

개 정소상체 정자의 난자내 침입율과 동결융해 후의 생존성에 관한 연구

박종민·김상근[†]
충남대학교 수의학과

Studies on the Number of Sperm Penetrated Oocytes and Survival Rate of Frozen-thawed Epididymal Dog Sperm

Park, J. M. and S. K. Kim[†]

Dept. of Veterinary Medicine, Chungnam National University

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the general characteristics such as concentration, sperm motility and abnormality of sperm on the whole epididymal semen(EWS), RSP-S(removed seminal plasma by saline) and RSP-T(removed seminal plasma by tris-buffer) semen and survival rates after freezing on motility of whole and RSP-S and RSP-T semen and extender containing 2~8% glycerol, and ability of frozen-thawed sperm to penetrate homologous oocytes.

1. The concentration, motility and abnormality of epididymal WES, RSP-S and RSP-T sperm were $4.25 \pm 0.25(\times 10^6 \text{ cells/ml})$, $3.85 \pm 0.20(\times 10^6 \text{ cells/ml})$, $4.05 \pm 0.28(\times 10^6 \text{ cells/ml})$, $50.55 \pm 2.75\%$, $67.25 \pm 2.55\%$, 78.75 ± 3.55 and $9.45 \pm 2.25\%$, $37.75 \pm 2.10\%$, $24.25 \pm 1.55\%$, respectively.
2. The survival rates of slow and rapid frozen epididymal RSP-S and RSP-T sperm were $35.00 \pm 2.35\%$, $45.50 \pm 2.15\%$ and $16.50 \pm 3.55\%$, $22.55 \pm 3.95\%$, respectively. The survival rate of epididymal WES and RSP-T sperm after freezing following dilution with tris-buffer containing 2~8% glycerol were $9.25 \pm 1.55\%$ ~ $17.50 \pm 2.50\%$.
3. The percentage of capacitated and acrosome-reacted sperm prior to culture for fresh and frozen-thawed epididymal RSP-T semen were $45.25 \pm 5.75\%$, $7.06 \pm 0.25\%$, $48.20 \pm 6.80\%$ and $13.00 \pm 2.35\%$, $3.55 \pm 0.85\%$, $15.50 \pm 1.90\%$, respectively. The penetration rate the number of sperm per penetrated for fresh and frozen-thawed epididymal RSP-T sperm were $39.25 \pm 4.72\%$, $34.24 \pm 3.93\%$ and 1.30 ± 0.33 , 1.10 ± 0.50 ., respectively.

(Key words : Epididymal sperm, RSP-S, RPS-T, Freezing, Survival rate)

I. 서론

최근 들어 애완동물의 사육수가 급격히 증가하면서 번식을 위해 고가의 종견이 수입되어 수정에

이용되고 있으나 가끔 불임견이 되어 번식에 이용되지 못하므로 많은 외화의 낭비가 되고 있는 실정이다. 고가의 종견이 어떤 원인에 의해 불임이 되거나 정자수가 희박하여 자연수정이 이루어지지 않을 때 정자의 난자의 세포질내 미세주입이나 정

[†] Corresponding author : Coll. of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ., Taejon, 305-764, Korea. E-mail: kskkim@cuvic.cnu.ac.kr

소상체 정자를 이용하여 수정시킬 수 있다(Firedler 등, 1998; Garreis 등, 1998; Holden 등, 1997). 개 정액은 정장내에 유리되어 있는 원형질 소적(cytoplasmic droplets)은 많은 lysosomal enzyme을 포함하고 있어 정자의 생존성에 유해한 것으로 알려져 있는데(Dott와 Dingle, 1968; Allison과 Hartree, 1970; Allen과 England, 1992) 이러한 방법을 통하여 개 정액을 동결시키는 방법들이 보고되고 있다(김, 2001; Olar, 1984; Smith, 1984).

