

미니돼지 정액 동결 시 Methyl-Beta-Cyclodextrin (MBCD)이 냉각 충격과 막 콜레스테롤량에 미치는 영향

이성영¹ · 이용승¹ · 정희태² · 양부근¹ · 박춘근^{1,†}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학

Effects of Methyl-Beta-Cyclodextrin (MBCD) on Cold Shock and Membrane Cholesterol Quantity during the Freezing Process of Miniature Pig Spermatozoa

Sung-Young Lee¹, Yong-Seung Lee¹, Hee-Tae Cheong², Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,†}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

This study was undertaken to find out the effect of methyl-beta-cyclodextrin (MBCD) on cold shock and membrane cholesterol quantity of sperm during the freezing process in miniature pigs. For this study, semen ejaculated from PWG M-type miniature pig was diluted that freezing solution (with egg yolk group) and m-Modena B (without egg yolk group) treated with 0, 1, 5, 10 and 20 mM MBCD before freezing process. The diluted semen was monitored sperm ability at room temperature, after cooled until 5°C and after frozen-thawed for cold shock test of spermatozoa. Also, membrane cholesterol of sperm was extracted by folch solution at the same time. sperm ability was assessed for viability and acrosomal status. The membrane cholesterol quantity was measured by thin-layer chromatography (TLC) method. The result, viability and acrosome integrity in semen diluted without egg yolk groups were decreased at all temperature range by increasing of MBCD concentration. In particular, sperm of egg yolk group was showed that significantly higher viability and lower acrosome damage when treated with 5 mM MBCD ($p < 0.05$). The results of TLC experiment, cholesterol amounts were increased with MBCD cocentration in egg yolk, and decreased with MBCD concentration in m-Modena B. In cryopreservation efficiency, there was no significant difference at viability, and acrosomal state of sperm in 5 mM MBCD concentration was significantly lower in acrosome damage than other groups ($p < 0.05$). Therefore, the addition MBCD in egg yolk was protected spermatozoa from cold shock injury. This protective effect of MBCD may be due to addition of sperm membrane cholesterol.

(Key words : Miniature pig, Cryopreservation, Cyclodextrin, Cholesterol)

서 론

가축 산업에서 동결정액의 이용은 매우 중요한 잠재력을 갖고 있으며, 지난 30여 년 동안 정자의 동결보존에 대한 연구는 많이 이루어져 왔다. 우수한 개체 생산과 가축 개량 촉진, 생산성 향상을 위해 신선 정액이 인공수정에 이용되고 있으나, 신선 정액은 체외에서 단기일 밖에 보존할 수 없기 때문에 동결정액의 필요성이 대두되고 있다. 동결정액의 장점으로는 반영구적인 정액의 보존, 원하는 시기에 인공수정을 통한 산자의 생산, 유전자원의 보존, 조기 유전적 능력 검정을 통한 우수한 종돈의 다량

생산 등이 있다. 그러나 돼지에서 동결정액으로 인공수정을 한 경우에는 신선 정액을 이용할 경우보다 얻어진 산자의 크기와 수가 적다는 보고가 있다(Johnson 등, 2000). 또한, 동결 용해된 돼지 정자의 낮은 생존율은 동결 정자의 성공적인 인공 수정과 상업적인 번식에서 광범위한 이용을 제한한다(Almlid 등, 1996). 특히 돼지 정자는 저온 충격에 의한 손상에 극도로 민감한 특성이 있다(Watson, 1981). 이러한 냉각 충격 손상에 대한 정자의 민감성은 막 인지질 구성과 막 콜레스테롤과 인지질 비율에 의해 결정되고(Holt 등, 2000), 높은 콜레스테롤 : 인지질 비율을 지닌 토끼와 인간 정자는 낮은 콜레스테롤 : 인지질 비율을 가진 돼지, 종마, 양, 소 정자에 비해 냉각

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070301034040)의 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8600, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

충격 손상에 저항성이 높다(White 등, 1993). 세포막의 주요 구성 물질인 콜레스테롤은 세포막 기능을 조절하는 중요한 역할을 한다(Yeagle, 1985). 또한, 막 콜레스테롤 함량은 막의 유동성(Hartel 등, 1998)과 투과성(McGrath, 1988)을 결정하는 데에 중요하게 여겨진다. 다른 한편, 가축을 위한 대부분의 정액 동결보존액은 egg yolk가 일반적으로 이용되고 있다. 이는 다른 성분들과 함께 온도 손상으로부터 세포막과 침체를 보호하는 정자 동결보존에 효과적인 장점을 가지고 있을 것이라 보여진다(Amirat 등, 2004). 이는 동결 용해 과정 동안, egg yolk 내의 인지질과 콜레스테롤, 저밀도 지단백질을 제공하여 저온 충격으로부터 정자를 보호하는 것이라고 여겨진다. 7개의 beta(1,4)-glucopyranose로 구성된 구형 올리고당인 methyl-beta-cyclodextrin(MBCD)는 세포막으로부터 콜레스테롤을 선택적으로 유출시키는 역할을 한다(Pike와 Miller, 1998). 지질과 결합할 수 있는 소수성 부분을 포함하는 구형 올리고당인 cyclodextrin을 콜레스테롤과 소 정자에 처리하여 배양하였을 때, 동결 용해 후 세포의 높은 운동성과 생존율이 나타났다(Purdy 등, 2004).

