

활성산소계가 돼지 정자의 기능에 미치는 영향

김병각 · 김기중 · 이용안 · 김방진 · 김용희 · 류범용[†]

중앙대학교 동물자원과학과

Effects of Reactive Oxygen Species on the Function of Porcine Spermatozoa

Byung-Gak Kim, Ki-Jung Kim, Yong-An Lee, Bang-Jin Kim, Yong-Hee Kim and Buom-Yong Ryu[†]

Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

ABSTRACT

The current study was designed to evaluate the effects of the reactive oxygen species (ROS) generated with a xanthine (X) and xanthine oxidase system (XO) on sperm function and DNA fragmentation in porcine spermatozoa. ROS were produced by a combination of 1,000 μ M X and 50 mU/ml XO. The ROS scavengers such as superoxide dismutase (SOD) (200 U/ml) and catalase (CAT) (500 U/ml) were also tested. Spermatozoa were incubated for 2 hours in BWB medium with a combination of X-XO supplemented with or without antioxidants at 37°C under 5% CO₂ incubator. Ca-ionophore-induced acrosome reaction, the proportion of swollen spermatozoa under hypo-osmotic condition, malondialdehyde formation for the analysis of lipid peroxidation, and the proportion of DNA fragmentation were determined after 2 hours incubation. The action of ROS on porcine spermatozoa resulted in decreased Ca-ionophore-induced acrosome reaction and membrane integrity, increased the formation of malondialdehyde, and the proportion of sperm with DNA fragmentation ($p < 0.05$). The toxic effects caused by ROS were completely alleviated by CAT in terms of sperm function and characteristics, however SOD did not serve the same scavenger effect as CAT. To conclude, the ROS can cause significant damage to porcine sperm functions and characteristics, which can be minimized by the use of antioxidants.

(Key words : Spermatozoa, Reactive oxygen species, Sperm function, DNA fragmentation)

서 론

호기성(aerobic) 세포들은 세포 내에서 산소대사를 통하여 생명현상을 유지하게 된다. 이러한 과정 중에 다양한 종류의 활성산소계(reactive oxygen species; 이하 ROS)가 발생되며, 이에 따라 세포들은 일정 수준의 ROS에 지속적으로 노출되게 된다. 산소대사 과정 중 발생하는 주요 ROS로는 superoxide anion(O_2^-), peroxy radical, hydroxyl radical(OH)과 hydrogen peroxide(H_2O_2) 등이 알려져 있다. 생체 내에 존재하는 적절한 농도의 ROS는 전사인자의 활성을 통하여 세포의 신호전달 기작에 매개체로 작용하는 중요한 역할을 지니고 있다. 그러나 특정 원인으로 인하여 세포내에 과도한 양의 ROS가 발생될 경우, ROS는 다양한 질병 발생과 세포 노화 등에 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

세포에 존재하는 불포화 지방산의 산화(lipid peroxidation; 이하 LPO)는 ROS의 영향으로 나타날 수 있는 대표적인 현상이다. 포유동물의 정자는 구조적으로 plasma mem-

brane에 불포화 지방산의 함유도가 높은 특성을 지니고 있다(Jones 등, 1979). 이러한 정자 막의 구조적 특성으로 인하여 수정과정 중에 필수적인 정자의 침체반응(acrosome reaction)과 같은 막의 변화가 원활하게 수행될 수 있다. 그러나 정자는 세포질 내에 ROS의 작용을 완하시킬 수 있는 효소들의 함유 정도가 낮기 때문에 LPO를 야기시킬 수 있는 ROS의 유해성에 민감하게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Alvarez 등, 1987). 정자에 손상을 미칠 수 있는 ROS의 발생은 정자 자체에 의한 생산이나 정액에 침투된 호중성 백혈구(neutrophils)에 의한 생산 등과 같은 두 가지 측면이 주요 원인으로 보고되고 있다(Alvarez 등, 1987; Aitken과 West, 1990). 정자에 의하여 생산되는 일정 수준의 ROS는 정상적인 생리학적 과정으로서 수정 과정에 필요한 정자의 수정능획득(capacitation)이나 침체 반응을 유도하는데 도움을 주는 것으로 이해되고 있다(de Lamirande 등, 1993). 그러나 비정상적인 여러 원인으로 인하여 정액 내에 높은 수준의 ROS가 존재할 경우에는 기형정자 수의 증가나 정자 수의 감소 및 운동성 저하 등이 발생된다(Aitken 등, 1989; Mazzilli 등, 1994). 또한, 과도하게 발생된 ROS는

