

BTS와 Androhep이 보존 기간 동안 액상 정액의 운동역학 및 수정능 획득에 미치는 영향

김연희¹ · 박유진¹ · 윤성재¹ · 권우성¹ · 김상현² · 방명걸^{1,3,*}

¹중앙대학교 산업과학대학 동물자원과학과, ²(주)다비AI센터, ³중앙대학교 생명환경연구원

Effect of BTS and Androhep during Storage Times on the Kinematics and Capacitation Status in Liquid Boar Semen

Yun-Hee Kim¹, Yoo-Jin Park¹, Sung-Jae Yoon¹, Woo-Sung Kwon¹,
Sang Hyun Kim² and Myung-Geol Pang^{1,3,*}

¹Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

²Darby Pig AI Center, Chungnam-Do 399-841, Korea

³BET Research Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of storage time on fresh boar semen in Androhep and Beltsville Thawing Solution (BTS). Boar semen samples extended in each extender were stored at 17°C up to 4 days. Sperm motility kinematics was evaluated by computer assisted sperm analyzer (CASA) and capacitation status by chlortetracycline (CTC)/Hoechst 33258 staining. Sperm motility (%) was not decreased during storage in BTS and Androhep. No significant difference between extenders was observed. Only significant differences in kinematic parameters on linearity during storage were found. The percentage of dead sperm significantly decreased during storage ($p<0.05$). Also the percentage of noncapacitated, capacitated, and acrosome-reacted sperm significantly modified during storage ($p<0.05$). However, there was no significant difference between extenders except proportion of capacitated sperm. This finding supported that modification in these parameters was not significantly different between extenders during this short-term storage. Our finding strongly indicated that both Androhep and BTS maintained favorable conditions for motility, motility kinematics, and capacitation status during short-term storage. Despite modifications in some parameters were apparent during sperm storage in extenders, these may not affect the fertilizing capacity of boar semen.

(Key words : Boar, Semen storage, BTS, Androhep, Motility kinematics, Capacitation)

서론

인공수정은 동물을 생산하는 중요 기술로 오랜 역사를 가지고 있다(Vishwanath, 2003). 세계적으로 약 1천 9백만 양돈농가 중 99% 이상이 액상 정액을 사용하며, 이러한 액상 정액은 85%가 15~20°C에서 채취 후 5일까지 보존하여 사용되고 있다(Johnson 등, 2000). 보존 기간 동안 액상 정액의 운동성 저하 및 정자의 형태학적 변화가 일어나기 때문에(Estienne 등, 1989; Huo 등, 2002; Park 등, 2008) 빠른 시일 내에 소비하여야 한다. 또한, 정액의 질에 따라서 수태율과 산자수에 큰 영향을 주기 때문에(Sutkeviciene 등, 2005) 보존 기간 동안 액상 정액의 질,

즉 수정능력 유지가 매우 중요하다(Huo 등, 2002).

사정된 정액을 액상으로 보존하는데 가장 큰 요인은 온도 및 희석액의 조성이다(Johnson 등, 2000). 현재 가장 많이 사용되고 있는 Beltsville Thawing Solution(BTS)은 단기보존 희석액으로써 돼지 정액 보존 시 사용되며(Dube 등, 2004), 사나흘의 짧은 보존 기간 동안 정액의 운동성을 유지시켜 준다(Estienne 등, 2007).

그러나 일부 현장에서는 정자가 죽으면서 정자 두부끼리 서로 유착되는 현상을 막아주기 위해 bovine serum albumin(BSA)을 희석액에 첨가하여 사용하거나 Androhep과 같이 BSA 첨가된 희석액을 사용하고 있으나, BSA 첨가에 의해 보존 기간 동안 정자의 수정능 획득이 야기되는 문제가 발생할 수 있다(Bedu-Addo 등, 2005). 체외

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(Code # 20080401034056)의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-4841, E-mail: mgpang@cau.ac.kr

에서 수정능을 획득한 정자는 온전한 정자에 비해 수명이 짧다.

