

Estrogenic Xenobiotics가 돼지 정자의 운동성 및 운동역학에 미치는 영향

오신애¹ · 박유진¹ · 송원희¹ · El-Sayed A. Mohamed¹ · 방명걸^{1,2,*}

¹중앙대학교 생명자원공학부 동물생명공학전공, ²중앙대학교 생명환경연구원

Effect of Estrogenic Xenobiotics on Boar Sperm Motility and Motion Kinematics

Shin-Ae Oh¹, Yoo-Jin Park¹, Won-Hee Song¹, El-Sayed A. Mohamed¹ and Myung-Geol Pang^{1,2,*}

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

²BET Research Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

ABSTRACT

Endocrine disruptors bind to hormone receptors on sperm membrane, therefore spermatozoa are potentially a useful model for examining estrogenic activities of endocrine disruptors. The objective of this study was to compare the effects of two xenoestrogenic compounds [genistein (Gen) and 4-tert-octylphenol (OP)] to those of two steroids [estrogen (E₂) and progesterone (P₄)] on boar sperm % motility and motion kinematics of *in vitro*. Porcine spermatozoa were incubated with various concentrations (0.001~100 μM) of each chemical for 15 or 30 min, and then assessed % motility and sperm motion kinematics using computer assisted sperm analyzer (CASA). Each chemical decreased sperm % motility, and OP decreased VSL and VAP compared with untreated control ($p < 0.05$). E₂ stimulated the motion kinematic changes except VCL. Moreover, Gen had effects on VCL and VAP alterations after 30 min incubation. In summary, since all chemicals studied effectively altered sperm % motility and motion kinematics, it was concluded that porcine spermatozoa could be a useful model for *in vitro* screening of potential endocrine disruptors.

(Key words : Boar spermatozoa, Endocrine disruptors, Xenobiotics, Motility, Motion kinematics)

서론

환경호르몬(내분비 교란 물질; Endocrine disruptor; ED)은 내분비 호르몬의 작용을 교란하는 물질로 인간 및 동물의 생식기관에 영향을 주는 것으로 알려져 왔다. 이러한 환경호르몬들은 콩과 식물, 농약, 살충제 및 공산품 등에 포함되어 있다. 이들은 생체에서 estrogen receptor (ER)와 결합하여 estrogen과 유사작용을 한다(Sohoni와 Sumpter, 1998; Akingbemi와 Hardy, 2001; Luconi 등, 2001). 또한, 여성생식기관에 작용하여 정자 농도를 감소시킬 뿐만 아니라 oxidative DNA damage를 야기하여 번식장애를 일으킨다(Sharpe, 2001; Skakkebaek 등, 2001; Watson 등, 1999). 최근 Adeoya-Osiguwa 등(2003)은 매우 적은 양의 내분비 estrogen과 외인성 estrogen 유사 물질에 의해 생쥐 정자의 수정능 획득과 철체 반응이 야기된다고 보고하였다. 뿐만 아니라, 이러한 화합물들은 정자 막에 존재하는 수용체와 결합하여 작용하거나 정자 세포 내로 유입되어 세포 내 수용체와 결합하는 것으로

알려져 있다. 이러한 ER은 쥐(Saberwal 등, 2002), 돼지(Rago 등, 2007) 및 사람(Misao 등, 1997; Durkee 등, 1998)의 정자에 존재함이 규명됨으로 이를 통하여 ED가 정자 기능에 어떠한 영향을 미칠 것인지에 대한 관심이 흥미롭다.

따라서, 본 연구에서는 정자의 기능에 영향을 미치는 xenobiotics의 효과를 검사하는 *in vitro* test system을 구축하기 위하여, 17β-Estradiol(E₂), Progesterone(P₄), phytoestrogenic compounds로 알려진 Genistein(Gen)와 화학적 ED인 4-tert-octylphenol(OP)를 처리한 후 xenobiotics가 돼지 정자의 운동성 및 운동역학에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

배양액 및 시약조성

본 연구에서 돼지 정자의 처리를 위하여 TCM-199(wi-

* 이 논문은 중앙대학교 2008년도 (신진우수연구자/박사후연수과정)지원사업에 의한 것임.

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

th Earle's salts)를 사용하였으며, 10% heat-inactivated fetal calf serum(v/v), 0.91 mM sodium pyruvate, 3.05 mM D-glucose, 2.92 mM calcium lactate, 50 IU/l penicillin G 및 30 µg/ml streptomycin sulphate를 이용하여 배양액을 제조하였다. E₂와 P₄(Sigma Chemical Co., ST. Louis, MO, USA)는 dimethyl sulphoxide(DMSO)를 이용하여 용해한 다음 -20°C에서 보관하였으며, Gen과 OP Sigma Chemical Co., ST. Louis, MO, USA)는 absolute alcohol을 이용하여 용해한 후 -20°C에 보관하였다.

정액처리

공시 종모돈은 (주)연암 육종에서 공급을 받았으며, 개체 특이성을 제거하기 위하여 서로 다른 3종의 정액을 섞어서 사용하였다. 혼합된 액상정액을 500 ×g에서 3분간 원심분리하여 정자괴를 획득하였다. TCM 199을 이용하여 500 ×g, 3분간 원심분리하여 세척하였고, 원심분리 후 획득된 정자괴는 xenobiotics의 처리 농도에 따라 배양액을 처리하고 39°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 15분 또는 30분간 배양하였다.