* 본 연구는 2007년도 중앙대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

[†] Corresponding author : Phone: +82-31-670-4687, E-mail: byryu@cau.ac.kr

정자의 DNA 수준에 까지 이상을 초래하여 정자의 보존성(integrity)에 나쁜 영향을 초래하는 것으로 보고되고 있다(Lopes 등, 1998; Smith 등, 2006). 따라서 ROS가 정자의 기능적인 측면과 특성 변화에 미치는 영향을 분석하고 ROS의 영향으로부터 정자를 보호할 수 있는 방안의 모색은 사람의 불임치료나 가축에 있어서 활용도가 높은 정액 생산 기법의 개발 등에 유용할 것으로 기대된다.

본 연구는 xanthine과 xanthine oxidase(X-XO)의 처리를 통하여 외인성으로 발생된 ROS가 돼지 정자의 기능과 성상 변화에 미치는 영향과 ROS의 영향을 완화시킬 수 있는 항산화제의 효과를 알아보고자 시행하였다.

재료 및 방법

공시정액

본 연구에서는 인공수정용으로 제조된 돼지 액상정액을 사용하였으며, 개체 간의 변이를 배제하기 위하여 2 개체 이상의 정액을 혼합하여 실험에 공시하였다.

정액처리

정액처리를 위한 기본배양액으로서 20 mM HEPES(Sigma, USA), 20 mM NaHCO₃(Sigma, USA)와 0.1 % polyvinyl alcohol(PVA; Sigma, USA)이 첨가된 Biggers Witten Whittingham(BWW) 배양액(Biggers 등, 1971)을 사용하였다.

돼지 액상정액의 처리를 위하여 샘플당 액상 정액 1 ml을 취한 후 5 ml의 기본 배양액으로 희석하여 원심분리(500×g, 5 min) 하였다. 상층액을 제거하고 정자 피를 2 ml의 기본 배양액으로 희석하여 2차 원심분리(300×g, 5 min) 하였다. 이후 기본 배양액으로 각각의 실험에 맞는 적절한 정자농도로 희석하여 추후 실험에 공시하였다. 돼지 액상정액은 17°C 온상고 내에서 보관하였으며, 액상정액 제조 일로부터 2일 이내에 사용하였다.

정자의 침체반응 분석

돼지정자의 침체반응 분석은 Cummins 등(1991)의 방법에 준하여 시행하였다. 전 처리된 정자부유액(20×10⁶ spermatozoa/ml)을 반분하여 각각을 동량의 20 μM A23187 용액(최종 농도 10 μM)과 DMSO 용액으로 희석하여 30분간 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 배양 후 정자부유액에 동량의 H33258 용액을 첨가하여 상온에서 어두운 상태를 유지하면서 7분간 염색하였다. 이후 1.5 ml의 정자부유액을 2% polyvinyl pyrrolidone(Sigma, USA)이 포함된 4 ml의 PBS column 위에 올려놓고 500×g로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 정자 피를 잘 섞어 준 후 20 μl를 취하여 슬라이드 위에 도말, 건조시킨 후 95% ethanol에서 5분간 고정하였다. 고정, 건조된 슬라이드 위에 FITC conjugated pisum sativum agglutinin(100 μg/ml) 100 μl를 떨어뜨린 후 4°C moist chamber에서 15분간 정치시켰다. 증류수로 염색액을 세척하고 건조시킨 후 정자에 염색된 형광이 사라지는 것을 방지하기 위하여 propyl gallate mountant로 봉입하였다. 침체반응의 분석은 두 장의 슬라이드에서 각각 200개 이상의 정자를 관찰하여