수정 능력을 객관적으로 평가하는 방법으로 정자의 운동성을 객관적으로 관찰할 수 있는 computer-assisted sperm analyzer(CASA)가 1980년 후반부터 개발되어 현재까지 사용되고 있다. 정자의 운동경로를 화면상에 표시하며, 정자의 기능과 정액의 특성을 측정하는데 이용되고 있다(Holt 등, 2007). 또한, 수정능 획득 및 침체 반응 시 칼슘 이온이 작용하는데, 정자 두부 특정 부위 내에 칼슘 이온의 존재를 antibiotic chlorotetracycline(CTC) 형광 물질로 측정하는 CTC 방법이 개발되었다(Wang 등, 1995). Kommisrud(2002) 등은 이 CTC 방법을 이용하여 수정능 획득 및 침체 반응과 수정 능력 간의 높은 상관 관계를 보고하여 CTC를 이용한 정액 질에 대한 평가 가능성을 제시한 바 있다.

본 연구에서는 4일 동안의 보존 기간중 희석액에 따른 정자의 질적 변화를 조사하기 위해 시행하였다. 희석액은 BTS와 Androhep을 사용하였으며, 침체 상태, 침체 반응, 수정능 획득, 생존 유무를 조사하고자 CTC/H33258 방법을 이용하였다. 또한, 정자의 운동성 및 운동역학을 조사하고자 CASA를 실시하였다. 결과를 바탕으로 인공수정에 사용하는 BTS와 Androhep 희석액 간의 보존능력을 비교하였다.

재료 및 방법

액상 정액

공시 종모돈은 (주)다비AI센터에서 보유하는 요크셔와 듀록 종으로 각각 다른 7두를 공시하였다. 희석액이 정자에 끼치는 영향을 비교 관찰하기 위해 BTS와 Androhep을 각각 사용하였다. 나출 동안 17°C에서 보존 시에 운동성, 운동역학 및 침체막 변화 양상을 관찰하였다.

CASA를 이용한 운동성 측정

보존된 정액을 제 1일, 3일 및 4일째에 39°C 인큐베이션

Table 1. Composition of Beltsville thawing solution (BTS) and Androhep

Ingredients(g/L)	BTS ¹⁾	Androhep ²⁾
Glucose	37.0	26.0
EDTA	1.25	2.40
Sodium citrate	6.00	8.00
Sodium bicarbonate	1.25	1.20
Potassium chloride	0.75	-
Tris	-	-
HEPES	-	9.00
BSA	-	2.50
Gentamicin sulfate	0.30	0.30
pH	7.00	6.80

¹⁾ Beltsville thawing solution (BTS) : Johnson (2000).

²⁾ Androhep : Johnson (2000).

터에서 2분간 배양한 다음, 10 μ l의 정액 샘플을 39°C로 가열된 Makler counting chamber에 올린 후 CCD 카메라(JVC, Japan)가 부착된 광학현미경(Nikon, Japan)에 연결된 SAIS system(Medical Supply, Korea)을 이용하여 운동성(%) 및 운동 역학 변수를 측정하여 보존 기간 동안 정자의 운동성 변화 양상을 조사하였다. 정자의 운동 역학 변수 측정에 대한 각 항목의 정의는 Table 2과 같다.

CTC/H33258 Staining을 이용한 침체막의 변화 측정

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 CTC 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 수정능 획득과 침체막 변화 양상을 조사하였다. 액상 정액 1 ml를 400 g에서 10분간 1회 원심분리하여 세척하였다. 정자의 생사 판정을 위해 세척한 정자괴에 135 μ l PBS와 15 μ l Hoechst33258(H33258; 100 μ l/ml in PBS)를 순서대로 첨가

Table 2. Definition of chosen motility kinematic descriptions

Name	Units	Description
Curvilinear velocity (VCL)	μ m/s	Time-average velocity of sperm head along its actual curvilinear trajectory as perceived in two dimensions under the microscope
Straight-line velocity (VSL)	μ m/s	Time-average of a sperm head along the straight line between its first detected position and its last position
Average path velocity (VAP)	μ m/s	Time-average velocity of a sperm head along its spatial average trajectory
Linearity (LIN)		VSL/VCL
Mean amplitude of head lateral displacement (ALH)	μ m	Mean head displacement along its curvilinear trajectory around the mean trajectory
Percentage of hyperactivated sperm (HYP)	%	Percentage of sperm with increased curvilinear velocity and lateral head movement sperm, and decreased linearity; curvilinear velocity \geq 80, linearity \leq 65, amplitude of head lateral displacement \geq 6.5