Marks 등(1994)은 안락사 시킨 개 정소상체로부터 정액을 채취하여 동결 용해하였으나 생존율은 극히 저조하였다고 하였으며, Hewitt와 England (1998)는 사출정자와 정소상체 정자와는 정자의 활력과 농도 및 생존성에 차이가 있고 성숙시 형태적인 변화는 두부의 형태 즉 침체모 크기의 감소, 미부의 세포질 소적의 부착이며 정소상체 통과 시 기능적 발달은 정자의 수정율에 영향을 미친다고 하였으며, Watson 등(2000)은 정자의 크기와 형태의 차이는 동결 용해시 삼투압적 손상에 영향을 미친다고 하였다. 미숙정자는 수정이 잘 안되고 사출 또는 정소상체 정자의 형태적, 기능적 차이는 막 전압에 영향을 미치고 cold shock 감수성, 삼투압 stress에 대한 저항에 차이가 있으며 정액의 동결시 희석은 cold shock로 부터 세포막을 보호할 수 있는 내동제(egg yolk, glycerol 등)는 독성쇼크를 예방할 수 있는 적절한 농도이어야 하고 에너지원은 삼투압 쇼크를 예방할 수 있어야 한다(Neville 등, 1970; England, 1993). 이에 대해 Rota 등(1996)은 tris-buffer액에 0.5%의 Equex STM paste를 첨가하여 급속동결시 유의한 정자생존율과 활력을 나타냈다고 하였으며, Hewit 등(2001)은 안락사 시킨 개의 정소상체 정액을 1.0% saline과 희석후 6% glycerol을 첨가한 4.0 ml의 Anderson's buffer로 희석했을 때 평균 정자농도는 $30 \sim 260 (\times 10^6 \text{ ml})$ 와 동결 용해후의 생존율은 $7.2 \pm 4.2\%$ 의 생존율을 나타냈다고 하였다. 이러한 보고들을 살펴 볼 때 사출된 신선정액의 동결과는 달리 정소상체 정자의 동결시 적정농도의 희석액과 내동제가 필요하며 아울러 사출된 신선정액과는 다른 동결방법의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

본 연구는 채취한 개 정소상체 정자의 일반성상과 동결방법과 glycerol 농도가 동결용해후 생존성에 미치는 영향과 체외성숙한 난자와 정소상체 정자를 매정시켰을 때 정자 침입율과 수정율을 조사하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

시험에 이용한 개는 진도잡견으로서 자연수정이 안되는 개 2두와 국소처치로 거세한 개 3두 또는 도살견으로부터 적출한 정소를 시험에 이용하였다.

2. 정액의 채취

정소상체를 적출하여 PBS액에 침지한 후 실험실로 옮긴 다음 정소상체 미부와 정관으로부터 채취한 정액을 시험에 이용하였다.

3. 정자의 동결 및 용해

채취한 정소상체 정액을 1:3의 생리식염수(RSP-S)와 tris-buffer 액(RSP-T, tris-buffer 2.4 g, citric acid 1.4 g, fructose 0.8 g, Na-benzylpenicillin 0.06 g, streptomycin sulphate 0.1 g을 증류수 100 ml에 용해)으로 희석하여 700g으로 6분간 원심분리하여 상층액을 버리고 하층의 정액을 동결희석액으로 2단계 희석하였다. 희석정액은 0.25 ml의 straw에 주입하여 김(2001)의 방법으로 완만 및 급속동결을 실시하였다. 용해는 동결 후 2~4주간 보존된 straw를 실온에 30초간 방치후 37°C의 항온수조내 온수에서 용해 후 tris-buffer액에 옮겨 시험에 이용하였다.

4. 체외수정

적출한 개 난소로부터 난포란을 회수하여 2 IU/ml의 hCG(Sigma, U.S.A)와 1 µg/ml의 β-estradiol (Sigma, U.S.A.)과 10%(v/v)의 FCS(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 SOF(Sigma, U.S.A.) 배양액으로 배양하였다. 난포란의 체외성숙은 mineral oil (Squibb, U.S.A.)로 피복된 50 µl의 소적내에 5~10개의 난

포란을 주입하여 CO₂ 배양기(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 40~48 시간 배양하였다. 체외성숙이 끝난 난포란을 배양액 소적에 넣고 신선 또는 정소상체 정자를 전 처리하여 수정능획득을 유기한 정자부유액 2μl을 주입 후 8~12시간의 매정으로 수정시켰다.

5. 생존성 검사

생존성검사는 용해한 정액 sample을 slide glass에 옮겨 현미경하에서 관찰하거나, 정자분석계(SQA-IIB, Israel)로 활력, 생존정자수, 형태적 검사 등을 실시하였다.

6. 통계학적 분석

시험결과는 분산분석에 의해 표준편차와 처리간의 유의차를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 정소상체 정자의 일반 성상

정소상체 미부로부터 채취한 원정액(WES)과 정액을 RSP-S와 RSP-T액으로 희석한 정액의 일반성상은 Table 1과 같다.