H33258이 염색되어 밝은 청색을 나타내는 죽은 정자와 정자 두부 전체가 염색되지 않았거나, 비정상적인 침체형태를 지닌 정자는 제외하고 침체부위가 완전히 염색된 것, 적도대(equatorial segment)가 염색되고 침체부위가 부분적으로 염색된 것, 적도대만이 염색된 정자의 총 수에서 침체 내막이 노출되고 온전한 적도대를 지닌 적도대 부위만이 염색된 정자의 비율로 대조군과 A23187 처리군 각각에서 침체반응율(%)을 조사하였다. A23187에 반응하여 나타나는 침체반응 정도는 A23187 처리군의 침체반응율에서 대조군의 침체반응율의 차이로서 산정하였다.

정자의 저장액 처리(Hypo-osmotic swelling test; HOST)

HOST는 Jeyendran 등(1984)의 방법에 준하여 시행하였다.

전 처리된 정액 300 μl(20×10⁶ spermatozoa/ml)를 fructose(Sigma, USA) 13.51 g과 sodium citrate(Shinyo, JAPAN) 7.35 g을 3차 증류수 1,000 ml에 녹여 최종 삼투압 150 mOsm/kg으로 제조된 저장성 용액 5 ml와 혼합한 후 37°C의 수조 내에서 30분간 배양하였다. 이후 500×g에서 5분간 원심 분리하였으며, 상층액을 제거한 후 정자피에서 10 μl를 취하여 깨끗한 슬라이드에 도말하고 실온에서 건조시켰다. 결과의 분석을 위하여 위상차 현미경에서 슬라이드 당 최소 200개 이상의 정자를 판독하였다. HOST후 정자 미부가 팽창된 정자의 비율은 판독한 정자의 총수에서 미부가 팽창된 정자의 비율로 계산하였다.

정자 막 지방의 산화(Lipid Peroxidation)

Lipid peroxidation은 최종 산물인 malondialdehyde를 측정하는 thiobabutaric acid(TBA) 반응법으로 분석하였다(Aitken 등, 1993b). 전 처리된 정액을 Ca²⁺, Mg²⁺이 제거된 Hank's balanced salt solution으로 희석하여 정자농도가 20×10⁶ cells/ml가 되게 조정하였다. Lipid peroxide의 malondialdehyde로의 전환을 증진시키기 위하여 3차 증류수로 희석된 1 mM ferrous sulphate(Sigma, USA)와 5 mM sodium ascorbate(Sigma, USA)를 각각 10 μl씩 상기 정자부유액 1 ml에 첨가하고 37°C에서 30분간 배양하였다. 250 μl의 40% trichloroacetic acid(Sigma, USA)를 첨가하고 0°C에서 10분간 정치하여 lipid peroxidation을 중지시킨 후 2,500×g에서 10분간 원심 분리하였다. 이후 상층 1 ml를 회수하여 250 μl의 1% TBA와 혼합하여 끓는 물에서 10분간 중탕하였고 상온에서 냉각시켰다. Malondialdehyde의 농도는 spectrophotometer를 이용하여 532 nm 파장에서 반응액의 흡광도(optical density)를 측정하여 분석하였다. 생성된 malondialdehyde의 몰농도는 몰 흡광계수(1.49 × 10⁵ l·mol⁻¹·cm⁻¹)를 기준으로 환산하였다(Slater와 Sawyer, 1971).