Table 3. Definition of sperm membrane pattern by CTC/H33258 staining

Pattern	Description
F	Bright green fluorescence distributed uniformly over entire sperm head, with or without stronger fluorescent line at equatorial segment: Characteristic of uncapacitated sperm
B	Banded-indicative of capacitated spermatozoa and fluorescence only in the post acrosomal region: Characteristic of capacitated sperm
AR	Sperm showing a mottled green fluorescence over head, green fluorescence only in post acrosomal region or no fluorescence on the head: Typical acrosome reacted spermatozoa
D	When nuclei showed bright blue fluorescence over sperm head: Typical dead spermatozoa

후 공기 중 CO₂ 5%인 39°C 인큐베이터에서 10분간 배양하였다. 이 후 암실에서 250 µl의 2% polyvinylpyrrolidone-40(PVP-40 in PBS)을 첨가하고, 400 g에서 10분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 제거한 후 400 µl CTC 용액(750 µM CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cystein in 20 mM Tris buffer; pH 7.8)과 400 µl PBS를 혼합하여 20초간 암실에서 상온 배양하였다. 염색된 정액은 빛이 차단된 4°C에서 보관하였다. 염색 후 24시간 이내에 형광현미경(Nikon, Japan)으로 판독하였다. 정자의 첨체 막 변화 양상의 판독은 Fraser 등(1995)의 분류를 따랐다(Table 3).

통계 분석

통계 분석은 통계분석프로그램(SPSS Version 12.0, USA)을 이용하였으며, 이원 분산 분석을 실시하여 보존 기간 동안 희석액에 따른 정자의 변화를 비교 분석하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

보존 기간 동안 희석액에 따른 정자의 운동성(%) 변화

보존 기간 동안 제 1일, 3일 및 4일째에 희석액에 따른 정자의 운동성 변화를 비교 측정하였다. 정자의 운동성 변화 양상은 Fig. 1과 같다. 정자의 운동성(%)은 보존 기간에 따라 유의적인 감소는 관찰되지 않았다. 또한, 두 희석액 간에도 유의적인 차이는 없었다. 정자 운동역학 변수중 보존 기간에 따라 BTS로 희석한 정자는 직진운동성이 감소하는 경향과 고회력 정자의 비율이 증가하는 경향을 보였다. 다른 운동 역학변수에서는 보존 기간과 희석액에 따른 차이가 관찰되지 않았다.

보존 기간 동안 희석액에 따른 정자의 수정능 획득과 첨체막의 변화

보존 기간 동안 제 1일, 3일 및 4일째에 희석액 간의 정자의 첨체막 변화를 비교 조사하였다. 정자의 첨체 막의 변화 양상은 Fig. 2와 같다. 보존 기간에 따라 죽은 정자의 비율은 두 희석액 처리 정액 모두에서 유의적으로 증가하였다. 또한, 보존 기간 1일과 3일에서 두 희석액 간에 유의적인 차이가 관찰되었다. B, F 및 AR pattern은 보존 기간에 따라 유의적으로 감소하였는데, 이는 보존 기간에 따른 죽은 정자의 증가에 기인하였다. 두 희석액 간에는 B pattern에서만 보존 기간에 따라 유의적인 차이를

보였다.

고 찰

본 실험에서는 정자 두부막의 온전성, 첨체의 상태검사, 첨체 반응, 정자의 수정능 획득, 생존 유무를 관찰하고자 CTC/H33258 형광 염색 방법을 이용하고, 정자의 운동성 및 운동역학을 조사하고자 CASA를 실시하였다. 결과를 바탕으로 인공수정에 사용하는 BTS와 Androhep간의 보존능력을 비교해 보고자 하였다.