정자 운동성 및 운동역학 검사

정자의 운동성 및 운동역학 검사를 측정하기 위하여 computer assisted sperm analysis(CASA) system (SAIS plus version 10.1, Medical Supply, Seoul, Korea)을 이용하였다. 10 µl의 정액 샘플(2×10⁶ cells/ml)을 미리 39°C로 가온된 Makler counting chamber (Sefi-Medical, Haifa, Israel) 위에 올린 다음 CASA를 이용하여 정자의 운동성과 운동역학을 측정하였다. 각 샘플당 5개 필드를 선택하여 최소 250개 이상의 정자 움직임을 측정하였으며, 프로그램은 다음과 같이 설정하였다: Frames acquired, 20; frame rate, 30 Hz; minimum contrast, 7; minimum size, 5; low/high size gates, 0.4~1.5; low/high intensity gates, 0.4~1.5; non-motile head size, 16; non-motile brightness, 14. 또한, % motility, curvilinear velocity(VCL), average path velocity(VAP), linearity of the curvilinear trajectory(LIN) 및 amplitude of lateral head displacement(ALH)를 측정하여 정자의 운동성 및 운동역학을 확인하였다. CASA에 이용된 모든 이미지는 200배 위상차 현미경을 이용하여 획득하여 사용하였다.

통계분석

모든 데이터는 SPSS(v. 12.0; Chicago, Illinois, USA) program을 이용하여 일원배치 분산 분석법 (ANOVA)을 통하여 유의적 차이를 검증하였다. p<0.05일 때 유의차를 인정하였다.

결 과

Fig. 1은 E₂의 처리는 정자의 운동성(%)을 유의적으로 감소시키는 결과를 보였다 (p<0.05). 15분 배양 결과 E₂의 처리 자체가 정자의 운동성을 감소시켰지만 처리구 간의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 30분 배양 시, E₂의 처리가 정자의 운동성을 감소시켰으며, E₂의 처리 농도가

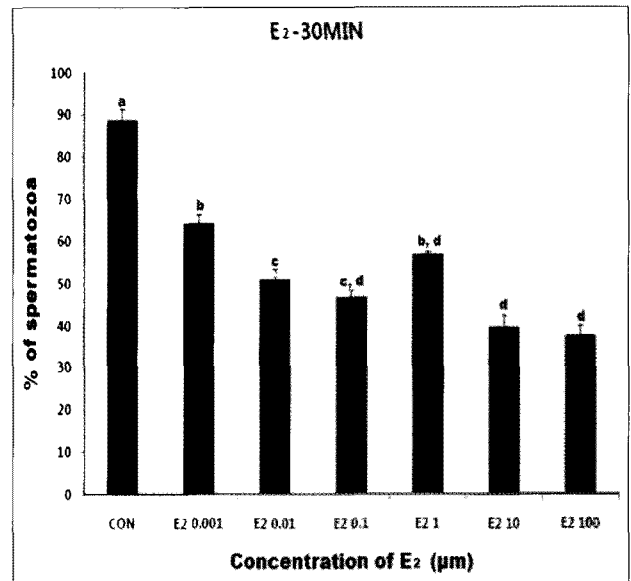
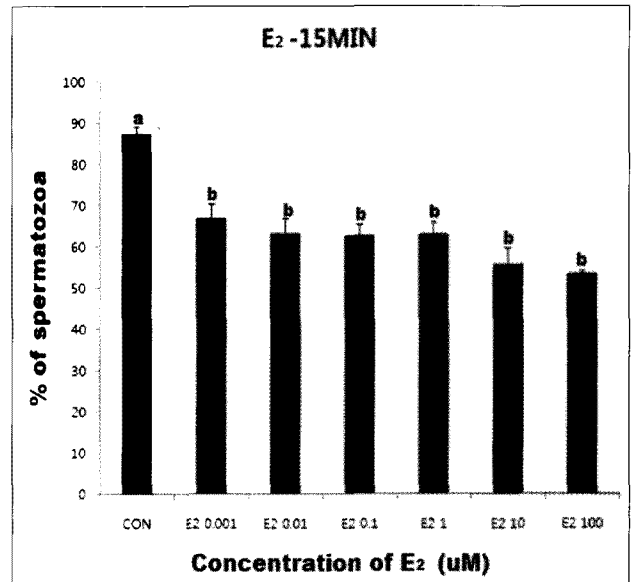


Fig. 1. Effect of estrogen (E₂) treatment on % of sperm displaying the motility in boar spermatozoa. ^{a-d} Values with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA (p<0.05).

높을수록 유의적으로 운동성이 저하됨을 볼 수 있었다 (p<0.05).

Fig. 2는 정자에 P₄를 처리하여 15분 및 30분간 배양한 후 정자의 운동성을 분석한 결과이다. P₄의 처리시 15분과 30분 배양 모두 처리 농도가 높아짐에 따라 정자 운동성(%)이 유의적으로 감소했다. 30분 배양시 15분 배양시보다 급격하게 운동성을 저하시켰다(p<0.05).

GEN의 처리 역시 정자의 운동성(%)을 감소시켰다(Fig. 3). 15분과 30분 배양 모두 GEN의 처리 자체가 대조구에 비하여 유의적인 운동성 감소를 나타냈으나(p<0.05), 처리구 간의 유의적 차이는 볼 수 없었다.

