

소 정액의 동결 보존시 Methyl-Beta-Cyclodextrin (MBCD)의 영향

이경진¹ · 서기범¹ · 이용승¹ · 유한준¹ · 정희태² · 이승환³ · 양부근¹ · 박춘근^{1,*}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 수의과대학, ³국립축산과학원

Effect of Methyl-Beta-Cyclodextrin (MBCD) on Cryopreservation of Bull Spermatozoa

Kyung-Jin Lee¹, Gi-Beom Seo¹, Yong-Seung Lee¹, Han-Jun Yoo¹, Hee-Tae Cheong²,
Seung-Hwan Lee³, 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

³National Institute of Animal Science, Suwon 441-706, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate efficiency of methyl-beta-cyclodextrin (MBCD) in the sperm preservation of bull. For this study, the freezing of diluted semen were added with Triladyl containing 20% egg-yolk and/or 0, 1, 5, 10 and 20 mM MBCD before freezing process. Analysis of viability in frozen-thawed sperm was estimated by SYBR14/PI double stain, hypoosmotic swelling test(HOST) and acrosome damage with FITC-PNA, and mitochondria activation with Rhodamin123 by flow-cytometry. The sperm viability was significantly higher in 0 mM and 5 mM concentrations of MBCD than other groups ($p < 0.05$). However, the HOST was significantly lower at 20 mM concentration of MBCD than other concentrations ($p < 0.05$). In addition, acrosome damage and mitochondria activation rates were significantly lower at 20 mM concentration of MBCD than other groups ($p < 0.05$). In conclusion, the viability of sperm was not significantly different among concentrations of MBCD 0, 5 and 10 mM, but MBCD 20 mM was significantly lower than other groups. In addition, as concentrations of MBCD was high, HOST, acrosome damage and mitochondria activation rates had a negative effect in bull sperm.

(Key words : Methyl-beta-cyclodextrin, Cholesterol, Cryopreservation, Flow-cytometry, Bull sperm viability)

서 론

가축 정액의 동결보존에 관한 연구는 지난 30여 년 동안 계속하여 이루어져 왔으나, 신선 정액과 같은 수정을 위해 개선해야 할 점이 많이 남아 있다(Thundathil 등, 1999). 동결정액은 신선정액에 비하여 생존성과 수정율이 떨어지고(Hammerstedt 등, 1990; Medeiros 등, 2002), 동결 과정 중에 생기는 온도 충격이나 막 손상 등의 다양한 스트레스를 정자에 제공하게 된다(Curry, 2000). 한편, 정자의 환경온도가 20°C 이하로 낮아지면 대사활성이 감소되기 시작하며, 10°C 이하에서는 저온 충격을 받아 해당 작용과 호흡작용이 저하되고, 생존성과 수정 능력이 감퇴되며 침체도 손상된다. 동결 과정 중의 온도 충격의 원인으로서는 막 인지질 구성과 막 콜레스테롤 및 인지질 비율에 의해 결정되고(Holt 등, 2000), 높은 콜레스테롤과 인지질 비율을 지닌 토끼와 인간 정자는 낮은 콜레스테롤,

인지질 비율을 가진 돼지, 종마, 양, 소 정자에 비해 온도 충격에 대한 저항성이 높다(Watson, 1981; Parks and Lynch, 1992; White 등, 1993)는 보고가 있다. 동결 과정 중에 생기는 온도 충격을 극복하기 위하여 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. 종마(Combes 등, 2000; Moore 등, 2005), 소(Purdy and Graham, 2004), 양(Morrier 등, 2004)에서 동결 전에 cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC)의 처리한 정액에서 처리하지 않은 정액보다 높은 생존율을 보였고, cyclodextrins은 세포막의 콜레스테롤 내용을 바꾸는데 이용될 수 있으며(Christian 등, 1997; Visconti 등, 1999), cyclodextrins이 콜레스테롤로 미리 유도되는 경우에 막으로 콜레스테롤을 삽입한다(Navratil 등, 2003). 한편, 가축을 위한 대부분의 정액 동결보존액은 egg yolk가 일반적으로 이용되고 있

* 본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : PJ 907008)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

