

# 제주흑우 동결정액 제조에 있어 Low Density Lipoproteins (LDL)과 항산화제로서 Taurine, Hypotaurine 그리고 Trehalose 조합이 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향

오신애<sup>1</sup> · 고민희<sup>1</sup> · 강태영<sup>1</sup> · 최선호<sup>1</sup> · 고문석<sup>1</sup> · 오영미<sup>2</sup> · 조원모<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원, <sup>2</sup>국립제주대학교 수의과대학

## Effect of LDL in Combination with Taurine, Hypotaurine and Trehalose as a Antioxidant on Freezing Thawed Semen Function in Korean Jeju Black Bull

Shin-Ae Oh<sup>1</sup>, Min-Hee Ko<sup>1</sup>, Tae-Young Kang<sup>1</sup>, Sun-Ho Choi<sup>1</sup>, Moon-Suck Ko<sup>1</sup>, Young-Mi Oh<sup>2</sup> and Won-Mo Cho<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 691-150, Korea

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

### ABSTRACT

This study was designed to determine whether low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk and taurine, hypotaurine and trehalose as antioxidant in extender improve the freezability and fertility of Korean Jeju Black Bull semen. The semen was cryopreserved with tris egg yolk extenders containing 7% glycerol and treated 4% LDL, 20 mM taurine, hypotaurine and trehalose. Frozen-thawed sperm were evaluated motility, viability, membrane, and acrosome integrity and sperm penetration ability. The results were compared to semen cryopreserved in tris egg yolk extender only as control. Frozen-thawed semen evaluation clearly indicated that the addition of LDL and LDL-antioxidants (taurine, hypotaurine and trehalose) combination were significantly improved ( $p < 0.05$ ) the viability (%; with staining test using eosin-Y) compared to control spermatozoa. Also, in membrane integrity (%; with supravital hypo-osmotic swelling test), not only LDL-antioxidants combination but also LDL were significantly increased ( $p < 0.05$ ) the swelled sperm using HOST compared to control. Sperm acrosome integrity state was classified by CTC (chlortetracycline) staining test. F pattern was significantly increased in LDL-antioxidant combination than control ( $p < 0.05$ ) and B pattern was not significantly differences among all treatments and control. However, AR pattern was significantly decreased in LDL-antioxidants combination than control ( $p < 0.05$ ). Pronucleus formation and sperm penetration index (SFI) were significantly increased in LDL and LDL-antioxidants combination than control ( $p < 0.05$ ). Especially, LDL-taurine significantly improved pronucleus formation and SFI than LDL ( $p < 0.05$ ). It was concluded that LDL and LDL-antioxidants in extender improved the freezability and fertility of Korean Jeju Black bull spermatozoa.

(Key words : Low density lipoproteins (LDL), Antioxidant, Semen cryopreservation, Korean Jeju Black Bull)

### 서 론

인공수정은 유전자의 급속한 보급과 가축 유전자 품질을 향상시키기 위한 가장 주요한 방법이다 (Vishwanth와 Shannon, 2000). 인공수정을 위한 정액의 이용 방법에는 액상정액의 이용과 동결 정액으로 보존하는 방법이 있는

데, 채취한 정액을 동결하여  $-196^{\circ}\text{C}$ 에서 보존하면 반영구적으로 보관이 가능하다 (Bolten 등, 2005). 그러나 정자를 포함하여 많은 세포들은 동결후 생존율은 액체질소에 침지하기 전의 냉각온도와 동결속도 그리고 동결 방법에 따라서 생존율과 활력에 영향을 미친다 (Leibo와 Bradly, 1999). 정자는 다양한 동결 조건에 따라 약 50% 정도의 세포 손상을 입게 되며 (Watson, 2000), 이러한 세포 손

\* 본 연구는 2012년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-64-754-5716, E-mail: cwmo3451@rda.go.kr

상은 동결 과정 동안에 세포질 내의 빙상 결정화에 의해 기인하는 것으로 (Mazur, 1984), 이러한 손상을 방지하기 위한 희석제의 조성은 성공적인 동결정액 제조에 있어 가장 중요한 요인이라고 할 수 있다 (Hammerstedt 등, 1990; Curry 등, 1990). 동결 방법에 있어 다양한 희석제가 사용되고 있는데, 난황을 이용한 Tris egg yolk 희석제는 일반적으로 소의 동결 정액 제조시 널리 사용되고 있는 희석제이다 (Purdy, 2006).