유세포 분석기(Flow Cytometry)를 이용한 정자 DNA Fragmentation 분석

정자의 DNA fragmentation 측정은 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) dUTP nick end labelling) 기법이 적용된 APO-DIRECT™ kit(Pharmingen, USA)와 유세포분석기(Becton dickinson, USA)를 사용하여 실시하였다. 전 처리된 정자를 0.5 ml의 PBS로 희석하여 정자 농도가 2~4×10⁶ cells/ml가 되도록 조정하고, 5 ml의 1% pa-

raformaldehyde를 넣어 얼음 위에서 15분간 고정시켰다. 이후 300×g에서 5분간 원심분리하고 정자 피를 5 ml의 PBS로 2회 세척 후 70% ice-cold ethanol 5 ml를 넣고 -20 °C에서 최소 30분간 정치하였다. 300×g에서 5분간 재 원심 분리하여 상층의 ethanol을 제거한 후 정자 피를 1.0 ml의 wash buffer로 희석하여 300×g에서 5분간 원심 분리하는 세척 과정을 2회 반복하였다. 이렇게 얻은 정자 피에 FITC-dUTP와 TdT enzyme이 들어 있는 염색액 50 µl를 넣고 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 5 ml의 rinse buffer를 넣고 300×g에서 5분간 원심 분리하는 세척 과정을 2회 반복하였다. 이후 정자 피에 0.5 ml의 propidium iodide(PI)/RNase A 액을 첨가하여 암실에서 30분간 염색 하였다. 염색 후 유세포분석은 3시간 이내에 시행하였다. 유세포분석은 488 nm argon laser를 장착한 유세포 분석기를 이용하였다. DNA histogram의 분석은 CELLQuest program(ver. 3.1)을 이용하였다.

통계분석

결과에 대한 통계학적 분석은 통계 패키지 프로그램인 SPSS(ver. 12)를 이용하였으며, 두 군 간의 평균치 비교를 위하여 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 이때 $p < 0.05$ 인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

본 연구에서 ROS의 발생은 류 등(2002)의 방법에 준하여 1,000 µM의 xanthine과 50 U/ml의 xanthine oxidase를 병행 처리하는 방법으로 하였으며, 항산화제의 처리는 200 U/ml의 SOD와 500 U/ml의 catalase를 적정농도로 선택하여 연구에 사용하였다. 전 처리된 돼지 정자를 각각의 조건에서 2시간 동안 배양한 후 정자의 기능 및 성장 변화 정도를 분석하였다.

ROS가 돼지 정자의 기능에 미치는 영향으로서 ionophore에 반응하여 야기된 침체반응 정도를 분석한 결과, 침체반응율은 X-XO 처리군에서 ROS에 노출되지 않았던 대조군과 비교하였을 때 유의하게($p < 0.05$) 감소되었으며 (Fig. 1), 저장액내 정자 미부의 팽창 검사(HOST)에서도 정자 미부가 변화된 정자의 비율이 유의하게($p < 0.05$) 감소되었다(Fig. 2). 항산화제의 처리 효과에 있어서 catalase 또는 catalase와 SOD의 병행 처리는 침체반응율과 HOST 모두에서 ROS에 대한 악영향을 효과적으로 완화시켰으나, SOD의 단독 처리에서는 완화 효과가 나타나지 않았다(Fig. 1, 2). ROS 발생이 돼지 정자의 lipid peroxidation에 미치는 영향에 있어서 malondialdehyde의 생성 정도는 X-XO 단일 처리군과 비교하여 SOD 처리군에서는 유의한 차이가 나타나지 않았으나, catalase 또는 catalase와 SOD 병행 처리군에서는 유의하게($p < 0.05$) 낮은 결과를 나타내었다 (Fig. 3). Catalase의 처리는 ROS의 악영향으로 발생되는 lipid peroxidation을 효과적으로 완화하였다.