따라서 본 연구는 선행연구를 바탕으로 egg yolk를 첨가한 것과 첨가하지 않은 동결보존액에 MBCD를 각 농도(0, 1, 5, 10, 20 mM)별로 처리하여 25°C와 5°C, 동결 용해 후 정자 생존율과 침체 상태, 막 콜레스테롤 양 변화를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

정액의 준비

본 연구에 이용된 돼지는 강원대학교 목장에서 사육되고 있는 PWG miniature pig를 이용하였다. 의빈대를 이용한 음경 수압법으로 정액을 채취하여 가온된 병에 거즈를 통해 정액을 거른 후, 37°C로 가온된 병에 옮겨 2시간 이내로 실험실로 운반하여 사용하였다. 실험에 사용된 정액은 Modena B 희석제 (Lee 등, 2005)로 1차 희석하여 실온에서 1시간 이상 정치하였으며, 70% 이상의 정상 움직임과 80% 이상의 생존율을 나타내는 정액을 사용하였다.

정액 동결 과정

미니 돼지 정액은 서로 다른 두 개의 동결보존액을 이용하여 동결되었다. 일반적으로 돼지 정액 동결에 이용되는 동결보존액 LEY와 egg yolk를 넣지 않은 일반 희석제인 Modena B의 두 가지 동결보존액을 이용하였다. LEY 1차 동결보존액은 11% α -lactose 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 MBCD를 0, 1, 5, 10, 20 mM의 각 농도로 처리하고, 20% egg-yolk를 첨가하여 각각 원심분리(4,500 rpm, 90 min, 4°C)하여 상층액을 사용하였다. 2차 동결보존액은 1차 동결보존액에 9% Glycerol(Sigma)과 1.5% Orvus Es Paste(OEP ; Nova Chem., USA)를 첨가하여 4°C 냉장고에 보관하였다.

동결 과정은 Modena B로 1차 희석하여 정치된 미니 돼지 정액을 원심분리(1,500 rpm, 10 min, 25°C)하여 상층액을 제거한 후 정액의 농도를 1×10^9 개/ml가 되도록 1차 동

결보존액을 첨가하고, 2시간 동안 5°C로 냉각하였다. 그 후 2차 동결보존액을 1차 동결보존액의 1/2을 첨가하여 0.5 ml straw에 주입하였고, 6 cm 정도의 액체 질소를 담은 용기 표면으로부터 10 cm 위에서 10분간 예비동결 후 액체질소에 침지하여 동결 보존하였다.

동결 정액 용해 및 성상 검사

용해에 사용된 동결 정액은 최소 7일 이상 보관된 것을 이용하였으며 동결된 straw는 55°C에서 13초 동안 용해하였다. 37°C로 가온된 Beltsville thawing solution (BTS)로 희석한 후 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 상층액을 제거하고 다시 BTS 1 ml를 분주하여 실험에 사용하였다. 정자 성상 검사는 생존율과 침체 상태 검사를 하였다.

생존율 검사는 Live/Dead™ sperm viability kit (Molecular Probes)를 이용한 방법을 실시하였다. Live sperm과 Dead sperm 사이의 DNA의 차이를 이용한 형광염색 방법으로 Live sperm은 SYBR-14에 의해 녹색으로 염색되며, Dead sperm은 PI(Propidium Iodide)에 의해 붉은 색으로 염색되게 된다. 실험 과정은 100 μ g의 정액에 1 ml의 HEPES(Sigma)+0.1%BSA와 5 μ g의 SYBR-14 working stock (2 μ g SYBR-14+198 μ g DMSO)을 첨가하여 incubater(37°C) 상에서 10분간 정치시켰다. 10분 후 5 μ g의 PI를 첨가하여 incubater(37°C) 상에서 10분간 정치 후 형광 현미경(400배) 하에서 관찰하였다. 침체를 검사는 Chlortetracycline (CTC) 염색을 이용한 침체율을 검사방법을 이용하였다. 실험 과정은 정자부유액 100 μ g에 2 μ g의 Hoechst33258을 첨가하여 실온에서 3분간 정치 후 1 ml의 3% polyvinylpyrrolidone(PVP, ICN Biomedicals)를 첨가시켜, 실온에서 원심분리(400 \times g, 5분)하여 상층액을 제거한 후 100 μ g의 PBS를 부유하였다. 부유된 정액에 동량의 CTC solution((750 μ M Chlortetracycline (Sigma)+5 mM cysteine+130 mM NaCl+20 mM Tris(pH7.8))을 첨가시키고, 실온에서 3분간 정치시켰다. 그 후 8 μ g의 CTC fixative (12.5% (w/v) paraformaldehyde+0.5 M Tris-HCl(pH 7.4))를 첨가하여 정자를 고정시켰다. 제작된 CTC sample 중 10 μ g를 slide glass에 분주하여 5 μ g의 DABCO와 혼합하여, 형광현미경 (400배) 하에서 정자 두부를 관찰하였다. CTC와 Hoechst33258에 의해 염색된 정자의 모습을 형광현미경 (400배) 하에서 관찰된 정자의 모습으로, 염색된 정자 중 두부 전체가 황색 형광으로 염색된 것은 수정능 획득 및 침체반응이 일어나지 않은 정자(F), 침체부위만 염색된 것은 수정능 획득이 일어난 정자(B), 두부가 거의 되지 않은 것은 침체반응이 일어난 정자(AR)로 판정하였다.