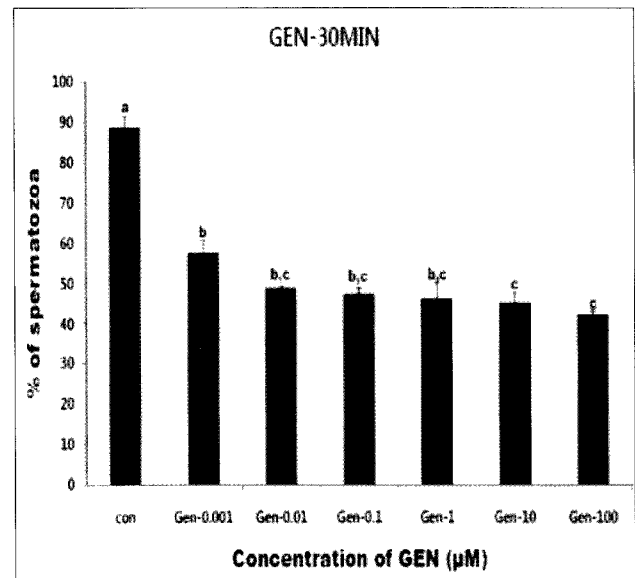
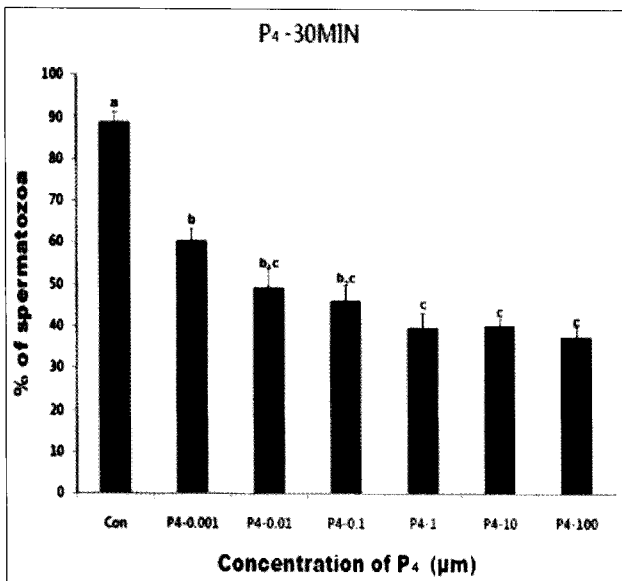
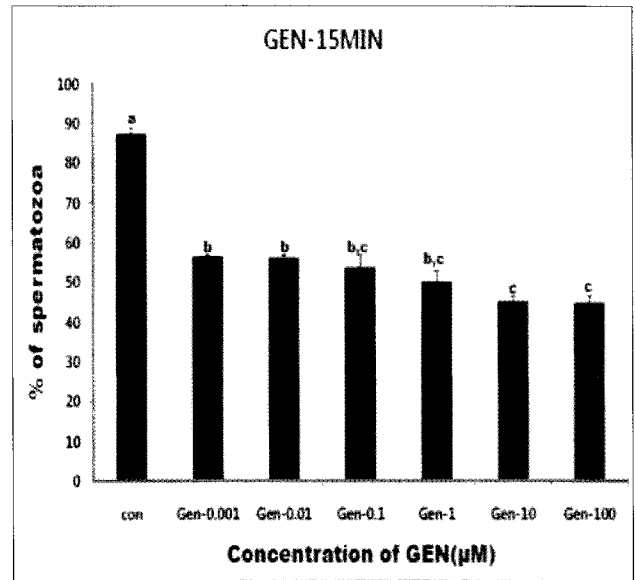
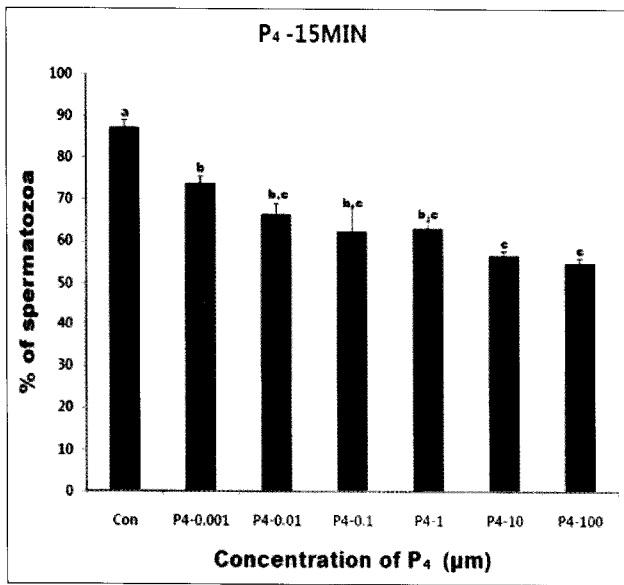


Fig. 2. Effect of progesterone (P₄) treatment on % of sperm displaying the motility in boar spermatozoa. ^{a-c} Values with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA (*p*<0.05).

Fig. 3. Effect of genestein (GEN) treatment on % of sperm displaying the motility in boar spermatozoa. ^{a-c} Values with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA (*p*<0.05).

OP 처리 역시 정자의 운동성의 유의적 감소를 나타냈다(Fig. 4). 15분 배양과 30분 배양 모두에서 대조구에 비하여 처리구에서 유의적인 운동성 감소를 나타냈으나(*p*<0.05), 처리구 간의 유의적 차이는 15분 배양보다 30분 배양에서 더 큰 차이를 나타냈다.

Fig. 5는 정자에 E₂를 처리한 후 정자의 운동역학 변화를 살펴본 결과이다. 15분간 E₂에 노출시켰을 때 0.001 µM 농도에서 VCL의 급격한 증가가 시작하였으며, 30분간 노출시킨 경우 역시 0.001 µM 농도에서 VCL의 증가를 나타내었으나, 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 15분간 배양한 경우 VAP와 LIN가 E₂의 첨가 수준에 따라 유의적으로 감소하였으며(*p*<0.05), 30분 배양 시 VSL

이 E₂의 농도에 따라 대조구와 비교시 유의적으로 감소하고 있음을 볼 수 있었다(*p*<0.05).

P₄ 역시 정자의 15분 배양과 30분 배양 모두에서 대조구와 비교시 VCL의 증가를 나타냈으나, 유의적 차이를 볼 수는 없었다(Fig. 6). 그러나 30분 배양 시 VAP가 대조구에 비하여 100 µM 농도에서 유의적인 감소를 나타냈다(*p*<0.05).

