를 확인하였다 (Fig 1, -2, -3). 반응성 산소종에 노출되어진 초기에서부터 DNA 상해가 시작되어지고 그 후의 증가 추세가 완만한 것으로 나타난 결과는 DNA 구성물질이 반응성 산소종에 대해 얼마나 취약한가를 보여주고 있다고 사료된다. 또한 정자성숙과정 (spermiogenesis)에 문제가 발생하여, 정액검사에서 남성불임요인으로 확인된 환자에 있어서 정액을 다루는데 있어 보다 세심하고 정밀한 관리가 필요함을 제시해 주고 있다고 사료된다.

이상의 결과로 보아, 반응성 산소종이 체외에서의 정자의 DNA 상해의 주원인임을 알 수 있다. 또한 DNA에 상해를 줄 수 있는 반응성 산소종은 모든 것에 의한다는 것을 보여주고 있다. 저산소 상태에서의 DNA 상해정도가 기존의 산소 농도 (20%)를 사용한 경우에 비해 낮았다는 결과가 제시하는 바가 크다고 사료된다. 정자를 다루는데 있어 반응성 산소종의 발생을 유발할 수 있는 부분을 배제하고, 반응성 산소종을

상쇄시킬 수 있는 강력한 배양액의 개발과 저산소 상태에서 의 배양 등이 난자 관입 후 난자에 의해 치유할 수 없는 정도의 상해를 받지 않도록 하는 방법이라 제시되어진다. 특히, 배양액 부분에 있어서는 특정한 반응성 산소종을 대상으로 하는 것은 무의미하다는 것을 본 연구의 결과는 보여주고 있다. 모든 반응성 산소종에 의해 DNA 상해가 단시간 내에 나타나기 때문에 전체적이고 포괄적인 항산화제의 개발과 발생 자체를 억제할 수 있는 과정의 정립이 시급하다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Bianchi PG, Manicardi GC and Urner F (1996): Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, **2**: 139-144.
- 2) Braude P, Bolton V and Moore S (1988): Human gene expression first occur between the four and eight cell stages of preimplantation development. *Nature*, **332**: 459-461.
- 3) Butke TM and Sandstrom PA (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, **15**: 7-10.
- 4) Cathcart R, Schwiens E, Saul RL and Ames BN (1984): Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat uterine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**: 5633-5637.
- 5) De Croo I, Van der Elst J and Everaert K (1998): Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, **13**: 1893-1897.
- 6) De Lamirande E and Gagnon C (1992b): Reactive oxygen species and human spermatozoa II- Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl*, **13**: 5379-5386.
- 7) Evenson DP and Jost LK (1994): Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. Flow cytometry, part B. (2nd eds.) Academic Press, Orlando, USA, pp. 159-175.
- 8) Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M and Wong PK (1986): Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **137**: 841-846.
- 9) Fossa SD, De Angelis P and Kraggerud SM (1997): Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*, **30**: 192-196.

- 10) Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbrock JH, Jacob RA and Ames B (1991): Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 11003-11006.
- 11) Gagnon C, Iwasaki A, de Lamirande E and Kovalski N (1991): Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci*, **637**: 409-416.
- 12) Golan R, Copper TG and Oschry Y (1996): Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod*, **11**: 1457-1462.
- 13) Golan R, Shochat I and Weissenberg R (1997): Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Hum Reprod*, **3**: 47-54.
- 14) Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y and Mori T (1992): Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. *Free Radic Biol Med*, **13**: 47-53.
- 15) Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP and Lannou DL (1995b): Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense system in human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, **103**: 17-26.
- 16) Hoshi K, Katayose H and Yanagida K (1996): The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nucleic acid and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril*, **66**: 634-639.
- 17) Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ and Thompson W (1996): A comparison of baseline and induced DNA in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod*, **2**: 613-619.
- 18) Ji BT, Shu XO and Linet MS (1997): Parental cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Nat Cancer Inst*, **89**: 238-244.
- 19) Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A and Tanooka H (1986): Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, **7**: 1849-1851.
- 20) Komada H, Yamaguchi R, Fukada J, Kasai H and Tanaka T (1997): Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*, **68**: 519-524.
- 21) Kramer JA and Krawetz SA (1997): RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod*, **3**: 473-478.
- 22) Kurinczuk JJ and Bower C (1997): Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *Br Med J*, **315**: 1260-1266.
- 23) Liu DY and Baker HWG (1992): Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm zona-pellucida binding, and fertilisation rates *in vitro*. *Fertil Steril*, **58**: 1178-1184.
- 24) Lolis D, Georgiou I and Syrrou M (1996): Chromycin A3 staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *Int J Androl*, **19**: 23-27.
- 25) Lopes S, Sun JG and Jurisicova A (1998): Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **69**: 528-532.
- 26) Meistrich ML (1993): Nuclear morphogenesis during spermatogenesis. In: de Kretser D (eds.), *Molecular biology of the male reproductive system*. Academic Press, USA, pp. 67-97.
- 27) Nasr-Esfahani MH, Aitken JR and Johnson MH (1990): Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* and *in vivo*. *Development*, **109**: 501-507.
- 28) Rodriguez H, Obanian C and Bustos-Obregon E (1985): Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa *in vitro*: A method for evaluating the fertilizing ability of ovine sperm. *Int J Androl*, **8**: 147-158.
- 29) Rufas O, Fish B, Seligman J, Tadir Y, Ovadia J and Shalgi R (1991): Thio status in human sperm. *Mol Reprod Dev*, **29**: 282-288.
- 30) St John JC, Cook ID and Barratt CL (1997): The use of long PCR to detect multiple deletions in the mitochondrial DNA of human testicular tissue from azoospermic and severe oligozoospermic patients. In: *Genetics of human male infertility*. Paris Editions EDK, pp 333-347.
- 31) Sakkas D, Uner F and Bianchi PG (1996): Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **11**: 837-843.
- 32) Sakkas D, Bianchi PG, Manicardi G, Bizzaro D and Bianchi U (1997): Chromosome packaging anomalies and DNA damage in human sperm: their possible implications in the treatment of male factor infertility. In: *Genetics of human male infertility*. Paris: Editions EDK, pp 205-221.
- 33) Samocha-Bone D, Lewin LM and Weissenberg R (1998): In-vitro human spermatozoa nuclear decondensation assessed by flow cytometry. *Mol Hum Reprod*, **11**: 837-843.
- 34) Sun JG, Jurisicova A and Casper RF (1997): Detection of

- deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*, **56**: 602-607.
- 35) Twigg JP, Irvain DS and Aitken RJ (1998): Oxidative damage to DNA in human sperm does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**: 1864-1871.
- 36) Yamaguchi R, Hirano T, Asami S, Chung MH, Sugita A and Kasai H (1996): Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in DNA and its repair activity in rat kidney after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Carcinogenesis*, **17**: 2419-2422.
-