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

다. 이는 동결 용해 과정 동안 egg yolk 내에 다양 함유되어 있는 인지질과 콜레스테롤, low-density lipoproteins (LDL)을 제공하여 저온 충격으로부터 정자를 보호하는 것이라고 여겨지며, 다른 성분들과 함께 온도 손상으로부터 세포막과 첨체를 보호하는 정자 동결보존에 효과적인 장점을 가지고 있을 것이라 보여진다(Amirat 등, 2004). 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). 이에 egg yolk 내에 LDL과 콜레스테롤이 MBCD와 결합하게 되면 CLC가 형성되어 소 정액의 동결 용해 후 생존율 향상에 도움을 줄 것이라는 가설 하에 연구를 진행하였다.

따라서 본 연구는 한우 정액 동결 보존액 내 methyl-beta-cyclodextrin (MBCD) 처리 효과를 flow cytometry를 비롯한 여러 가지 정자 성상 검사를 통하여 정자의 생존율, 미토콘드리아 기능을, 원형질막 기능검사 그리고 첨체 손상을 분석을 통해 동결 보존액 내 MBCD의 효과를 분석하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

정액의 준비

본 연구에 이용된 소는 국립축산과학원 대관령 한우시험장에서 사육되고 있는 소(27223)를 이용하였다. 한우시험장 내에서 직접 채취된 정액은 곧바로 1차 동결액 Triladyl(KRUUSE, Cat. no. 340244)에 20% egg-yolk를 첨가하여 2시간 이내로 실험실로 운반하여 사용하였다. 실험에 사용된 정액은 70% 이상의 정상 움직임과 80% 이상의 생존율을 나타내는 정액을 사용하였다.

정액동결

1차 동결보존액을 처리한 정액은 4°C에서 보존하였으며, 2차 동결보존액은 1차 동결보존액과 같은 Triladyl에 20% egg-yolk를 첨가하여 원심분리(4,500 rpm, 45, min, 4°C)하여 상층액만을 사용하였다.

그 후 methyl-beta-cyclodextrin(MBCD, Sigma)를 각각 0, 5, 10 및 20 mM의 농도로 첨가한 뒤 동결에 사용하였다. 1차 동결보존액이 첨가된 정액은 2차 동결보존액을 첨가했을 때 정자의 최종 농도가 5×10^7 개/ml가 되도록 조정하여 4°C로 냉각하였다. 그 후 0.5 ml straw를 제작하였고, 액체질소가 담겨져 있는 용기 표면위로부터 10 cm 위에서 10분간 정치 후 액체 질소에 침지하여 동결 보존하였다.

동결 정액 용해 및 성상 검사

용해에 사용된 동결 정액은 최소 7일 이상 보관된 것을 이용하였다. 동결된 straw는 37°C에서 45초 동안 용해하였다. 37°C로 가온된 Beltsville thawing solution(BTS)로 희석한 후 실험에 사용하였다. 정자의 성상 검사는 생

존율과 원형질막 기능검사, 첨체 손상을 그리고 미토콘드리아 기능을 검사를 실시하였다.

생존율 검사(SYBR-14/PI Staining)

생존율은 SYBR-14와 PI 형광 염색을 이용한 LIVE/DEAD sperm viability kit (Invitrogen)를 이용하였으며, 실험과정은 100 μ l의 정액에 1 ml의 HEPES(Sigma)+0.1%BSA와 5 μ l의 SYBR-14 working stock (2 μ l SYBR-14+198 μ l DMSO)을 첨가하여 incubator(37°C) 상에서 10분간 정치시켰다. 10분 후 5 μ l의 PI(Propidium Iodide)를 첨가하여 incubator(37°C) 상에서 10분간 정치 후 형광현미경(400배) 하에서 관찰하였다. SYBR-14는 live sperm이 DNA에 binding하여 녹색 형광을 띈다. Dead sperm은 죽거나 세포막에 손상이 생긴 세포의 경우 PI(Propidium Iodide)가 핵 내에 침투하여 DNA에 binding 하여 붉은색 형광을 띄게 되는 원리를 이용하였다.