Fig. 7은 GEN의 처리가 정자의 운동역학에 미치는 영향을 분석한 결과이다. GEN의 처리는 15분 배양구에서 VCL의 수준이 대조구에 비하여 다소 증가되었으나, 유의적 차이는 나타나지 않았으며, VSL, VAP 및 LIN도 대조구에 비하여 감소되는 경향을 나타냈으나, 유의적 차이는 볼 수 없었다. 30분 배양 시 전반적인 VCL의 변화는 없

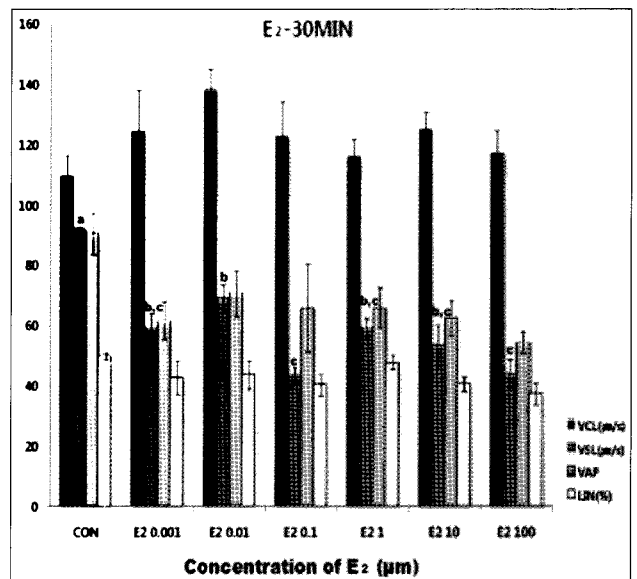
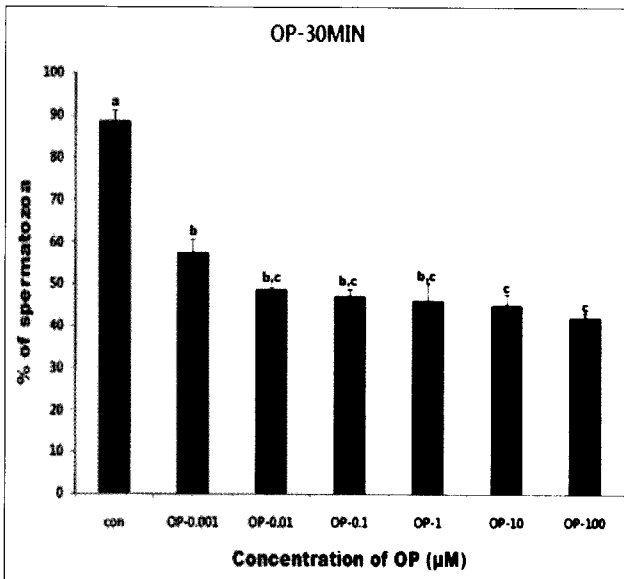
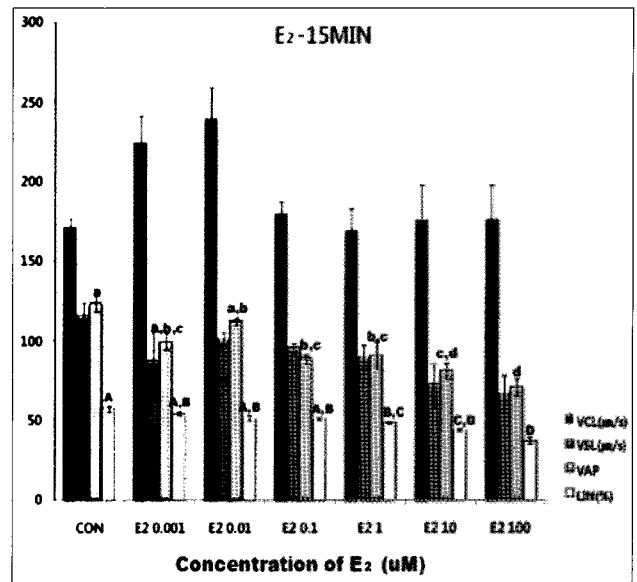
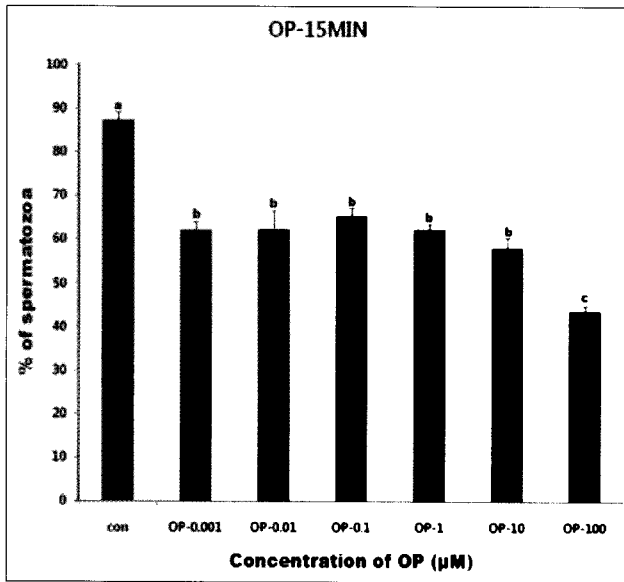


Fig. 4. Effect of 4-tert-octylphenol (OP) treatment on % of sperm displaying the motility in boar spermatozoa. ^{a-c} Values with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$).