막 콜레스테롤 양 측정

정자 막 콜레스테롤 양 측정은 25°C에서 0, 5, 10, 및 20 mM의 MBCD가 첨가된 LEY 동결액과 Modena B에 한 시간 동안 방치해둔 정자를 이용하였다. 정자는 원심분리 (1,500 rpm, 5분)하여 상층액을 제거 후 Modena B 희석제를 분주 후 다시 동일 조건으로 2회 정자를 세척 후 원심분리 (2,000 rpm, 10분)를 실시하여 상층액을 제거 후 6 ml Folch 용액(chloroform:methanol=2:1)을 넣고 vortexing 하였다. Vortexing한 정자에 0.58% NaCl 용액

1.5 ml를 넣고 vortexing 한 후 원심분리 (1,200 rpm, 10 분)한다. 원심분리가 끝난 정자는 3개의 층으로 분리되는데 위에 두개의 층을 조심스럽게 걷어내고 아래층의 chloroform 용액에 녹아있는 지질을 새 tube로 옮긴다. 새로 옮긴 tube에 2 ml의 용액(chloroform: methanol:0.6% NaCl=3:48:47)을 넣고 vortexing한다. 이 후 원심분리(1,200 rpm, 10분)를 실시하여 제일 아래에 chloroform 층을 회수하여 질소기체로 chloroform을 날려 보내고 400 ul Folch 용액에 녹여서 Thin-layer chromatography (TLC) 방법을 이용하여 지질분석을 실시하였다. 추출된 지질을 취해 silicagel 판에 주입하였고, Silicagel 판을 전개액(chloroform:ethanol:water: triethylamine=30:35:7:35 (v/v/v))에 담귀 전개가 끝나면 전개액을 공기 중에 날려 보낸 다음 요오드로 염색하여 콜레스테롤 양 변화를 분석하였다. Silicagel 상의 콜레스테롤의 위치를 판별하기 위해 콜레스테롤 (SUPELCO, USA) standard를 같이 전개하여 정자내 콜레스테롤의 위치를 확인하였다.

실험 설계

실험 1

MBCD에 의한 정자내 콜레스테롤 양의 변화를 분석하기 위해 25°C에서 각 농도(0, 5, 10, 20 mM)의 MBCD가 첨가된 LEY 동결보존액과 Modena B에 한 시간 동안 방치해둔 정자를 이용하여 정자내 콜레스테롤을 추출하였다. 지질 추출은 Folch 방법을 이용하였고, TLC 방법을 이용하여 콜레스테롤을 분리하고 요오드 염색하여 LEY 동결액과 Modena B에서 MBCD 농도에 따른 막 콜레스테롤 변화를 비교 분석하였다.

실험 2

온도 충격에 대한 MBCD 첨가의 효율성 분석을 위해 egg yolk를 첨가한 LEY 동결보존액과 egg yolk를 첨가하지 않은 Modena B에 MBCD를 각 농도 (0, 1, 5, 10, 20 mM) 별로 처리하여 25°C와 5°C, 동결 용해 후 정자 생존율과 침체 상태를 비교 분석하였다. 또한, MBCD 첨가의 동결 효율성을 평가하기 위해 신선 정액과 LEY 동결보존액에 MBCD를 각 농도 (0, 1, 5, 10, 20 mM) 별로 처리하여 동결 용해 후 정자 생존율과 침체 상태를 비교 분석하였다. 생존율은 SYBR-14와 PI 형광 염색약을 이용한 double stain 방법을 이용하여 Flow cytometry로 형광의 발현차를 분석하였다. 침체 상태 검사는 chlortetracycline (CTC) staining solution 형광염색약을 이용하여 flow cytometry로 형광의 발현 패턴을 비교 분석하였다.

통계처리(Statistical Analysis)

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.2을 이용하여 egg yolk 유무에 따른 유의적 차이 분석은 최소 유의차 검정(Least Significant Different test; LSD test)을 이용하였으며, MBCD 농도간 유의적인 차이는 General linear model (GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차(p<0.05)를 검정하였다.