ROS가 돼지 정자의 DNA fragmentation에 미치는 영향을 조사한 결과, DNA fragmentation 정도는 ROS에 노출되지 않았던 대조군과 비교하여 X-XO 단일 처리군에서 유의하게 증가되었다($p < 0.05$)(Fig. 4). 한편, 항산화제 처리 효과에 있어서 SOD 단독 처리군에서는 DNA fragmenta-

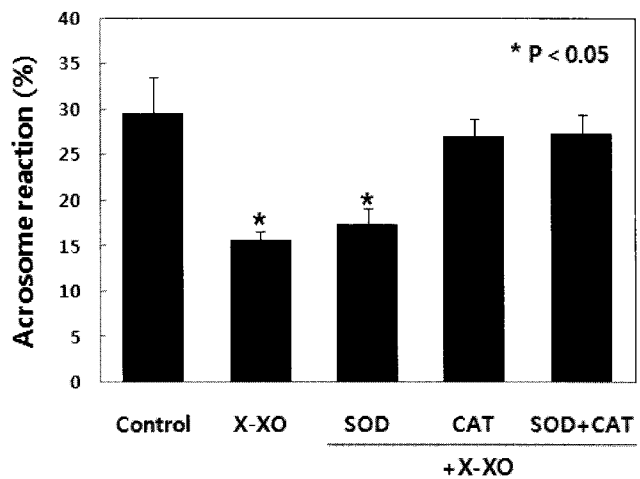


Fig. 1. A measure of acrosome reaction affected by superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in porcine spermatozoa after 2 hr incubation with ROS activating xanthine oxidase system (X-XO). Acrosome reaction expressed as the difference between spontaneous and ionophore induced acrosome reaction rates. Values are mean±SEM, n=4. * $p < 0.05$ compared with the control.

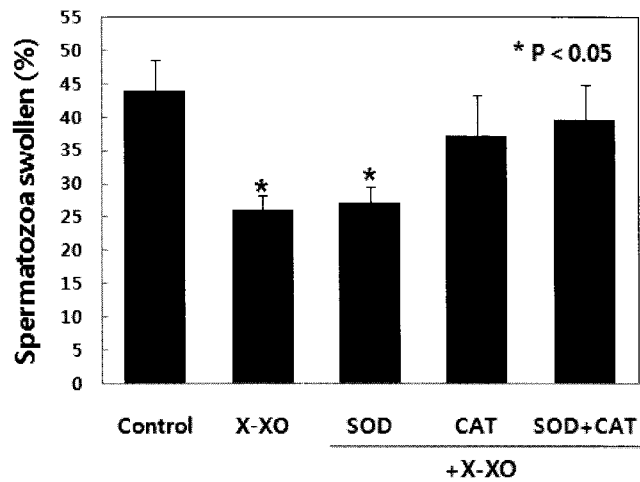


Fig. 2. A measure of porcine spermatozoa swelling affected by by superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) under hypo-osmotic condition after 2 hr incubation with ROS activating xanthine oxidase system (X-XO). Values are mean±SEM, n=4. * $p < 0.05$ compared with the control.

tion 정도가 유의적으로 감소하지 않았으나($p < 0.05$), catalase 또는 catalase와 SOD의 병행 처리군에서는 대조군과 비교하여 차이가 없는 것으로 나타나 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

본 연구는 유용 가축인 돼지 정자를 대상으로 ROS가 정자의 기능 및 성장 변화에 미치는 영향을 알아보려고 하는 것이다. 이러한 목적으로 xanthine과 xanthine oxidase