정자 원형질막 기능검사(Hypoosmotic Swelling Test)

정자 원형질막의 기능검사(Hypoosmotic swelling Test)는 25 mM Na-citrate \cdot 2H₂O (sigma)와 75 mM fructose (sigma)가 혼합된 150 mOsm의 저장액에서 정자를 37°C에서 30분간 배양하여 원형질막이 보존되어 있으면 삼투압 작용이 정상적으로 이루어져 미부가 말리게 되고, 원형질막이 손상을 입으면 미부가 말리지 않는 원리를 이용하여 표본들을 위상차현미경(400배) 하에서 관찰하였다.

첨체 손상을 검사(FITC-PNA/PI Staining)

첨체 손상 검사는 Fluorescein isothiocyanate-labeled peanut-agglutinin(FITC-PNA)와 PI 형광 염색을 이용한 double stain 방법을 이용하여 Flow cytometry (BD, FACS Calibur)로 형광의 발현차를 분석하였다. 실험 과정은 정액 25 μ l에 Beltsville thawing solution (BTS) 희석제 1 ml를 넣고 FITC-PNA를 1 μ l 넣고 incubator (37°C)에서 10분간 배양 후에 PI 염색약을 1 μ l를 넣고 다시 10분간 배양한다. 그 후 원심분리기(1,500 rpm 5 min) 후 상층액을 제거한 뒤 PBS를 1 ml 분주한 다음 Flow cytometry 방법으로 형광의 발현차를 분석하였다. 첨체의 손상은 Fig. 1과 같이 첨체막이 손상되지 않은 부분과 부분적 손상이 일어난 부분 그리고 완전 첨체손상이 일어난 부분을 히스토그램 상에서 분석하였다.

미토콘드리아 기능을 검사(Rhodamin123/PI Staining)

미토콘드리아 기능을 검사는 Rhodamin123와 PI 형광 염색을 이용한 double stain 방법을 이용하여 Flow cytometry로 형광의 발현차를 분석하였다. 실험과정은 정액 25 μ l에 BTS 희석제 1 ml를 넣은 뒤 Rhodamin123 (sigma)+1.5 ng을 넣고 incubator(37°C)에서 10분간 배양 후에 PI 염색약을 1 μ l를 넣고 다시 10분간 배양한다. 그 후 원심분리기(1,500 rpm 5 min) 후 상층액을 제거한 뒤 PBS를 1 ml 분주한 다음 Flow cytometry 방법으로 형광의 발현차를 분석하였다. 미토콘드리아 기능율은 Fig. 2와 같이 Rhodamin123에 의해 미토콘드리아가 activation된 부분과 inactivation된 부분을 히스토그램 상에서 분석하

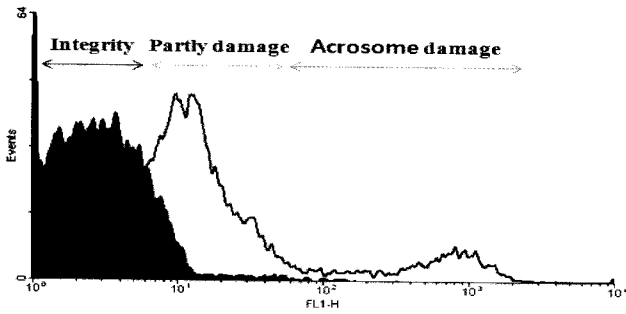


Fig. 1. Histograms of FITC-PNA stained spermatozoa by flow cytometry.

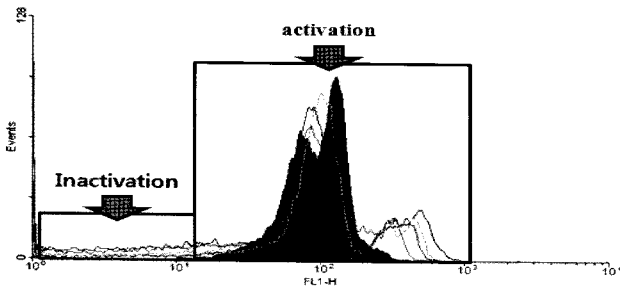


Fig. 2. Histograms of Rhodamin123 stained spermatozoa by flow cytometry.