WES, RSP-S 및 RSP-T 희석정액의 정자수는 각각 $4.25 \pm 0.25(\times 10^6 \text{ cells/ml})$, $3.85 \pm 0.20(\times 10^6 \text{ cells/ml})$, $4.05 \pm 0.28(\times 10^6 \text{ cells/ml})$ 이었고, 활력은 각각 $50.55 \pm 2.75\%$, $67.25 \pm 2.55\%$, $78.75 \pm 3.55\%$ 이었고, 기형정자율은 각각 $49.45 \pm 2.25\%$, $37.75 \pm 2.10\%$, $24.25 \pm 1.55\%$ 이었다. 이러한 결과는 정소상체 정액의 일반성상에 대한 보고를 찾을 수 없

어 정확하게 비교할 수는 없지만 김(2001)의 사출신선정액의 $4.55 \pm 0.45\% \sim 5.45 \pm 0.82(\times 10^6 \text{ cells/ml})$ 의 정자수와 $90.10 \pm 3.42 \sim 95.55 \pm 4.65\%$ 의 활력과 $4.45 \pm 0.45\% \sim 9.90 \pm 0.68\%$ 의 기형정자수에 비해 낮은 정자수와 활력 및 높은 기형정자율을 나타냈다.

2. 정소상체 정액의 완만 및 급속동결

정소상체 정액을 RSP-T로 희석 후 원심분리에 의해 정장을 제거한 다음 동결 희석액 -1, -2 및 -3액으로 4°C에서 평형 냉각시킨 다음 완만 및 초급속 동결 후 용해했을 때 생존율은 Table 2와 같다.

WES, RSP-S와 RSP-T 희석정액을 완만동결을 했을 때 생존율은 각각 $25.55 \pm 1.85\%$, $35.00 \pm 2.35\%$, $45.50 \pm 2.15\%$ 였으며, 초급속 동결시의 생존율은 $7.50 \pm 1.90\%$, $16.50 \pm 3.55\%$, $22.55 \pm 3.95\%$ 로 희석처리하지 않은 원정액에 비해 높은 생존율과 초급속 동결에 비해 완만동결이 높은 생존율을 나타냈다. 이러한 결과는 동일한 보고를 접할 수

Table 2. Survival rates of epididymal WES, RSP-S and RSP-T sperm after freeze-thawing by slow and rapid methods

Type of semen	Slow freezing	Rapid freezing
WES	25.55 ± 1.85	7.50 ± 1.90^a
RSP-S	35.00 ± 2.35	16.50 ± 3.55
RSP-T	45.50 ± 2.15	22.55 ± 3.95^b

* Values with different superscripts within column were significantly different($p < 0.05$).

Table 1. The concentration, motility and abnormality of epididymal WES, RSP-S and RSP-T sperm

Type of semen	Sperm concent. ($\times 10^6 \text{ cells/ml}$)	Motility (%)	Abnormal sperm(%)
WES	4.25 ± 0.25	50.55 ± 2.75	49.45 ± 2.25
RSP-ES	3.85 ± 0.20	67.25 ± 2.55	37.75 ± 2.10
RSP-ET	4.05 ± 0.28	78.75 ± 3.55	24.25 ± 1.55

* WES : Whole epididymal semen, RSP-S : Removed seminal plasma of epididymal semen by saline, RSP-T : Removed seminal plasma of epididymal semen by tris-buffer.

없이 정확하게 비교할 수는 없지만 Hewit 등(2001)이 안락사 시킨 개의 정소상체 정액을 1.0% saline 과 희석후 6% glycerol을 첨가한 4.0 ml의 Anderson's buffer로 희석했을 때 평균 정자농도는 $30 \sim 260(\times 10^6 \text{ ml})$ 와 초급속 동결 용해후의 생존율 $7.2 \pm 4.2\%$ 에 비해 높은 생존율을 나타냈다.

3. 정소상체 정액의 동결시 glycerol 농도에 따른 생존성

정소상체 정액을 RSP-T로 희석 후 정장을 제거한 다음 내동제에 glycerol 농도를 2.0~8.0%로 각각 첨가하여 초급속 동결 용해했을 때 생존율은 Table 3과 같다.