일반적으로, 달걀의 난황은 정자의 동결시 cold shock로부터 정자를 보호하고 액체질소 (Phillips와 Lardy, 1940; Dunn 등, 1950; Barak 등, 1992; Shannon과 Curson, 1983) 또는 냉각된 상태 (De Leeuw 등, 1993; Lasley와 Mayer, 1944; Watson, 1976)로부터 정자의 수정 능력을 유지시켜 주는데 큰 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 다양한 포유동물의 정자를 동결하는 데 있어 지난 60년간 난황이 널리 이용되어 왔다. 뿐만 아니라 난황의 보호 역할은 low density lipoprotein (LDL)에서 기인한다고 보고되고 있다 (Watson과 Martin, 1975; Quinn 등, 1980; Graham과 Foote, 1987; Babiak 등, 1999; Moussa 등, 2002; Bergeron과 Manjunath, 2006). LDL은 정자의 동결-융해 과정에서 정자 막의 인지질과 콜레스테롤을 융합하는 것을 촉진시키고 (Bergeron 등, 2004), seminal plasma protein과 결합체를 형성하여 세포막의 손상을 최소화시킨다고 보고된 바 있다 (Bergeron 등, 2004; Manjunath 등, 2002). 또한, 많은 연구자들은 LDL이 포유류 정자의 동결-융해 과정에서 정자의 보호작용을 하는 것으로 보고하고 있다 (Watson과 Martin, 1975; Quinn 등, 1980; Graham과 Foot, 1987; Trimeche 등, 1997; Moussa 등, 2002; Lamia 등, 2004; Bergeron과 Manjunath, 2006; Hu 등, 2006, 2008; Jiang 등, 2007; Bencharif 등, 2008).

Taurine과 hypotaurine은 sulfonic amino acid로서 정자의 plasma membrane 전체에 걸쳐 항산화 역할을 수행하며, ROS에 대항하여 정자의 과산화 지질화를 억제하여 세포를 보호하는 역할을 수행한다 (Chen 등, 1993; Foote 등, 2002). Trehalose는 비감소성 이당류 (non reduction disaccharide)로 삼투압의 영향으로부터 세포를 보호하는 역할을 수행하며, 세포막의 인지질 안에서 특이한 상호작용을 형성, 고장액의 용출 및 빙상 결정화에 의한 세포손상을 감소시키는 역할을 수행한다 (Anchordoguy 등, 1987; Liu 등, 1998; Molinia 등, 1994; Storey 등, 1998).

최근 소 (Uysal 등, 2007; Sariozkan 등, 2009), 돼지 (Funahashi와 Sano, 2005; Hu 등, 2009), 양 (Bucak 등, 2007) 그리고 개 (Martins-Bessa 등, 2009; Michael 등, 2007)의 동결정액 제조에 있어 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose와 같은 항산화 물질을 동결보호제와 함께 첨가하여 동결 융해 후 정자의 성상을 개선한 바를 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 보다 안정적인 동결정액의 제조를 위하여, 제주흑우의 동결정액 제조에 있어 LDL과 항산화제로서 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 조합이 동결-융해 후 정자의 성상에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 제주흑우 정액 채취

Table 1. Composition of Tris-egg yolk extender

Component	Concentration
Tris	121.1 mM
Fructose	180.2 mM
Citric acid	294.1 mM
Egg yolk	10%
Glycerol	7%
Streptomycin sulfate	10 mg/ml