일반적으로 정액 검사는 정자의 형태학적 분석과 운동성 측정으로 이루어진다. 정자의 수정능력 측정을 위해서는 정자의 운동성, 정자의 수, 정자 막의 온전성, 정자의 난자 내 침투 능력(Gadea 등, 1998), 첨체의 상태검사, 첨체 반응, 난관 상피세포 부착 반응(Waberski 등, 2005), 정자의 난자 투명대 부착 반응, 정자 염색질 구조 분석(Evenson 등, 1990) 등의 방법이 보고되었다. 또한, 인공수정을 통한 수태율, 산자수, 분만율 등에 관한 분석은 종모든의 수정 능력을 평가하는데 있어서 보다 정확한 정보를 얻을 수 있는 유용한 방법이다(Gadea 등, 1998).

액상 정액을 보존 시 온도나 희석액 또는 저장기간 등의 영향에 의해 정자의 기능이 달라진다(Johnson 등, 2000). 현재 가장 많이 사용되고 있는 BTS는 단기보존 희석액으로(Dube 등, 2004), 수일의 짧은 보존 기간 동안 정액의 운동성을 유지시켜준다(Estienne 등, 2007). Park 등(2008)은 BTS에 희석한 정액을 17°C에서 5일 동안 보존 시, 보존 3일째까지는 수정 능력에 영향을 주는 운동성(%)과 전진 운동성과 첨체막의 유의적인 변화가 없으므로, 보존 3일째까지는 정자의 수정 능력 변화가 없다고 보고하였다. 또한, Watson 등(1990)은 12일 간 BTS에 정액을 희석하여 보존 시 운동성은 유의적으로 감소하였지만 6일 이후에는 유의적 감소가 나타내지 않았다고 발표하였다. 그리고 Dube 등(2004)은 BTS내 정자의 생존성은 12일간 관찰하였을 때 95%에서 55%로 감소한다고 보고하였다. 이와 같은 사실을 토대로 본 실험에서는 4일간 정자의 상태를 검사하였다.

Park 등(2008)은 정자를 보존 기간에 따라 5일간 검사했을 때 MOT와 LIN에서 유의적으로 감소하는 결과가 나왔으나, 이를 제외한 VCL, VSL, VAP 및 ALH에 있어서는 정액의 보존 기간 동안 유의적인 변화를 보이지 않는다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 결과는 VCL, LIN,