였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.2을 이용하여 MBCD 처리 농도별 동결 융해된 정자의 정상 차이를 General linear model(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차($p < 0.05$)를 검정하였다.

결 과

동결 보존액 내 MBCD의 농도별 처리 후 정자의 생존을 비교 평가

동결 보존액 내 MBCD를 각각 0 mM, 5 mM, 10 mM 및 20 mM으로 처리하여 동결 융해 후 SYBR-14/PI로 double stain된 정자를 형광현미경으로 분석하여 생존율의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과, 동결을 하지 않은 신선 정액의 생존율이 88.7%로 가장 좋은 생존율을 보였다. 동결한 처리군에서는 0 mM과 5 mM의 MBCD를 처리한 정자의 생존율이 각각 72.5%와 74.3%로 20 mM 처리군에 비하여 유의적으로 높은 생존율을 보였다($p < 0.05$). 한편, 10 mM의 MBCD를 처리한 정자에서는 71%의 생존율을 보였으며, 20 mM의 MBCD를 처리한 정자의 생존율은 60.3%로 신선정액 및 0 mM과 5 mM에 비하여 유의적으로 낮은 생존율을 보였다($p < 0.05$).

정자의 원형질막 기능검사

MBCD가 농도별로 처리하여 동결 융해 후 정자의 원

형질막 기능검사 결과를 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 정자의 원형질막 기능율은 신선정액(35.3%), 0 mM(39%), 5 mM(36%) 및 10 mM(36%)에서 유의적인 차가 인정되지 않았으나, 20 mM(23.7%)의 처리군에 비해 유의적으로 높은 원형질막 기능율을 나타냈다($p < 0.05$).

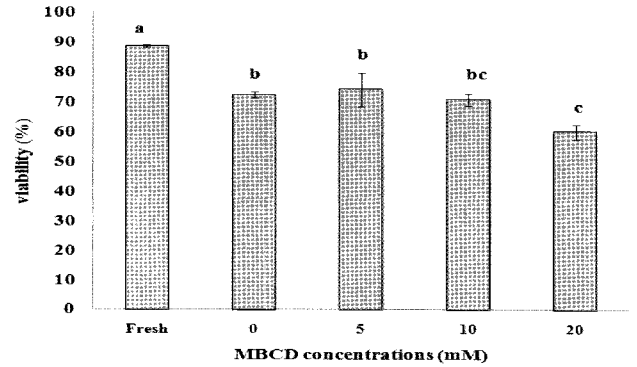


Fig. 3. Effect of different concentrations of methyl-beta-cyclodextrin(MBCD) on frozen-thawed sperm viability in bull. ^{a-c} Bar with different superscripts within the MBCD concentrations category differ significantly ($p < 0.05$).

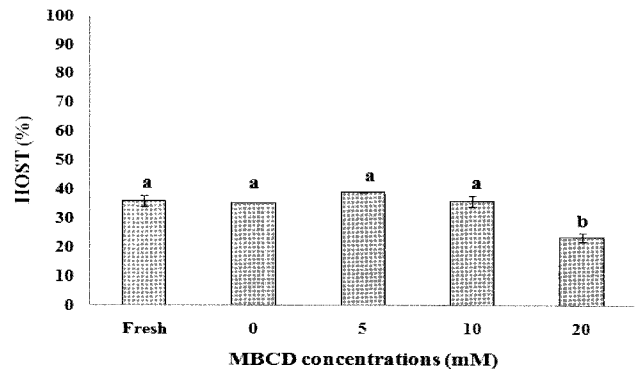


Fig. 4. Effect of different concentrations of methyl-beta-cyclodextrin(MBCD) on frozen-thawed sperm membrane integrity in bull. ^{a,b} Bar with different superscripts within the MBCD concentrations category differ significantly ($p < 0.05$).