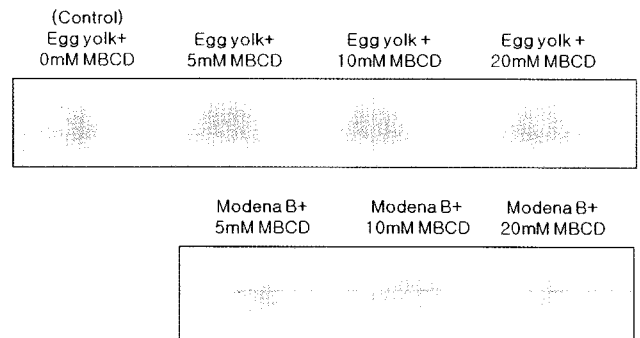


Fig. 1. Effects of MBCD and egg yolk on membrane cholesterol quantity of miniature pig sperm analyzed by TLC.

결 과

LEY 동결보존액과 Modena B에 MBCD 첨가 시 정자의 막 콜레스테롤의 변화

정자 막 콜레스테롤은 TLC 방법을 이용하여 분리하였고, 요오드 염색하여 LEY 동결보존액과 Modena B에서 MBCD 농도에 따른 막 콜레스테롤 변화를 비교 분석하였다. 막 콜레스테롤 변화 결과는 Fig. 1에 나타났다. Egg yolk를 첨가한 LEY 동결보존액에서는 MBCD 농도가 증가할수록 콜레스테롤 농도가 증가하였지만, egg yolk를 첨가하지 않은 Modena B에서는 MBCD 농도가 증가할수록 콜레스테롤 농도가 감소하는 결과를 나타냈다.

LEY 동결보존액과 Modena B에 MBCD를 첨가하여 냉각 충격을 주었을 시 정자의 생존율과 침체 상태의 변화

LEY 동결보존액과 Modena B에 MBCD를 각 농도 (0, 1, 5, 10, 20 mM) 별로 처리하여 25°C와 5°C, 동결 용해 후 SYBR-14/PI와 CTC staining solution으로 형광 염색하여 flow cytometry를 통해 정자 생존율과 침체 상태를 비교 분석하였다. 25°C에서 정자 생존율은 Fig. 2에 나타냈고, 침체 상태는 Table 1에 나타났다. Modena B에서 MBCD 농도가 증가할수록 생존율이 감소하였지만, LEY 동결보존액에서는 Modena B에 비해 생존율이 감소하였

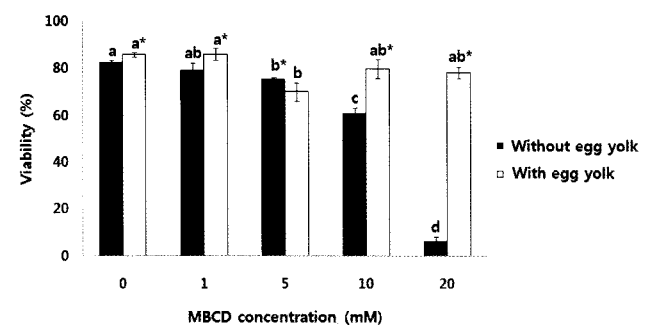


Fig. 2. Change of sperm viability by treatment with MBCD and egg yolk at 25°C. ^{a-d}: Different letters indicate significant differences in MBCD concentrations (p<0.05). *: Significantly differences between egg yolk and with out egg yolk groups (p<0.05).

Table 1. Change of CTC patterns by treatment with MBCD and egg yolk at 25°C

MBCD treatment (mM)	CTC patterns (Mean±SEM,%)					
	Non egg yolk			Egg yolk		
	F	B	AR	F	B	AR
0	47.3±0.9 ^{a*}	38.7±0.9 ^b	14.0±1.7 ^d	42.0±1.5 ^{bc}	43.0±0.6 ^{a*}	15.0±1.2 [*]
1	22.0±0.6 ^c	50.0±1.7 ^{a*}	28.0±1.2 ^{c*}	38.3±5.5 ^{c*}	48.3±3.3 ^a	13.4±3.2
5	25.7±0.3 ^b	47.3±1.5 ^{a*}	27.0±1.7 ^{c*}	51.0±1.0 ^{a*}	34.0±1.7 ^b	15.0±2.0
10	19.7±0.9 ^c	36.7±1.7 ^{b*}	43.6±2.4 ^{b*}	51.3±0.9 ^{a*}	36.3±1.3 ^b	12.4±1.5
20	12.3±1.5 ^d	37.7±1.2 ^{b*}	50.0±1.2 ^{a*}	48.0±1.0 ^{ab*}	36.7±0.9 ^b	15.3±1.5

Means±SEM are presented. ^{a-d}: Different letters indicate significantly differences in MBCD concentrations ($p<0.05$). ^{*}: Significantly differences between egg yolk and with out egg yolk groups ($p<0.05$).