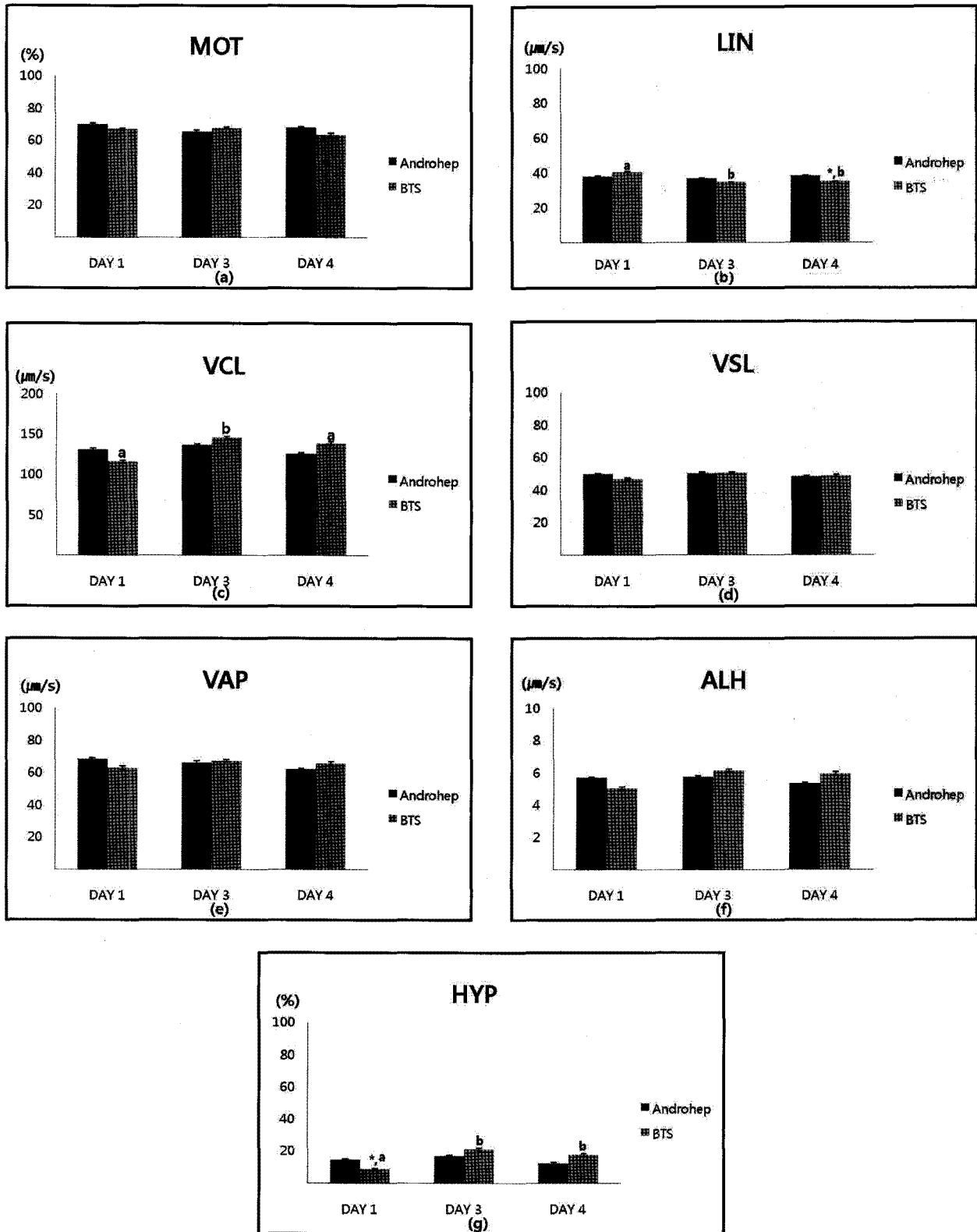


Fig. 1. Sperm motility (%) and kinematic assessment using CASA during 4-day storage. (a) MOT (%), (b) LIN, (c) VCL ($\mu\text{m/s}$), (d) VSL ($\mu\text{m/s}$), (e) VAP ($\mu\text{m/s}$), (f) ALH (μm), and (g) HYP (%) assessment using CASA. Values with different superscript differ significantly ($p < 0.05$). ^{ab} values with different superscripts in LIN, VCL, and HYP in BTS differ significantly ($p < 0.05$). * Values with different superscripts were significantly different compared to BTS and Androhep ($p < 0.05$).