였으나 100 μM 농도에서 유의적 감소를 나타냈으며, VAP에 대하여도 처리 농도에 따라 유의적 감소를 나타냈다($p < 0.05$).

OP 역시 정자의 VCL을 증가시키는 결과를 나타내고 있으며(Fig. 8), 15분 배양 시 0.1 μM 농도에서 VCL의 유의적 증가를 나타내었으며, 100 μM 농도에서 급격히 감소하였다. VSL과 VAP 항목에 있어서도 역시 대조구에 비하여 100 μM 농도에서 유의적인 감소를 나타내었다 ($p < 0.05$). 30분 배양 시, 0.001 μM 농도에서 VCL이 유의적으로 증가하였으나, 농도가 높아짐에 따라 감소하는 결과를 보였다. VAP는 처리 농도에 따라 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다($p < 0.05$).

Fig. 5. The average of sperm displaying the motion kinematics patterns of estradiol (E₂) treatment on boar spermatozoa. ^{a-d} Values in VAP of E₂-15 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$). ^{A-D} Values in VSL of E₂-15 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$). ^{a-c} Values in VSL of E₂-30 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$).

고찰

본 연구는 estrogen과 estrogenic xenobiotics가 돼지 정자 기능에 미치는 영향 중 정자의 운동성 및 운동역학에

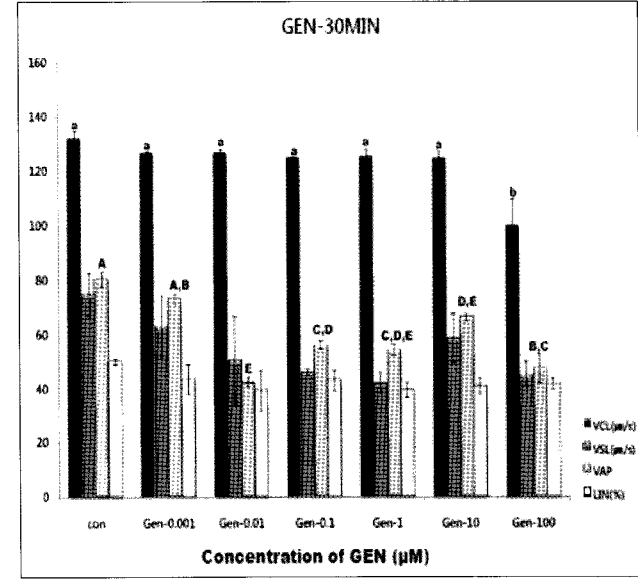
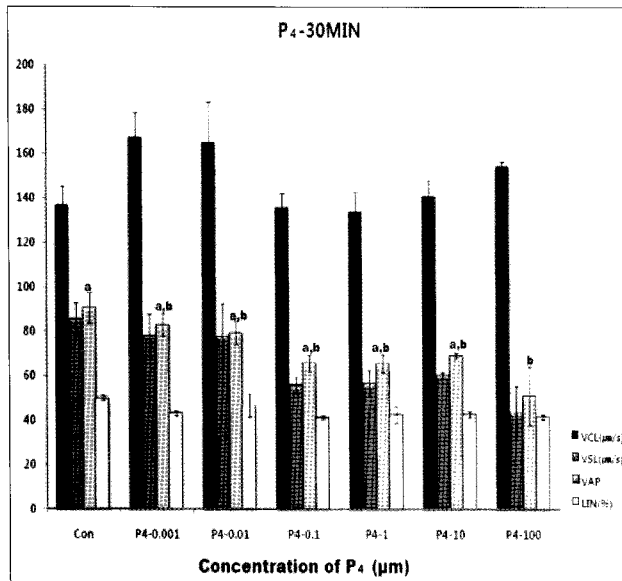
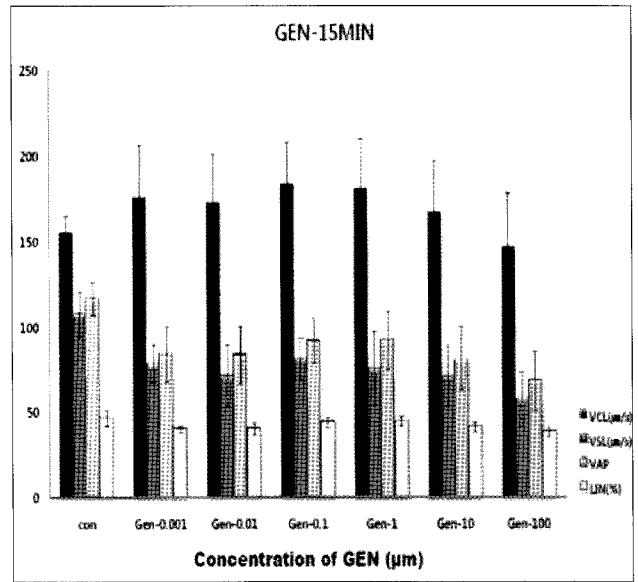
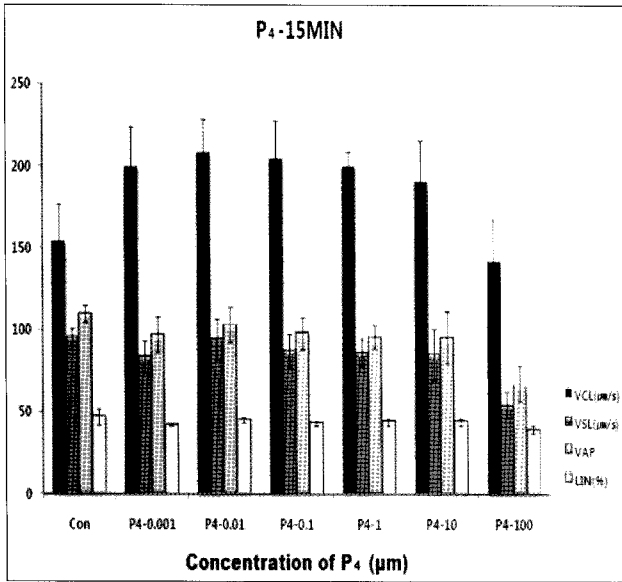


Fig. 6. The average of sperm displaying the motion kinematics patterns of progesterone (P₄) treatment on boar spermatozoa. ^{a,b} Values in VAP of P₄-30 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA (*p*<0.05).