Table 2. Change of CTC patterns by treatment with MBCD and egg yolk at 5°C

MBCD treatment (mM)	CTC patterns (Mean±SEM,%)					
	Non egg yolk			Egg yolk		
	F	B	AR	F	B	AR
0	26.0±1.8 ^b	49.7±0.9 ^{a*}	24.3±2.6 ^{d*}	34.0±0.6 ^{b*}	43.7±0.3 ^{ab}	22.3±0.9 ^a
1	21.3±4.3 ^{bc}	47.0±4.0 ^{a*}	31.7±0.3 ^{c*}	36.3±1.5 ^{ab*}	43.0±0.6 ^{ab}	20.7±0.9 ^{ab}
5	35.3±2.0 ^a	38.3±2.0 ^b	26.3±0.3 ^{d*}	45.3±1.8 ^{a*}	38.7±0.7 ^{ab*}	16.0±1.2 ^d
10	24.3±2.0 ^b	39.0±2.3 ^{b*}	36.7±0.3 ^{b*}	45.3±0.9 ^{a*}	35.7±0.3 ^b	19.0±0.6 ^{bc}
20	14.0±0.6 ^c	35.0±1.7 ^b	51.0±2.3 ^{a*}	36.0±6.4 ^{ab*}	46.0±6.3 ^{a*}	18±0.1 ^{cd}

Means±SEM are presented. ^{a-d}: Different letters indicate significantly differences in MBCD concentrations ($p<0.05$). ^{*}: Significantly differences between egg yolk and with out egg yolk groups ($p<0.05$).

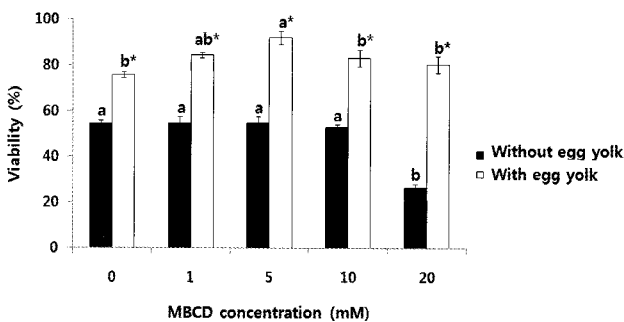


Fig. 3. Change of sperm viability by treatment with MBCD and egg yolk at 5°C. ^{ab}: Different letters indicate significantly differences in MBCD concentrations ($p<0.05$). ^{*}: Significantly differences between egg yolk and with out egg yolk groups ($p<0.05$).

다. 20 mM의 경우 Modena B(6±2.08%)와 LEY 동결보존액(78.3±2.4%) 사이에서 생존율이 큰 차이를 보였다. 침체 상태는 Modena B에서 MBCD 농도가 증가할수록 AR pattern이 증가되었지만, LEY 동결보존액에서 AR pattern은 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Fig. 3에는 5°C에서의 정자 생존율을 나타냈고, Table 2

에는 침체 상태를 나타냈다. Modena B는 LEY 동결보존액에 비해 생존율이 모두 낮은 결과를 나타냈고, LEY 동결보존액에서는 5 mM(92±3%)의 생존율이 유의적($p<0.05$)으로 높았다. 5°C에서 침체 상태도 Modena B에서 MBCD 농도가 증가할수록 AR pattern이 증가하였고, LEY 동결보존액에서는 AR pattern이 5 mM(16.0±1.2%)에서 유의적($p<0.05$)으로 낮았다.

동결 용해 후 정자 생존율은 Fig. 4에 나타냈고, 침체 상태는 Table 3에 나타냈다. 생존율은 Modena B에서 거의 모두 죽은 상태였고, LEY 동결보존액에서는 유의적($p<0.05$)인 차이가 없었다. 침체 상태는 LEY 동결보존액에서 AR pattern이 5 mM(12.3±0.3%)에서 유의적($p<0.05$)으로 낮았다. Fig. 5는 LEY 동결보존액과 Modena B에서의 생존율을 각 MBCD 농도에서 온도별로 비교하여 나타냈다. Modena B에서 모든 온도에서 MBCD 농도가 증가할수록 생존율이 감소하였고 LEY 동결보존액에서는 Modena B에 비해 생존율이 높은 편이며, 25°C와 5°C에서 1, 10, 20 mM는 유의적($p<0.05$)인 차이가 없었지만, 5 mM는 5°C(92±3%)에서의 생존율이 유의적($p<0.05$)으로 높았다.

LEY 동결보존액에 각 농도(0, 1, 5, 10, 20 mM)의 MBCD를 첨가하였을 시 동결 효율성

Table 3. Change of CTC patterns by treatment with MBCD and egg yolk after frozen-thawing

MBCD treatment (mM)	CTC patterns (Mean±SEM,%)					
	Non egg yolk			Egg yolk		
	F	B	AR	F	B	AR
0	5.3±0.3 ^{ab}	28.7±4.9 ^{ab}	66.0±5.2 ^{bc^d}	17.0±2.3 ^{b^t}	63.3±0.3 ^{a^t}	19.7±2.0 ^a
1	2.0±0.1 ^b	11.3±0.9 ^c	86.7±0.9 ^{a^t}	22.3±0.9 ^{ab^t}	59.7±3.8 ^{ab^t}	18.0±2.9 ^{ab}
5	3.3±0.3 ^b	16.0±2.3 ^{bc}	80.7±2.6 ^{ab^t}	24.0±1.7 ^{ab^t}	63.7±2.0 ^{a^t}	12.3±0.3 ^b
10	2.0±0.6 ^b	11.3±1.5 ^c	86.7±0.9 ^{a^t}	30.0±5.8 ^{a^t}	52.0±3.5 ^{bc^t}	18.0±2.3 ^{ab}
20	9.0±3.5 ^a	30.3±7.2 ^a	60.7±10.7 ^{c^t}	25.5±1.4 ^{ab^t}	51.5±0.3 ^{c^t}	23.0±1.7 ^a

Means±SEM are presented. ^{a-c}: Different letters indicate significantly differences in MBCD concentrations ($p<0.05$). ^{*}: Significantly differences between egg yolk and with out egg yolk groups ($p<0.05$).