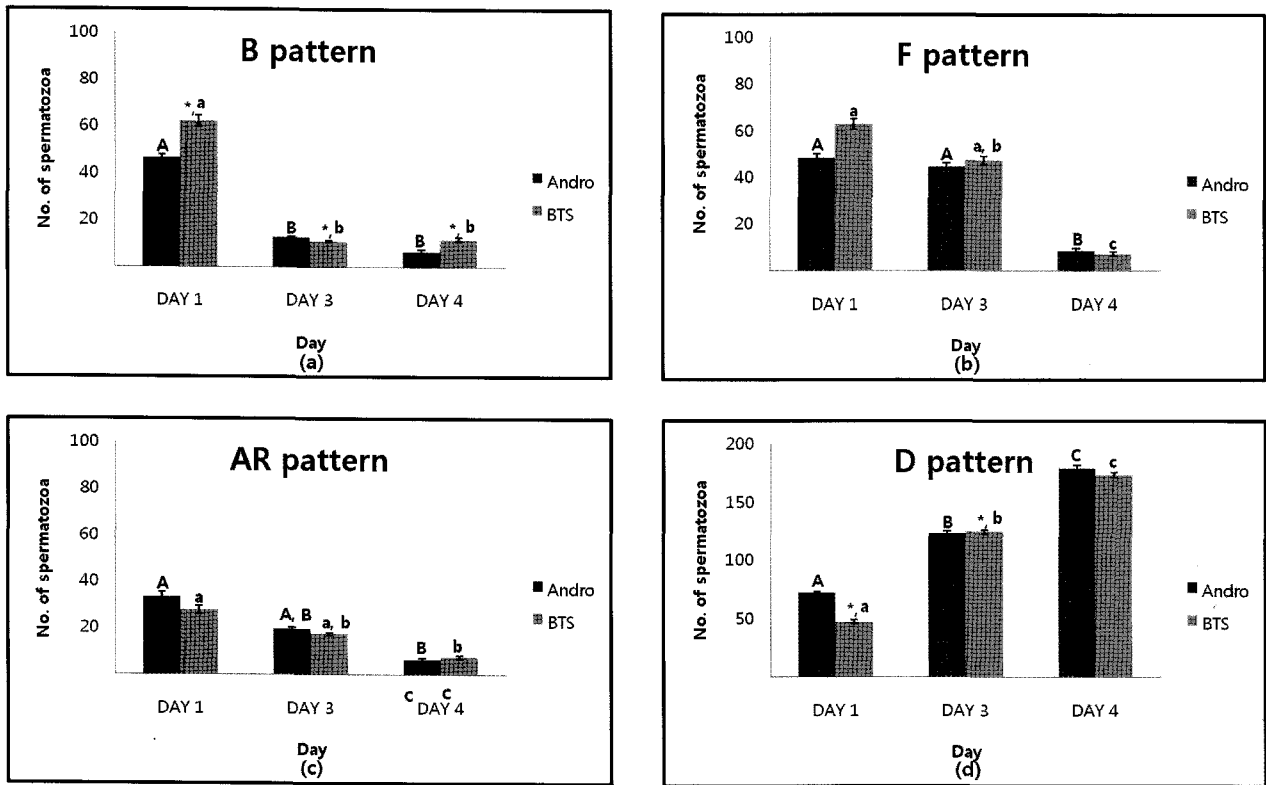


Fig. 2. The average percentages of sperm displaying the various CTC fluorescence patterns during 4-day storage. (a) B pattern, (b) F pattern, (c) AR pattern and (D) D pattern assessment using CTC/H33258 staining. Values with different superscript differ significantly ($p < 0.05$). ^{a,b} Values with different superscripts in B pattern differ significantly ($p < 0.05$). ^{A,B,a,b,c} Values with different superscripts in F pattern differ significantly ($p < 0.05$). ^{A,B,a,b} Values with different superscripts in AR pattern differ significantly ($p < 0.05$). ^{A,B,C,a,b,c} Values with different superscripts in D pattern differ significantly ($p < 0.05$). * Values with different superscripts were significantly different compared to BTS and Androhep ($p < 0.05$).

HYP에서도 유의적인 차이를 보였다. 정자의 운동성의 특징 중 VSL, VAP, LIN 및 ALH는 체내에서 자궁 점막 침투성과 밀접한 관계가 있다고 보고된 바 있다(Aitken 등, 1982). CASA를 이용한 정자의 특정 운동역학 변수와 수정 능력 간에 밀접한 관련이 있음이 보고되었고(Hirai 등, 2001), 정자의 운동성(MOT)과 정액 내 정자의 농도, 곡선 운동 속도(VCL), 직선 운동 속도(VSL), 평균 경로 속도(VAP), 선형도(LIN) 그리고 평균 이동 경로와 실제 이동 경로와의 측방거리차인 측두 이동 거리(ALH) 등을 포함한 정자의 특성은 자궁점막 내 침투성(cervical mucus penetration)으로 측정된 수정 능력과 밀접한 관계가 있었다(Aitken 등, 1982).

Thomas 등(1997)은 정액의 초기 일정기간 동안의 보존은 정상적인 침체의 모양을 유지하고 있으며, 침체 반응은 수정되기 전에 살아있는 정자에서만 일어난다고 밝혔다. 또한, Thomas 등(1997)은 정자의 수정 능력을 보다 정확히 측정하기 위해서는 침체 반응과 생존 여부 모두를 동시에 판별해야 하며, 특히 CTC/H33258 염색은 살아있는 정자와 침체 반응을 측정할 수 있는 대표적인 방법이라고 보고하였다. 수정능이 획득된 정자는 난자를 둘러싸고 있는 투명대에 의해 수정되기 전에 침체 반응이 일어나지만(Yanagimachi, 1994), 난자의 투명대와 결합하기 전에 침체 반응이 일어난 정자는 난자의 투명대와 결합에

필요한 중요한 요소를 잃어버리기 때문에 정상적인 수정에 참여할 수 없다(Adeoya-Osiguwa 등, 2005; Fraser 등, 1995). Estienne 등(1980)은 BSA 첨가된 희석액에서 보존 기간에 따른 유의적 운동성 감소를 보고하였다. 이는 보존액에 수정능 획득에 영향을 미치는 BSA를 첨가하였을 때 조기 수정능 획득 현상을 초래하여 BSA를 첨가하지 않았을 때보다 더 낮은 수정률을 초래할 수 있다고 해석할 수 있다.