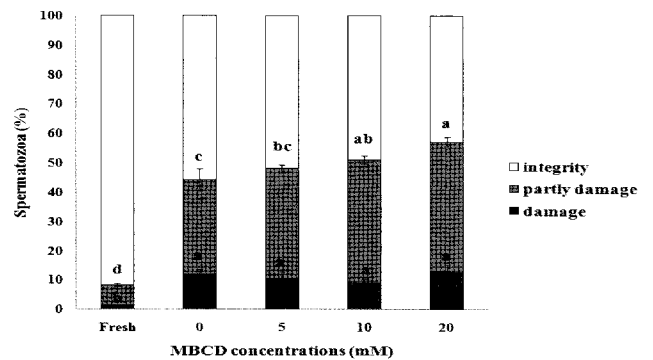


Fig. 5. Effect of different concentrations of methyl-beta-cyclodextrin(MBCD) on frozen-thawed sperm acrosome damage in bull. ^{a-d} Bar with different superscripts within the MBCD concentrations category differ significantly ($p < 0.05$).

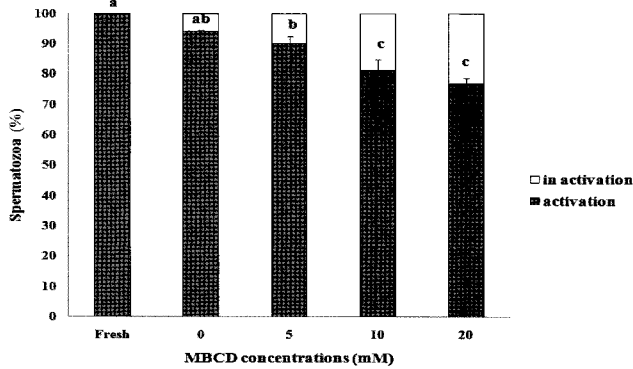


Fig. 6. Effect of different concentrations of methyl-beta-cyclodextrin(MBCD) on frozen-thawed sperm mitochondria activation rate in bull. ^{a-c} Bar with different superscripts within the MBCD concentrations category differ significantly ($p < 0.05$).

동결 보존액 내 MBCD의 농도별 처리 후 정자의 침체 손상 검사

MBCD의 농도별로 처리한 뒤 동결 용해한 정자를 FITC-PNA/PI로 형광 염색하여 flow cytometry를 통해 침체 손상율을 분석하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 침체의 부분적 손상은 20 mM의 MBCD에서 44.4%로 신선정액 및 0 mM과 20 mM의 MBCD에 비하여 유의적으로 높은 손상율을 보였다($p < 0.05$). 5 mM과 10 mM에서는 각각 37.7%와 42.3%의 부분적 손상율을 보였고, 0 mM에서는 32.4%의 부분적 손상율로 10 mM과 20 mM의 MBCD에 비해 유의적으로 낮은 손상율을 보였지만, 6.9%의 부분적 손상율을 보인 신선정액에 비해 높은 부분적 손상이 나타났다($p < 0.05$). 또한, 신선정액(1.4%)을 제외한 0 mM(11.9%), 5 mM(10.4%), 10 mM(8.9%) 및 20 mM(12.9%)의 처리군에서 유의적으로 높은 침체손상율이 나타났다($p < 0.05$).

정자의 미토콘드리아 기능을 검사

정자의 미토콘드리아 기능을 검사는 미토콘드리아막이 Rhodamin123에 의해 염색된 activation된 부분과 inactivation된 부분을 Fig. 6과 같이 나타내었다. 미토콘드리아의 activation은 신선정액에서 99.7%로 5 mM(90.1%), 10 mM(81.1%) 및 20 mM(76.7%)의 처리군에 비해 유의적으로 높은 결과를 나타내었고, 0 mM에서는 93.9%의 미토콘드리아 활성율이 나타났다($p < 0.05$). 또한, 10 mM과 20 mM에서는 각각 81.1%와 76.7%로 신선정액과 0 mM, 5 mM의 처리군에 비해 유의적으로 낮은 미토콘드리아 활성이 나타났다($p < 0.05$).