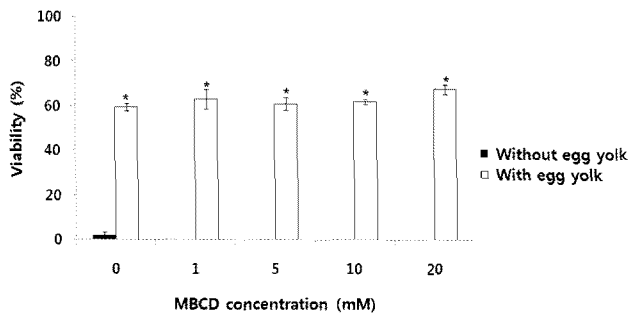


Fig. 4. Change of sperm viability by treatment with MBCD and egg yolk after frozen-thawing. ^{*}: Significantly differences between egg yolk and with out egg yolk groups ($p<0.05$).

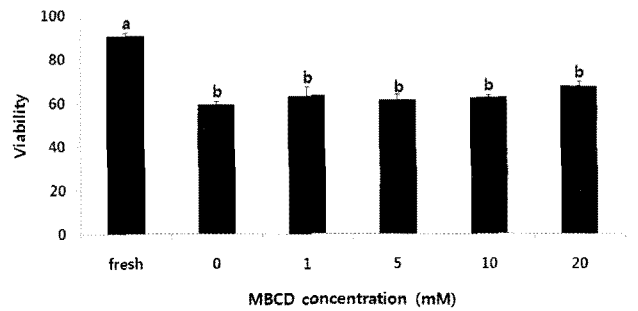


Fig. 6. Effect of MBCD on viability of frozen-thawed sperm in miniature pigs. ^{a,b}: Different letters indicate significantly differences in MBCD concentrations ($p<0.05$).

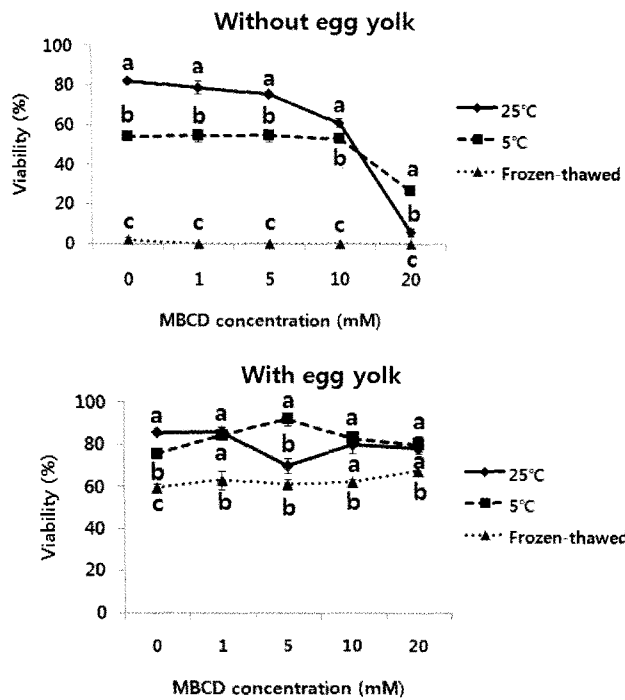


Fig. 5. Changes of viability among 25°C, 5°C and frozen-thawed by treatment with MBCD and egg yolk in miniature pigs. ^{a-c}: Different letters indicate significantly differences between 25°C, 5°C and frozen-thawed ($p<0.05$).

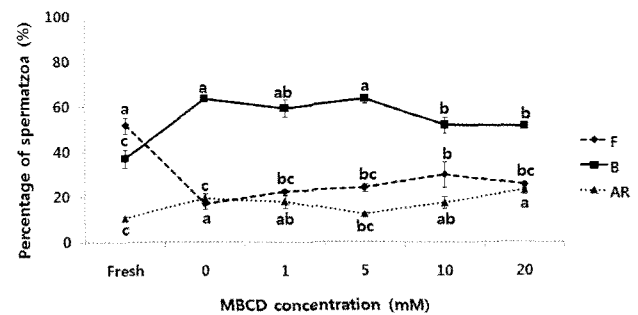


Fig. 7. Effect of MBCD on CTC patterns of frozen-thawed sperm in miniature pigs. ^{a-c}: Different letters indicate significantly differences in MBCD concentrations ($p<0.05$).