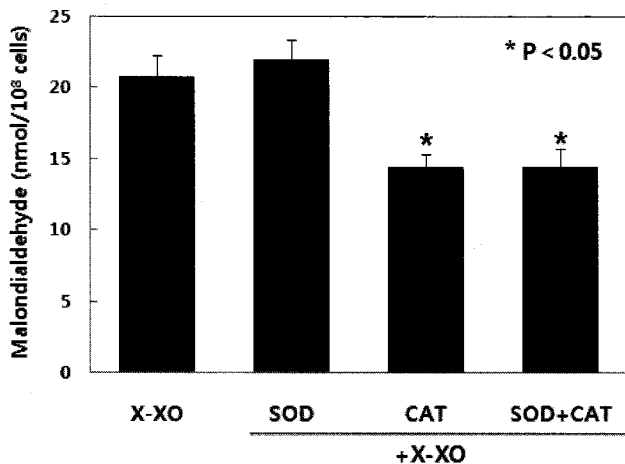


Fig. 3. Induction of lipid peroxidation affected by superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in porcine spermatozoa after 2 hr incubation with ROS activating xantine oxidase system (X-XO). Lipid peroxidation expressed as malondialdehyde (nmol) generated by 1×10^8 spermatozoa. Values are mean \pm SEM, n=4. * $p < 0.05$ compared with the X-XO treatment.

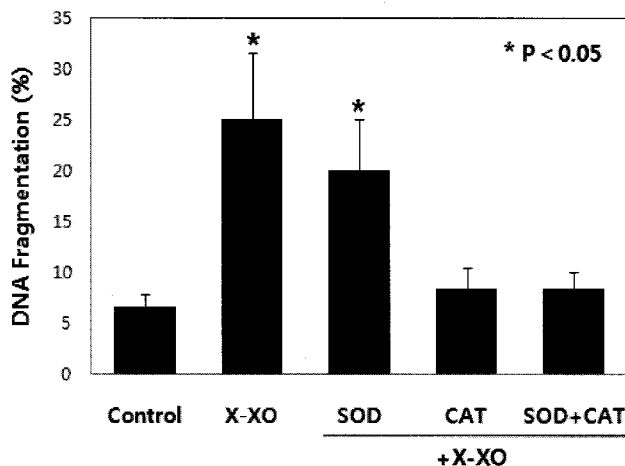


Fig. 4. DNA fragmentation affected by superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in porcine spermatozoa measured by TUNEL and flow cytometry after 2 hr incubation with ROS activating xantine oxidase system (X-XO). Values are mean \pm SEM, n=4. * $p < 0.05$ compared with the control.

(X-XO) 시스템을 이용하여 인위적으로 발생된 ROS 조건하에 정자를 노출시킨 후 ROS가 정자의 침체반응을 저하와 정자 막(plasma membrane)의 기능 손상 및 DNA fragmentation을 증가시키는 등과 같은 유해한 영향을 끼친다는 것을 확인할 수 있었다.

과거 오래 전부터 ROS가 정자에 미치는 영향에 관한 많은 연구들이 진행되어 왔으며, ROS는 종류와 농도 등에 따라 정자의 기능적인 측면에 이로운 효과와 해로운 효과를 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있다(de Lamirande와 Gagnon, 1995). 정상적인 생리적 조건하에서 정액에는 정자 자체나 leukocytes의 작용에 의하여 발생하는 낮은 수준의 ROS가 함유되어 있으며, 적정 수준의 ROS는 정자의 고활력 운동성(hyperactivation)과 침체반응 수행 능력을 유지