고 찰

본 연구는 소 정액의 동결 보존에 있어서 methyl-beta-cyclodextrin(MBCD)의 효과를 분석하기 위하여 수행되었다. 동결 보존액은 일정한 온도에서 세포의 반영구적인 보존, 정액과 초기배 수정란의 장기 보존, 체세포 이식

을 통한 수정란의 장기 보존 등에 이용되며, 생명공학 연구 분야에 많이 이용되어지고 있다. 이러한 정액의 동결 과정 중에서 세포내의 빙정 형성으로 인한 막 손상, 세포 내외의 삼투압 차이로 인한 영향으로 전해질 대사의 심각한 변화, 정자 막의 손상으로 인한 침체반응 유발 등이 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 있다. 소의 동결 보존액으로 주로 이용되는 egg-yolk 내에 있는 인지질과 콜레스테롤, 저밀도 지단백질이 저온 충격으로부터 정자를 보호하는 것이라고 여겨지고 있다. 여기에 세포막으로부터 cholesterol 방출을 촉진한다고 알려진 methyl-beta-cyclodextrin(MBCD)를 이용(Viscont 등, 1999)하여 egg-yolk가 포함된 동결 보존액에 반응시켜 주면 MBCD가 egg-yolk 내의 LDL 및 콜레스테롤과 반응하여 동결 보존액 내에 콜레스테롤 양을 증가시켜 동결 과정 중 저온 충격과 막 손상으로부터 정자를 보호할 것이라고 판단하여 실험을 실행하였다. Egg-yolk가 포함된 동결 보존액에 MBCD를 처리하여 동결 보존액 내에서 CLC를 만들어 주게 되면 동결 용해 후 정자의 생존성에 도움을 줄 것이라고 판단하였다. 그 결과, MBCD를 처리한 정자의 생존율은 대조군과 비교하였을 때 유의적으로 좋은 결과를 나타내지 않았다. 오히려 MBCD의 농도가 20 mM로 올라갈수록 정자의 생존율이 유의적으로 낮아지는 경향을 보였다. 소(Purdy and Graham, 2004)와 말(Moore 등, 2005)에 있어서 CLC의 과다 처리를 했을 때 오히려 생존율과 침체 손상을 유발했다. 따라서 MBCD의 농도가 올라갈수록 egg-yolk내 LDL 및 콜레스테롤과 결합하는 MBCD의 양을 많아져서 다량의 CLC가 형성되어 생존율이 떨어진 것으로 여겨진다. 또한, MBCD가 정자의 막과 반응하여 정자의 막내 콜레스테롤을 방출하게 되어 오히려 생존율을 저하시킨 것이라 여겨진다. 이는 정자 원형질막 검사에도 영향을 미친 것으로 보여진다. 다른 처리군에서는 유의적인 차이가 없었지만 20 mM의 MBCD가 처리된 동결 정액에서 다른 처리군에 비해 유의적으로 낮은 원형질막 기능율이 나타났다. 수정능 획득과 침체 반응은 정자 난자의 수정에 있어 중요한 기능을 하며, 수정 능력을 획득하는 동안 정자는 세포막 특성 변화, 효소 활성화 및 운동성의 증가로 난자의 침투 능력을 활발히 하고, 난자로 침투하기 위한 침체반응을 야기시키는 작용을 한다. 정액의 동결 보존은 세포막이 변성되어 침체에 이상을 유발시켜 용해 후 생존율과 수정율이 감소하게 된다(Neild 등, 2003). 침체 손상율에 사용한 fluorescein isothiocyanate- PNA (FITC-PNA)는 침체가 손상이 되었을 경우, 침체내막에 형광염색이 되는 원리를 이용하였다. Flow cytometry를 이용하여 정자의 침체내막에 형광 세기를 분석하여 Fig. 1과 같이 막이 온전한 정자와 부분적 손상이 일어난 부분 그리고 전체적인 침체 손상이 일어난 부분을 나타냈다. 콜레스테롤을 세포막 내로 첨가시켜 주는 것으로 알려진 CLC를 토끼정자에 처리하였을 때 침체 반응을 억제한다는 보고(Melih Aksoy 등, 2010)에 따라 egg-yolk와 MBCD의 결합에 의해 정액 보존액 내 CLC가 증가되어 정자의 침체 손상을 막아줄 것이라고 판단하였다. 하