Dubé 등(2004)은 돼지 정액을 BTS와 Androhep에서 12일간 보존하면서 운동성(%)과 침체반응을 조사하였다. 운동성은 2, 4, 5 및 6일째 Androhep에서 유의적으로 높게 유지되었고, B pattern은 2일째 보존에서만 Androhep에서 유의적으로 높았다. 반면 F pattern은 오히려 BTS에서 유의적으로 높았다고 보고하였으나 대부분의 경우 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. 이러한 경향은 본 연구 결과와 일치하는 결과이다.

본 연구 결과를 요약해 보면, 인공수정에 사용되는 정자의 평가 기준인 운동성, 운동역학 및 침체 변화를 보았을 때 보존 기간 및 희석액의 영향을 관찰할 수 없었다. 보존 기간에 따라 죽은 정자, B, F 및 AR pattern비율은 보존 기간에 따라 유의적으로 변화하였으나, 두 희석액 간에는 B pattern에서만 보존 기간에 따라 유의적인 차이를 보였다. 그러므로 본 연구결과는 돼지 액상 정액 제조

를 위하여 사용하는 희석액의 종류보다는 희석 정액을 보존할 때 온도, 보존 기간 등의 요인을 잘 관리하는 것이 좋은 수태율을 얻는데 더 중요한 요인으로 판단된다.

인용문헌

1. Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR (2005): Cathine and norephedrine, both phenylpropanolamines, accelerate capacitation and then inhibit spontaneous acrosome loss. *Hum Reprod* 20:198-207.
2. Aitken RJ, Böst FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, Lees MM (1982): An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: Conventional criteria, movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil Steril* 38:212-221.
3. Bedu-Addo K, Lefièvre L, Moseley FLC, Barratt CL-RB, Publicover SJ (2005): Bicarbonate and bovine serum albumin reversibly 'switch' capacitation-induced events in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 11: 683-691.
4. Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL (2004): Boar sperm storage capacity of BTS and androhep plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 62:874-886.
5. Estienne MJ, Knight JW, Beal WE (1989): Long-term liquid storage of porcine spermatozoa separated using a discontinuous bovine serum albumin gradient. *J Anim Sci* 67:1497-1502.
6. Estienne MJ, Harper AF, Day JL (2007): Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod Biol* 7:221-231.
7. Evenson DP, Thompson L, Jost L (1994): Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41:637-651.
8. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995): Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40:233-241.
9. Gadea J, Matás C, Lucas X (1998): Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 54:95-108.
10. Huo LJ, Ma XH, Yang ZM (2002): Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58:1349-1360.
11. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
12. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Greule IS (2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43:49-55.
13. Park YJ, Song WH, Kim YH, Mohamed EA, Oh SA, Pang MG (2008): Effect of storage times on the kinematics and capacitation status in liquid boar semen. *Reprod Dev Biol* 32:59-64.
14. Sutkeviciene N, Andersson M (2005): Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. *Theriogenology* 63: 739-747.
15. Vishwanath R (2003): Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 59:571-584.
16. Waberski D, Magnus F, Mendonca Ferreira F, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E (2005): Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology* 63:470-484.
17. Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K (1995): Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 104: 305-313.
18. Watson P (1990): Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, pp 747-869.
19. Lee SH, Cheong HT, Yang BK, Park CK (2005): Development of semen extenders by assessment of sperm viability in miniature-pig semen. *Reprod Dev Biol* 29:247-252.
20. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In Knobil E and Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction* 2nd ed. Raven Press. New York, USA, pp 189-317.

(접수번호: 2010. 9. 13 / 채택번호: 2010. 9. 17)