하는데 필요한 작용을 한다(Alvarez 등, 1987; Aitken과 West, 1990; de Lamirande 등, 1993). 그러나 사람을 대상으로 한 연구에서 남성불임 환자의 경우, 정액 내에 정상인과 비교하여 높은 농도의 ROS가 함유되어 있으며, 과량의 ROS와 운동성 정자의 감소 간에 연관성이 있다고 보고되었다(Iwasaki와 Gagnon, 1992). 최근까지 여러 연구자들에 의하여 ROS가 정자의 운동성과 수정능력에 나쁜 영향을 미친다는 결과들이 보고됨에 따라 ROS가 정자에 미치는 근원적인 영향을 구명하는 연구에 대한 관심이 높아지고 있다. ROS의 영향을 조사하기 위하여 실험적으로 free radical들을 종류별로 직접 정자에 처리하는 방법이 사용될 수 있으나, 여러 종류의 free radical들을 동시에 발생시킬 수 있는 장점을 지닌 X-XO 시스템이 ROS의 영향을 조사하는 실험 방법으로 널리 이용되고 있다. X-XO 시스템은 처리되는 농도에 의존적으로 O_2^- 와 H_2O_2 를 발생하며, 이들의 2차적인 상호작용으로 인하여 활성기간은 짧지만 세포에 유독성이 높은 OH와 같은 free radical을 발생하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 X-XO 시스템에 의하여 높은 수준으로 발생된 ROS는 돼지 정자의 LPO를 증가시켰으며, 정자의 침체반응과 저장액 내에서 정자 막의 팽창 능력에 유의적인 손상을 유발하였다. 정자 원형질막의 LPO는 ROS의 영향으로부터 초래되는 정자 손상의 주요한 원인으로 알려져 있다(Alvarez 등, 1987). 세포의 원형질막에 LPO가 과도하게 발생할 경우, 막에 존재하는 불포화 지방산의 변성에 따라 정자 막의 구조와 기능적인 변성이 야기된다고 보고되었다(Ohyashiki 등, 1988; Block, 1991). 따라서 본 연구 결과에서 ROS의 영향으로 증가된 LPO가 돼지 정자의 원형질막 손상에 원인으로 작용하여 정자의 침체반응능력과 같은 기능이 이상을 초래한 것으로 생각된다.

정액 내에는 생산된 ROS를 환원시킬 수 있는 여러 효소들이 함유되어 있어서 일정 수준의 ROS는 이들 효소들의 작용으로 인하여 정자에 미치는 영향이 적게 된다. 대표적인 항산화제로서 SOD는 O_2^- 를 O_2 와 H_2O_2 로, catalase는 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 변환시킨다. 본 연구에서 ROS의 영향에 대한 항산화제의 효과를 조사한 결과, SOD 단독 처리에서는 ROS의 유해성에 대한 정자 기능과 LPO 모두에서 완화 효과가 나타나지 않았으나, catalase의 단독 처리 혹은 SOD와의 병행처리 모두에서 정자 기능과 성장 변화에 대한 완화 효과를 나타내었다. 이상의 결과로서 발생된 ROS 중 O_2^- 보다는 H_2O_2 가 돼지 정자에 더욱 유해한 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다. 사람 정자를 대상으로 X-XO 시스템을 통하여 생성된 ROS가 정자의 기능에 미치는 연구에서 본 연구 결과와 유사하게 ROS의 영향으로 정자의 운동성이 급격히 감소되고 정자의 기능적인 측면을 복합적으로 반영하는 투명대가 제거된 햄스터 난자와의 수정 시 난자 내 침투율이 유의하게 낮았다고 보고되었다(Aitken 등, 1993a). 사람 정자를 대상으로 X-XO 시스템을 이용한 또 다른 연구에서 ROS가 발생됨에 따라 ionophore에 반응하는 침체반응 정도와 정자 원형질막의 불포화지방산의 농도가 감소됨이 보고되었다(Griveau 등, 1995). 이들의 연구 모두에서 발생된 ROS 중 O_2^- 보다는 H_2O_2 의 유해성이 높았던 것으로 나타났다. 또한, 최근 돼지 정액을 이용한 연구에서도 ROS의 영향으로부터 정자의 운동성을 보존하는데 SOD보다는 catalase의 처리 효과가 유효했다고 보고되었다(Guthrie와 Welch, 2006).