Fig. 7. The average of sperm displaying the motion kinematics patterns of genestein (GEN) treatment on boar spermatozoa. ^{a,b} Values in VCL of GEN-30 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA (*p*<0.05). ^{A-E} Values in VAP of GEN-30 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA (*p*<0.05).

있어 어떠한 영향을 미치는가에 대해 연구하고자 수행하였다. 정자 운동성, 정자의 수정능 획득, 침체 반응 그리고 투명대와의 결합은 수정과정을 진행하는 데 있어 중요한 요인들이다(Yanagimachi 등, 1994). 이들 일련의 과정 중 한 가지 요인이더라도 결합이 있을 경우 정상적인 수정이 저하될 수 있다.

Estrogens은 steroid compound의 하나로 발정 주기에 있어 중요한 역할을 한다. 비록 estrogen이 자성 생식 호르몬일지라도 estrogen은 여성 생식기 내에 존재하며, 중요한 여러 기능을 조절하고 있다. 흥미롭게도 E₂는 마우스

정자의 수정능 획득 및 침체 반응에 dose-dependent한 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Adeoya-Osiguwa 등, 2003). 뿐만 아니라, 돼지 정자에서도 E₂는 수정능 획득을 유의적으로 증가시켰다(Ded 등, 2010). 본 연구에서 E₂에 노출 시간이 길어질수록 정자의 운동성이 감소하였으며, VCL의 증가 그리고 VAP 및 VSL의 감소와 같은 운동역학에도 큰 영향을 미치는 것을 볼 수 있었다. 이는 E₂가 정자의 수정능 획득 및 침체 반응을 유도하여 정자의 수정 능력 향상에 도움을 주는 것을 알 수 있다. 다양한

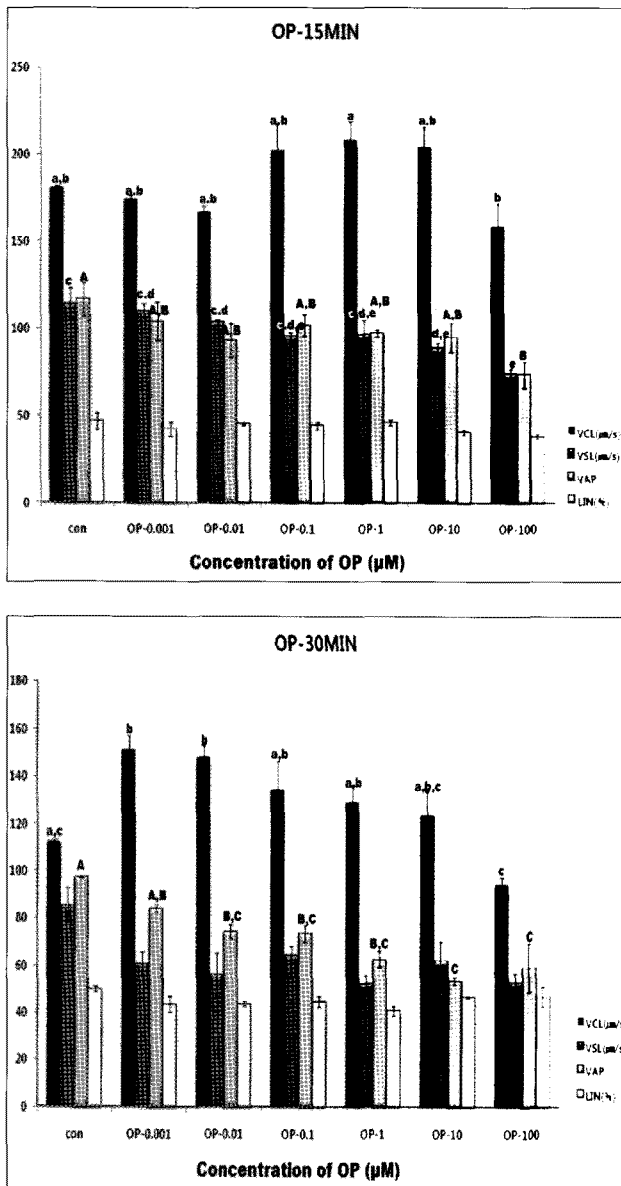


Fig. 8. The average of sperm displaying the motion kinematics patterns of 4-tert-octylphenol (OP) treatment on boar spermatozoa. ^{a,b} Values in VCL of OP-15 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$). ^{c~e} Values in VSL of OP-15 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$). ^{A,B} Values in VAP of OP-15 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$). ^{a~c} Values in VCL of OP-30 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$). ^{A~C} Values in VAP of OP-30 min with different superscripts were significantly different compared to control and treatment in motility pattern by ANOVA ($p < 0.05$).

중의 체세포에 있어 E₂는 Ca²⁺의 유입을 조절하고, cyclic nucleotide를 생성하며, 다양한 kinase를 활성화시키므로

ion channel을 조절하는 것으로 알려져 있다(Tubbs와 Thomas, 2009). cAMP는 정자의 생리 기능을 조절하여 cAMP의 증가로 인하여 수정능 획득을 야기시킨다. 게다가 cAMP 생산의 지속적 자극은 첨체 반응과 유의적인 관련이 있다(Adeoya-Osiguwa 등, 2003). 이러한 일련의 설명은 E₂가 정자의 생리적 변화를 가져옴으로 정자의 운동성 및 운동역학에도 영향을 주는 것을 설명할 수 있다.