MBCD 첨가에 따른 동결보존 효율을 분석하기 위해 생존율분석(Fig. 6)과 침체상태를 CTC분석(Fig. 7)을 통해 분석하였다. MBCD를 첨가하여 동결 용해하였을 때 모두 신선 정액보다 생존율이 낮았지만 MBCD 농도에 따라 생존율에 유의적($p<0.05$)인 차이가 없었다. 침체 상태는 AR pattern이 5 mM(12.5±0.3%)에서 유의적($p<0.05$)으로 낮았다.

고찰

돼지 정액은 다른 가축에 비해 농도는 적고, 사출된 정

액량이 많고 내동성과 온도 저하에 내성이 약하다(Maxwell과 Johnson, 1997). 온도 변화와 저온충격에 민감한 돼지정액은 동결과정 중 60% 이상의 정자가 사멸하게 된다. 저온 충격과 정자의 생존율의 관계는 동결과정 중 세포내의 빙정 형성으로 인한 막 손상, 세포 내외의 삼투압 차이로 인한 영향으로 전해질 대사의 심각한 변화, 정자막의 손상으로 인한 침체반응 유발, 핵 내의 DNA 손상이 이루어지게 된다(Salisbury 등, 1978). 따라서 이러한 정자의 생존 능력을 높이고자 인지질에 대한 연구(Holt와 North, 1984, 1986; Crowe 등, 1989; Park과 Lynch, 1992), L-glutamine(Mercado 등, 2008), α -tocopherol(Jung 등, 2009) 등과 같은 항산화제의 첨가, 콜레스테롤의 첨가 등의 연구가 활발하게 이루어지고 있지만, 아직 동해 원인에 대한 정확한 기작과 다른 포유동물에 비해 용해 후 정자의 생존율이 낮은 실정이다.

동결보존에 필요한 보존액은 세포를 반영구적으로 보존시킬 수 있을 뿐만 아니라 정액과 초기배 수정란의 장기보존에 이용되며, 번식 연구 분야에 많은 영향을 끼쳤다. 동결보존에 사용되는 돼지정액 동결보존제는 일반적으로 당, protein, lipoprotein, buffer 등에 따라 나눌 수 있다. 희석액의 종류에는 egg yolk-glucose(Polge 등, 1970), egg yolk-lactose(Richter 등, 1975; Westendorf 등, 1975), Beltsville F3(BF3; Pursel와 Johnson, 1973) 등이 있고, 여기에 비전해질로서 물에 녹기 쉽고, pH가 중성이고, 세포에 대한 투과성이 높은 동해보호제를 첨가하여 사용한다. 이러한 동해보호제에는 exythrion, xylitol, adontiol, acetamide, glycerol 및 DMSO 등이 있는데, 그 중 glycerol이 널리 쓰이고 있다.

또한, MBCD는 다양한 세포로부터 막 콜레스테롤과 결합하여 막으로부터 콜레스테롤을 유출시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만 본 연구는 MBCD가 egg yolk 내의 콜레스테롤과 결합하여 막으로 콜레스테롤을 유입시킬 것이라 생각되어 돼지 정액에 있어 저온 충격에 대한 MBCD의 효능에 대하여 검증하고자 하였다. 따라서 MBCD 농도에 따른 막 콜레스테롤 변화를 관찰한 결과, egg yolk를 첨가하지 않은 Modena B에서는 MBCD 농도가 증가할수록 콜레스테롤 농도가 감소하였지만, egg yolk를 첨가한 LEY 동결보존액에서는 MBCD 농도가 증가할수록 콜레스테롤 농도가 증가하였다. 이는 egg yolk가 없는 Modena B에서는 MBCD가 막으로부터 콜레스테롤을 유출시키는 작용을 하였고, LEY 동결보존액에서는 egg yolk 내의 콜레스테롤과 결합하여 막 내로 유입시켜준 것으로 생각이 된다.

정액의 동결 보존 과정은 정자의 생존율에 영향을 미치게 된다. 25°C에서 생존율은 Modena B에서 MBCD 농도가 증가할수록 생존율이 유의적으로 감소하였지만, LEY 동결보존액에서는 MBCD 농도가 증가할수록 생존율이 소폭 감소하였고, 5 mM에서 유의적($p < 0.05$)으로 낮았다. 5°C에서 생존율은 Modena B에서, LEY 동결보존액에 비해 생존율이 모두 낮은 결과를 나타냈고, LEY 동결보존액에서는 5 mM일 때의 생존율이 유의적($p < 0.05$)으로 높았다. 동결-용해 후 생존율은 Modena B에서 거의 모두 죽은 상태였고, LEY 동결보존액에서는 유의적($p < 0.05$)인 차이가 없었다. 따라서 LEY 동결보존액 내 MBCD의 첨가는 막 내 콜레스테롤 농도를 증가시켜 생존율을 증가시켰을 것이라 생각된다.