RSP-ET 희석정액을 동결시 내동제에 glycerol 농도를 2.0, 4.0, 6.0, 8.0% 첨가하여 동결했을 때 생존율은 각각 $9.25 \pm 1.55\% \sim 17.50 \pm 2.50\%$ 로서 신선정액의 $25.50 \pm 4.50\% \sim 34.00 \pm 5.15\%$ 에 비해 낮은 생존율을 나타냈으며 대체로 glycerol 첨가농도가 높을수록 높은 생존율을 나타냈다. Hewit 등

Table 3. Survival rates of fresh and frozen-thawed epididymal RSP-T sperm after dilution with tris-buffer containing 2~8% glycerol

Glycerol(%)	Fresh semen	Frozen-thawed semen
2.0	25.50 ± 4.50	9.25 ± 1.55^a
4.0	30.55 ± 5.80	10.80 ± 2.65
6.0	28.05 ± 4.25	13.85 ± 1.90
8.0	34.00 ± 5.15	17.50 ± 2.50^b

* Values with different superscripts within column were significantly different($p < 0.05$).

Table 4. Rate of capacitation and acrosome reaction prior to culture for fresh and frozen-thawed epididymal RSP-T sperm

Parameter	Semen of fresh epididymal	Semen of frozen-thawed epididymal
Capacitated sperm	45.25 ± 5.75	13.00 ± 2.35
Acrosome-reacted sperm	7.06 ± 0.25	3.55 ± 0.85
Live sperm	48.20 ± 6.80^a	15.50 ± 1.90^b

* Values with different superscripts within column were significantly different ($p < 0.05$).

(2001)이 안락사 시킨 개의 정소상체 정액을 2~8%의 glycerol을 첨가한 4.0 ml의 Anderson's buffer로 희석후 동결 용해했을 때 $10.0 \pm 5.6\% \sim 17.2 \pm 2.6\%$ 와 비교할 때 유사한 결과이었다.

4. 동결 정소상체 정자의 수정능획득 및 침체반응

정소상체 정액을 RSP-T로 희석 후 원심분리에 의해 정장을 제거한 다음 내동제인 extention-1, -2 및 -3액으로 4°C에서 평형 냉각시킨 다음 초급속으로 동결 용해한 정자의 수정능획득, 침체반응 및 생존율은 Table 4와 같다.

동결 용해한 정소상체 희석정자의 평균 수정능획득율과 침체반응 및 생존정자수는 각각 $13.00 \pm 2.35\%$, $3.55 \pm 0.85\%$, $15.50 \pm 1.90\%$ 로서 신선 정소상체 희석정액의 $45.25 \pm 5.75\%$, $7.06 \pm 0.25\%$, $48.20 \pm 6.80\%$ 에 비해 낮은 수정능획득율과 침체반응을 나타냈다. 이러한 결과는 동결정자가 신선정자에 비해 낮은 수정능획득율과 침체반응을 나타냈는데 이는 동결시 막 전압의 영향, cold shock 감소, 삼투압 stress에 대한 저항에 차이로 사료된다(Neville 등, 1970; England, 1993).

5. 정소상체 신선 및 동결정자와 난자와 매정시 수정율

정장을 제거한 RSP-T 희석정액을 성숙 배양시킨 난자와 CO₂ 배양기에서 매정시켰을 때 난자내 침입율 및 수정율은 Table 5와 같다.

신선 및 동결 수정능획득 정자를 난자와 매정시켰을 때 난자내 정자의 침입율은 각각 $39.25 \pm 4.72\%$ 와 $34.24 \pm 3.93\%$ 였고, 난자당 정자의 침입수는 각각 1.30 ± 0.33 개, 1.10 ± 0.50 개이었다. 이러한 결과는 Hewit 등(2001)이 안락사 시킨 개의

Table 5. Number of sperm per penetrated oocytes for fresh and frozen-thawed epididymal RSP-T sperm after incubation in TCM-199 for 10 h

Parameter	Fresh semen	Frozen-thawed semen
Oocytes penetrated	39.25 ± 4.72	34.24 ± 3.93 ^a
No. of sperm per penetrated oocytes	1.30 ± 0.33	1.10 ± 0.50 ^b

* Values with different superscripts within column were significantly different (p<0.05).

정소상체 신선 및 동결정자를 난자와 각각 매정시켰을 때 난자당 정자의 침입율 23.6 ± 8.3~27.2 ± 7.5%와 난자내 침입한 정자수 1.44 ± 0.6~1.30 ± 0.7개와 비교할 때 정자의 침입율은 높았고 난자당 침입한 정자수는 유사한 결과이었다. 한편 Yamada 등(1993)은 배란전의 개 난자를 배양하여 성공적으로 체외성숙 및 수정하였다고 보고하였다.