지만 Fig. 5와 같이 MBCD의 농도가 높아질수록 첨체의 부분적 손상과 완전 손상이 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 정액에 MBCD를 첨가하여 보존 후 지질 분석을 하였을 때 정자의 세포막을 파괴하여 콜레스테롤이 추출되는 결과를 보였다(Chiu 등, 2005). 이는 정액 보존시 원형질막과 첨체막내 콜레스테롤량의 손실되었을 때 정자의 첨체에 악영향을 미친 것으로 생각된다. MBCD의 농도가 높아짐에 따라 egg-yolk가 아닌 정자의 세포막내 콜레스테롤을 방출시켜 첨체 손상을 촉진시킨 것으로 보여진다. 미토콘드리아의 기능을 검사에 이용한 Rhodamin123은 미토콘드리아 내막에 염색이 되며, 미토콘드리아막이 손상되지 않은 정자는 형광이 막외로 빠져나오지 못하여 형광을 띄고 미토콘드리아막이 손상된 정자는 형광이 빠져나와 형광을 띄지 않게 된다. 미토콘드리아의 활성을 또한 MBCD의 농도가 높아짐에 따라 미토콘드리아막의 손상이 유도되어 미토콘드리아 기능이 유의적으로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 소 정액 동결액내 MBCD를 5 mM, 10 mM 첨가했을 때 유의적인 차이가 없었지만, 20 mM의 MBCD를 첨가하였을 때 오히려 생존율이 유의적으로 낮아졌다. 또한, MBCD의 농도가 높아질수록 정자 원형질막의 손상과 첨체의 손상 그리고 미토콘드리아막의 손상이 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 점을 종합해 볼 때 동결 보존액 내의 egg-yolk에 MBCD의 처리는 egg-yolk 내의 콜레스테롤을 유출시켜 동결 보존액에 CLC 역할을 해주게 되어 동결에 있어서 좋은 역할을 할 것이라고 보았지만, CLC만큼의 동결 효율을 보여주지 않았다. 앞으로의 소 정액 동결에서 MBCD를 이용한 CLC 영향은 기대하기 힘들 것이라 보여진다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어서 소 정액의 동결 보존 시 강원대학교 동물자원공동연구소의 기술적 지원에 감사드립니다.

인용문헌

1. Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Soderquist L, Mapletoft R, Rodriguez-Martinez H(1999): Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int J Androl* 22:366-373.
2. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
3. Curry MR (2000): Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 5:46-52.
4. Holt, WV (2000): Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53:47-58.
5. Watson PF (1981): The effects of cold shock on sperm cell membranes. Pages 189-218 in *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. G. J. Morris and A. Clarke, ed. Academic Press, London, UK.
6. Parks JE, Lynch DV (1992): Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255-266.
7. White IG (1993): Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5 639-658.
8. Yeagle PL (1985): Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 822:267-287.
9. 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.
10. 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.
11. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997): Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38:2264-2272.
12. Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 274:3235-3242.
13. Navratil AM, Bliss SP, Berghorn KA, Haughian JM, Farmerie TA, Graham JK, Clay CM, Roberson MS (2003): Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J Biol Chem* 278:31593-31602.
14. 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.
15. Pike LJ, Miller JM (1998): Cholesterol depletion de-localizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 273:22298-22304.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgue CJ, Alvarez JG, Kopf GS (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm beta-cyclodextrins initiate transmembrans signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 274:3235-42.
 22. Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL (2000): Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl* 56:127-132.
 23. Moore AI, Squires EL, Graham JK (2005): Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51:241-249.
 24. Purdy PH, Graham JK (2004): Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48:36-45.
 25. Morrier A, Thériault M, Castonguay F, Bailey JL (2004): Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. Page 239 (abstract 636) in *Proc. Soc. Study of Reproduction Mtg.*, Vancouver, BC, Canada. *Biology of Reproduction*, Madison, WI.
 26. Neild DM, Gadella BM, Maria GC, Marcelo H, Miragaya C, Colenbrander B, Aguero A (2003): Membrans changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59:1693-1705.
 27. Chiu PC, Chung MK, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF and Yeung WS (2005): Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *J Biol Chem* 280:25580-25589.
- (접수일자: 2011. 8. 29 / 채택일자: 2011. 9. 5)