P₄는 Ca²⁺과는 다른 방법으로 첨체 반응을 유도하는 것으로 알려졌다 (Kim 등, 2008). P₄는 신속하게 포유류 정자의 hyperactive motility를 유도하는 것으로 알려져 있다(Uhler 등, 1992; Luconi 등, 2004; Tubbs와 Thomas, 2008). Tubbs와 Thomas(2009)는 Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)가 olfactory G protein의 활성화와 관련되어 progestin이 정자의 hypermotility를 자극한다고 보고한 바 있다. 또한, progesterone은 자성생식기도 안에서 정자 막 표면과 직접적으로 결합을 한다. 대부분의 종에서 자성생식기도 안의 적정 P₄ 농도에 대하여는 여전히 연구 과제로 남아 있다(Saaranen 등, 1993; Libersky와 Boatman, 1995). 다양한 동물의 정자는 자성 생식기도 안에서 P₄에 반응하여 정자의 hypermotility와 첨체 반응 유도가 함께 야기된다(Neild 등, 2005; Tubbs와 Thomas, 2009). 세포내 P₄의 유입은 protein kinase C와 Ca²⁺ channel에 의존하는 세포 내 기작을 유도하며, 이로 인해 P₄는 hypermotility를 유도할 수 있게 된다 (Witte 등, 2007). 개 정자는 정자 표면에 P₄의 수용체가 노출되어 있으며, 이것은 정자의 성숙 상태와 관련이 있으며(Sirivaidyapong 등, 2001), 말 정자는 노출된 P₄ 수용체의 비율이 수정 능력과 밀접한 관련이 보고된 바 있다(Rathi 등, 2003). 본 연구에서 P₄의 처리 역시 정자의 운동성을 감소시켰다. 또한, VCL의 증가, VSL 및 VAP의 감소 등 정자의 운동역학에 영향을 주어 정자 운동성 패턴을 변화시킨 것으로 사료된다. E₂는 estrogen receptor-alpha (ERs) 그리고 ER-beta와 결합하여 활성화된다(Sirianni 등, 2008). 몇몇 연구에서 사람(Misao 등, 1997; Durkee 등, 1998)과 쥐(Saberwal 등, 2002)의 ER의 존재를 확인한 바 있다. GEN은 estrogenic compound로서 phytoestrogens의 하나이다. 고농도의 phytoestrogens은 정자의 수정 능력에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Dixon, 2004). 흥미롭게도 phytoestrogens이 여성 수정 능력을 증진시킨다는 사실이 최근에 밝혀져 estrogen이 여성 생식계에 대한 중요성이 보고된 바 있다(Rochira 등, 2005). Phytoestrogens는 estrogen receptor와 결합하는 물질로 식물계에 널리 존재하고 있으며, 식물성 섭취물로서 쉽게 섭취가 가능한 물질이다. GEN은 estrogen의 활성을 보이는 isoflavonoid로 phosphorylate tyrosin residues가 수용체와 결합함으로써 signal transduction을 수반하고 protein tyrosine kinase를 억제시키는 역할을 수행한다(Dixon, 2004). 즉, GEN과 다른 estrogenic 혼합물들은 두 형태의 ER, 즉 ERs-alpha 및 ERs-beta와 결합할 수 있다(Kuiper 등, 1998; Milligan 등, 1999, Milligan 등, 2000). Mohamed 등(2010)은 정자에 GEN을 다양한 농도로 처리 시(0~100 µM) estrogen과 수정능 획득에 유사한 작용을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서, GEN을 돼지 정자에 처리하였을 때 15분과 30분 배양 모두에서 GEN의 처리가 급격한 정자의 운동성 감소를 가져왔으나, 15분 배양 시 유의적 차

이는 볼 수 없었다. 그러나 VCL의 증가 및 VSL 그리고 VAP의 감소 등 운동역학을 변화시키는데 큰 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

마지막으로 OP는 환경속의 ubiquitous chemical로 알려져 있으며, alkylphenol 물질로 alkylphenol ethoxylates의 중간생산물이다. OP는 toxic estrogen으로 알려져 있다. 그러나 OP는 체외에서 estrogen 17 β -estradiol(E₂)의 약 1/1,000에 해당하는 estrogenicity를 가진 물질로 보고되어 있다(White 등, 1994; Aydogan 등, 2006). OP는 포유류에서 estrogen 수용체와 결합하여 E₂와 유사한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Aydogan 등, 2006). 본 연구에서 OP를 정자에 처리하였을 때, 15분과 30분 배양 시 처리 농도에 따른 차이는 있었다. E₂와 마찬가지로 정자의 운동성을 감소시키고, VCL을 증가시키고 VSL과 VAP가 감소되는 등 E₂와 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 estrogenicity가 비록 E₂보다 낮고 ERs와의 결합에 있어 E₂보다 낮은 친화력을 가졌으나, 정자의 운동성 및 운동역학에 충분한 영향을 끼치고 있는 것으로 생각된다. Luconi 등(1999)은 OP는 사람의 정자에 있어 어떠한 효과도 나타내지 않았다고 보고하였으나, 본 연구의 결과 OP는 정자의 운동성 및 운동역학에 있어 estrogenic 효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