IV. 요약

본 연구는 불임견의 번식장애를 해결할 목적으로 개 정소상체로부터 채취한 정액을 tris-buffer로 원심분리하여 정장을 제거한 RSP-T 희석 정자의 일반성상과 동결방법 및 glycerol 농도가 동결융해 후 생존성에 미치는 영향과 난자와 정소상체 정자를 매정시켰을 때 정자침입율을 조사하기 위하여 수행하였다.

1. WES, RSP-S 및 RSP-T 희석 정소상체 정액의 정자수는 각각 4.25 ± 0.25(×10⁶ cells/ml), 3.85 ± 0.20(×10⁶ cells/ml), 4.05 ± 0.28(×10⁶ cells/ml)이었고, 활력은 50.55 ± 2.75%, 67.25 ± 2.55%, 78.75 ± 3.55%이었고, 기형정자율은 49.45 ± 2.25%, 37.75 ± 2.10%, 24.25 ± 1.55%이었다.
2. RSP-S와 RSP-T 희석 정소상체 정액을 완만 동결을 했을 때 생존율은 각각 35.00 ± 2.35%, 45.50 ± 2.15%와 초급속동결시의 생존율은 16.50 ± 3.55%, 22.55 ± 3.95%이었다. RSP-T 희석 정소상체 정액을 동결시 내동제에 glycerol 농도를 2.0~8.0% 첨가하여 동결했을 때 생존율은 각각 9.25 ± 1.55%~17.50 ± 2.50%로서 신선정액의 25.50 ± 4.50%~34.00 ± 5.15%에 비해 낮은 생존율을 나타냈다.

3. 동결 용해한 정소상체 희석정자의 평균 수정능 획득율과 침체반응 및 생존정자수는 각각 13.00 ± 2.35%, 3.55 ± 0.85%, 15.50 ± 1.90%였고, 신선 정소상체 정액의 45.25 ± 5.75%, 7.06 ± 0.25%, 48.20 ± 6.80%이었다. 신선 및 동결 수정능획득 정자를 난자와 매정시켰을 때 난자내 정자의 침입율은 각각 39.25 ± 4.72%와 34.24 ± 3.93%였고, 난자당 정자의 침입수는 각각 1.30 ± 0.33개, 1.10 ± 0.50개이었다.

V. 인용문헌

1. Allen, A. C. and England, G. C. W. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, 37(2):373-381.
2. Allison, A. C. and Hartree, E. F. 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.*, 21:501.
3. Dott, H. M. and Dingle, J. T. 1968. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Exp. Cell Res.*, 52:523.
4. England, G. C. W. 1993. Cryopreservation of dog semen : a review. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47: 243-255.
5. Firedler, S., Raziell, A., Soffer, Y., Strassburger, D., Komarovky, D. and Ron-EL, R. 1998. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermia-a comparative study. *Hum. Reprod.*, 13:1872-1877.

6. Garreis, K. L., Zini, A. S., Casper, R. F., Merino, J. S. and Jarvi, K. A. 1998. Fresh and frozen epididymal sperm yield comparable pregnancy rates for intracytoplasmic sperm injection. *Arch. Androl.*, 41:159-165.
7. Hewitt, D. A. and England, G. C. W. 1997. The canine oocyte penetration assay its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 50:123-139.
8. Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M. and England, G. C. W. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 67 (3):101-111.
9. Holden, C. A., Fuscaldo, G. F., Jackson, P., Cato, A., Southwick, G. J., Hauser, R., Temple-Smith, P. D. and McLachlan, R. I. 1997. Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 67:81-87.
10. Marks, S. L., Mickelsen, W. D., Memon, M. A. and Platz, C. C. 1994. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 204:1639-1640.
11. Neville, W. J., Macpherson, J. W. and King, G. J. 1970. The contraceptive action of glycerol in guilts. *J. Anim. Sci.*, 31:227.
12. Olar, T. T. 1984. Cryopreservation of dog spermatozoa. Ph. D. Thesis, Colorado State University.
13. Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 1996. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. *Theriogenology*, 3:1093-1101.
14. Smith, F. O. 1984. Cryopreservation of canine semen : Technique and Performance. Ph. D. Thesis, University of Minnesota.
15. Watson, P. F. 2000. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60:481-492.
16. Yamada, S., Shimazu, Y., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of pre-ovulatory canine oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 227-229.
17. 김상근. 2001. 소형 개 RSP-S와 RSP-T 정액의 동결 용해후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 25(3):269-275.
(접수일자: 2002. 5. 3. / 채택일자: 2002. 7. 1.)