다른 종류의 세포들과 비교하여 정자핵의 염색질(chromatin)은 성숙 과정 중 histone이 disulphide bond가 증가된 protamine으로 대체됨에 따라 고도로 응축되어지는 특성을 지니게 된다(Balhorn, 1982). 이러한 특성으로 인하여 정자의 DNA는 물리적, 화학적인 자극에 대하여 높은 안정성을 지닌다. 그러나 병인학적 또는 특정 이상으로 인하여 정자의 염색질 응축에 결함이 생길 경우에는 정자의 DNA는 변성을 일으킬 수 있는 외부 요인에 민감하게 반응하게 된다(Manicardi 등, 1995). ROS는 정자에 손상을 일으킬 수 있는 주요 외부 요인으로서 정자의 DNA 수준에까지 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Lopes 등, 1998; Twigg 등, 1998). Lopes 등(1998)은 본 연구 결과와 유사하게 X-XO 시스템으로 발생된 ROS가 사람 정자의 DNA fragmentation을 유의하게 증가시켰다고 보고하였다. 그러나 이들의 연구에서 DNA 손상을 완화하기 위한 항산화제 처리 효과에 있어서는 본 연구와는 상반되는 결과로서 catalase의 처리 효과는 없었다고 하였다. 반면, 소의 동결 용해 정자를 이용한 연구에서 본 연구와 동일한 결과로서 catalase 처리를 통하여 X-XO 시스템으로 발생된 ROS로부터 야기되는 정자의 DNA fragmentation 정도가 유의적으로 감소되었다는 결과(류 등, 2002)를 고려해 보면 아마도 항산화제 처리 효과에 있어서는 중간 특이성이 존재하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 보면, 과량으로 존재하는 ROS는 돼지 정자의 기능뿐 아니라 DNA의 수준에 까지 유해한 작용을 나타내었으며, 앞으로 돼지 정액의 생산 및 처리 시 ROS의 영향을 완화시킬 수 있는 항산화제의 처리법을 도입 한다면 정액의 활용도를 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC (1989): Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 10:214-220.
2. Aitken RJ, West KM (1990): Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 13:433-451.
3. Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D (1993a): Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 97:441-450.
4. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW (1993b): Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 35:302-315.
5. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987): Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxy-

- gen toxicity. *J Androl* 8:338-348.
6. Balhorn R (1982): A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93:298-305.
7. Biggers JS, Whitten WK, Whittingham DG (1971): The culture of mouse embryos *in vitro*. In: Daniel JC, editor. *Method in Mammalian Embryology*. San Francisco, Freeman, pp 86-116.
8. Block ER (1991): Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol* 20: 362-369.
9. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL (1991): A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. *J Androl* 12:98-103.
10. de Lamirande E, Eiley D, Gagnon C (1993): Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl* 16:258-266.
11. de Lamirande E, Gagnon C (1995): Impact of reactive oxygen species on spermatozoa; a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 12 Suppl 1:15-21.
12. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D (1995): Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 103:17-26.
13. Guthrie HD, Welch GR (2006): Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 84:2089-2100.
14. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70:219-228.
15. Jones R, Mann T, Sherins RJ (1979): Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537.
16. Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F (1994): Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril* 62:862-868.
17. Iwasaki A, Gagnon C (1992): Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertility patients. *Fertil Steril* 57:2409-2416.
18. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998): Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13: 896-900.
19. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D (1995): Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human sp-

- ermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 52:864-867.
20. Ohyashiki T, Tsuka T, Mohri T (1988): Increase of the molecular rigidity of the protein conformation in the intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 939:383-392.
 21. Slater TF, Sawyer BC (1971): The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative in rat liver fractions *in vitro*. *Biochem J* 123:805-814.
 22. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A (2006): Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 21:986-993.
 23. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998): Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 13:1429-1436.
 24. 류범용, 정영채, 김창근, 신현아, 한정호, 방명길, 오선경, 김석현, 문신용 (2002): 소 정자에 있어서 활성산소계가 정자 기능과 지방산화 및 DNA 절편화에 미치는 영향. *대한불임학회지* 29:105-115.
(접수일자: 2009. 3. 16 / 채택일자: 2009. 3. 20)