본 연구는 estrogen과 estrogenic xenobiotics가 돼지 정자 기능에 미치는 영향 중 정자의 운동성 및 운동역학에 있어 어떠한 영향을 미치는가에 대해 연구하고자 수행하였다. Es, P₄, GEN 그리고 OP의 네 가지 estrogenic xenobiotics는 정자의 운동성을 감소시키며, VCL, VSL, VAP 및 LIN 등과 같은 운동역학에 영향을 미치는 것으로 확인하였다. 이를 이용하여 체외에서 환경호르몬의 존재를 nano 수준에서 screen 가능한 도구를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

- Adeoya-Osiguwa SA, Markoulaki S, Pocock V, Milligan SR, Fraser LR (2003): 17 β -estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum Reprod* 18:100-107.
- Akingbemi BT, Hardy MP (2001): Oestrogenic and antiandrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health. *Ann Med* 33:391-403.
- Aydogan M, Barlas N (2006): Effect of maternal 4-tert-octylphenol exposure on the reproductive tract of male rats and adulthood. *Reprod Toxicology* 22:455-460.
- Couse JF, Korach KS (1999): Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358-417.
- Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J (2010): Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol* 13:87-97.
- Dixon RA (2004): Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol.* 55:225-261.
- Durkee TJ, Mueller M, Zinaman M (1998): Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am J Obstet Gynecol.* 178:1288-1297.
- Durkee TJ, Mueller M, Zinaman M (1998): Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am J Obstet Gynecol* 178:1288-1297.
- Fraser LR, Beyret E, Milligan SR, Adeoya-Osiguwa SA (2006): Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Hum Reprod* 21:1184-1193.
- Kim JC, Li Y, Lee S, Yi YJ, Park CS, Woo SH (2008): Effects of cryopreservation on Ca²⁺ signals induced by membrane depolarization, caffeine, thapsigargin and progesterone in boar spermatozoa. *Mol Cells* 26(6):558-565.
- Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1998): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.
- Libersky EA, Boatman DE (1995): Progesterone concentrations in serum, follicular fluid, and oviductal fluid of the golden hamster during periovulatory period. *Biol Reprod* 53:477-482.
- Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G, Baldi E (2001): Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. *Mol Cell Endocrinol* 178:39-45.
- Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G, Baldi E (2004): Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids* 69:553-559.
- Luconi M, Muratori M, Forti G, Baldi E (1999): Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1670-1678.
- Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, De Cooman L, De Keukeleire D (1999): Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2249-2252.
- Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van de Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, Rong H, De Keukeleire D (2000): The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4912-4915.
- Misao R, Niwa K, Morishita S, Fujimoto J, Nakaniishi Y, Tamaya T (1997): Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in spermatozoa of infertile men. *Int J Fertil* 42:421-425.
- Mohamed ES, Park YJ, Song WH, Shin DH, You YA, Ryu BY, Pang MG (2011): Xenoestrogenic com-

- pounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm. *Theriogenology* 75(6):1161-9.
20. Neild DN, Gadella BM, Aguero A, Stout TAE, Colenbrander B (2005): Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 89:47-56.
 21. Rago V, Aquila S, Panza R, Carpino A (2007): Cytochrome P₄₅₀arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:23-28.
 22. Rathi R, Colenbrander B, Stout TAE, Bevers MM, Gadella BM (2003): Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Mol Reprod Dev* 64:120-128.
 23. Rochira V, Granata AR, Madeo B, Zirilli L, Rossi G, Carani C (2005): Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years. *Asian J Androl* 7:3-20.
 24. Saaranen MJ, Calvo L, Dennison L, Banks S, Bustin AD, Dorfmann M, Goldstein M, Thorsell L, Schulmann JD, Sherins RJ (1993): Acrosome reaction inducing activity in follicular fluids correlates with progesterone concentration but not with oocyte maturity or fertilizability. *Hum Reprod* 8:1448-1454.
 25. Saberwal GS, Sharma MK, Balasinor N, Choudhary J, Juneja HS (2002): Estrogen receptor, calcium mobilization and rat sperm motility. *Mol Cell Biochem* 237:11-20.
 26. Saberwal GS, Sharma MK, Balasinor N, Choudhary J, Juneja HS (2002): Estrogen receptor, calcium mobilization and rat sperm motility. *Mol Cell Biochem* 237:11-20.
 27. Sharpe RM (2001): Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett* 120:221-232.
 28. Sirianni R, Chimento A, Ruggiero C, De Luca A, Lappano R, Andò S, Maggiolini M, Pezzi V (2008): The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* 149:5043-51.
 29. Sirivaidyapong S, Bevers MM, Gadella BM, Colenbrander B (2001): Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved. *Mol Reprod Dev* 58:451-459.
 30. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001): Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16:972-978.
 31. Sohoni P, Sumpster JP (1998): Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158:327-339.
 32. Stormshak F, Bishop CV (2008): Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. *J Anim Sci* 86:299-315.
 33. Tubbs C, Thomas P (2008): Functional characteristics of membrane progesterin receptor (mPR) subtypes: a review with new data showing mPR expression in seatrout sperm and its association with sperm motility. *Steroids* 73:935-941.
 34. Tubbs C, Thomas P (2009): Progesterin signaling through an olfactory G protein and membrane progesterin receptor-alpha in Atlantic croaker sperm: potential role in induction of sperm hypermotility. *Endocrinology*. 150:473-484.
 35. Uhler ML, Leung A, Chan SYW, Wang C (1992): Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril* 58:1191-1198.
 36. Watson CE, Gauthier SY, Davies PL (1999): Structure and expression of the highly repetitive histone H1-related sperm chromatin proteins from winter flounder. *J Bio Chem* 262:258-267.
 37. Watson CE, Gauthier SY, Davies PL (1999): Structure and expression of the highly repetitive histone H1-related sperm chromatin proteins from winter flounder. *J Bio Chem* 262:258-267.
 38. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. pp 189-317.
- (접수일자: 2011. 2. 21 / 채택일자: 2011. 2. 28)