수정능 획득과 침체 반응은 정자-난자의 수정에 있어 중요한 기능을 한다. 수정 능력을 획득하는 동안 정자 세포막 특성의 변화, 효소 활성화 및 운동성은 난자 내 침투 능력을 원활하게 하고 수정을 위해 침체 반응을 야기시키는 작용을 한다. Gillan 등(1997)에 의하면 신선 정자에 비해 동결 용해 과정을 거친 정자의 경우 B pattern과 AR pattern이 증가한다는 보고가 있다. 정자의 침체 반응율의 지표로 쓰이는 AR pattern의 경우를 보면 25°C에서 침체 상태는 Modena B에서 MBCD 농도가 증가할수록 F pattern이 감소하고 AR pattern이 증가되었지만, LEY 동결보존액에서는 AR pattern은 유의적($p < 0.05$)인 차이가 나타나지 않았다. 5°C에서 침체 상태도 Modena B에서 MBCD 농도가 증가할수록 AR pattern이 증가하였고, LEY 동결보존액에서는 AR pattern이 5 mM에서 유의적($p < 0.05$)으로 낮았다. 동결 용해 후 침체 상태는 LEY 동결보존액에서 AR pattern은 5 mM에서 유의적($p < 0.05$)으로 낮았다. LEY 동결보존액 내 MBCD 첨가는 AR pattern을 낮추는데 있어 효과적일 것이라 생각한다. 일반 LEY 동결보존액에 MBCD를 첨가하여 효율성을 보았을 때 모두 신선한 정액보다 생존율이 낮았지만 MBCD 농도에 따라 생존율에 유의적($p < 0.05$)인 차이가 없었다. 침체 상태는 AR pattern이 5 mM에서 유의적($p < 0.05$)으로 낮았다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 LEY 동결보존액 내 MBCD 첨가는 정자막 내 콜레스테롤량을 증가시켜 주고, 그러므로 이는 돼지 정자의 생존율을 유지시켜 동결 보존에 좋은 효과를 주었다. 이는 MBCD가 egg yolk 내의 콜레스테롤과 결합하여 정자막 내로 유입시켜 주어 냉각 충격 손상에 대한 저항성을 향상시켜 생존율을 유지시킨 것으로 사료된다. 그리고 각 농도의 MBCD를 처리해본 결과, 농도가 5 mM일 때 정자의 저온 충격 보호에 도움을 주는 것으로 여겨진다. 따라서 LEY 동결보존액 내 MBCD 첨가는 돼지 동결정액의 생존율과 침체 상태에 좋은 영향을 미쳐 결과적으로는 돼지 동결정액의 수정율을 향상시키는데 기여할 것이다. 향후 이와 관련하여 LEY 동결보존액과 Modena B에 각 농도의 MBCD를 첨가하여 25°C와 5°C, 동결 용해 후 막 콜레스테롤량의 변화를 관찰하고, 이를 분석하여 수치로 표현하는 연구가 필요할 것이라 생각된다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 정액 성상분석 장비의 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소에 감사드립니다.

인용문헌

1. Almlid T, Hofmo PO (1996): A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. *Reprod Domest Anim* 31:169-173.
2. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M (2004): Bull semen

- in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61:895-907.
3. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchordoguy TJ, Drobnis E (1989): Lipid phase transitions measured in intact cell with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 26:76-84.
 4. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:481-487.
 5. Hartel S, Diehl HA, Ojeda SF(1998): Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. *Anal Biochem* 258:277-284.
 6. Holt WV, North RD (1984): Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains : freeze-fracture study. *J Exp Zool* 230:473-483.
 7. Holt WV, Head MF, North RD (1986): Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 78:445-457
 8. Holt WV (1997): Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 9:309-319.
 9. Holt WV (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.
 10. Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Mohana Kumar B, Balasubramanian S, Rho GJ (2009): Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58:181-189.
 11. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
 12. 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(4): 247-252.
 13. Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48:209-219.
 14. Mercado E, De, Hernandez M, Sanz E, Rodriguez A, Gomez E, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J (2008): Evaluation of L-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 115:149-157.
 15. McGrath JJ (1988): Membrane transport properties. In: McGrath JJ, Diller KR, eds. *Low Temperature Biotechnology: Emerging Applications and Engineering Contribution*. New York, NY: ASME Press, BED-Vol 10, HTD-Vol 98, 273-330.
 16. Park JE, Lynch DV (1992): Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255-266.
 17. Pike LJ, Miller JM (1998): Cholesterol depletion delocalizes phosphatidyl inositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidyl inositol turnover. *J Biol Chem*. 273:22298-22304.
 18. Polge C, Salamon S, Wilmut I (1970): Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Res* 87:424-428.
 19. Purdy PH, Graham JK (2004): Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod* 71:522-527.
 20. Pursel VG, Johnson LA (1973): Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *USDA. ARS Bull* 44-227:1-5.
 21. Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR (1978): *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. W. H. Freeman and Co. 2nd (eds), San Francisco, USA.
 22. Watson PF (1981): The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clarke A (eds.), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. London: Academic Press; 189-218.
 23. White IG (1993): Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5:639-658.
 24. Yeagle PL (1985): Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 822:267-287.
- (접수일자: 2011. 8. 15 / 채택일자: 2011. 8. 22)