정액채취에 이용된 흑우는 3세 이상의 수컷 6두를 선발하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 월 4회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질 (Model 66000-D, Nasco, FHK, Japan)을 사용하여 채취하였다. 정액 채취를 위하여 암컷을 안전하게 정액 채취실 보정틀에 고정시킨 후, 제주흑우 수컷을 2~3회 암컷의 주위를 맴돌게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 penis를 인공질에 삽입하여 정액을 채취하였다. 인공질의 온도는 38°C를 유지하였으며, 인공질에는 penis의 삽입을 원활하게 하기 위하여 젤을 도포하였다. 인공질 끝 부분에 15 ml tube를 채취 전에 장착하여 사출된 정액을 회수하였다. 회수된 정액은 37°C 온장고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다.

### 정액의 처리 및 제조

본 실험에 이용된 보존액의 조성은 Table 1과 같으며, 대조군으로서 7%의 glycerol을 동결보호제로 사용하였으며, 실험군으로 4%의 LDL이 포함된 희석제에 20 mM의 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose를 첨가하였으며, LDL은 2002년 보고된 Moussa 등의 방법에 의해 제조하였다. 채취된 정액은 즉시 실험실로 운반하고, 원정액을 Tris-Egg yolk extender과 1:1로 희석하여 냉각을 시작하여 5 단계를 거쳐 총 2시간 동안 냉각시켰다. 마지막 희석 후, 동결보호제가 첨가된 희석액을 첨가하여 2시간 동안 평형을 유도하였으며, 평형이 완료된 정자는  $50 \times 10^6$ /ml로 농도를 조절하여 0.5 ml straw에 충전 병합하였다. 충전된 straw는 액체질소 표면 5 cm 높이에서 10분간 노출시켜 예비동결을 실시한 후에 액체질소에 침지하여 동결을 완료하였다. 동결된 정액은 LN<sub>2</sub> tank에서 보관하였으며, 필요 시 융해하여 사용하였다. 동결정액은 공기 중에서 약 10초간 정지하여 37°C 온수에 20초간 침지시켜 융해한 후 정자의 생존율 및 정자 양상을 조사하였다.

### 정자의 운동성 평가

정액의 운동성 평가는 MicroLux 현미경 ( $\times 70$ , Olympus, Japan) 하에서 정자의 활력을 평가하였다. 혈구계산판에 5  $\mu$ l의 정액을 넣고 cover glass로 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하였다. 혈구계산판의 격자 2 군데를 반복적으로 관찰하여 거의 모든 정자들이 소용돌이치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들을 격자 별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80개 이상일 때 80%, 70개 이상일 때 70%로 판단하고 움직이는 정도가 전진 운동 또는 느리게

전진 운동하는 수준일 때 50%, 느리게 전진운동 하거나 전진 운동 혹은 미동하는 수준일 때 30%로 평가하였다.

### 정자의 생존율 평가

정자의 생존성은 Eosin-Y 염색법을 이용하여 생존율을 평가하였다. Eosin-Y 염색액은 0.9% NaCl 용액에 0.5% Eosin-Y를 용해하여 제조하였다. 동결정액 straw를 용해한 후 37°C의 DPBS 1 ml와 혼합하여 400  $\times$ g에서 3분간 원심분리하여 동결보호제를 제거하였다. 정자 pellet을 500  $\mu$ l의 DPBS를 이용하여 재부유시킨 후, 10  $\mu$ l의 정액을 slide glass 위에 올려 다음 동량의 염색액을 섞어 도말, cover glass를 덮고 MicroLux 현미경 ( $\times$  70, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다. 100배율에서 염색 상태를 관찰하여 표본 1개당 200개의 정자를 카운트하였으며, 붉게 염색된 죽은 정자의 비율을 계산하여 개체 당 2개의 표본을 만들어 총 400개의 정자를 카운트, 생존율을 평가하였다.

### 정자막 온전성 평가

정자막 온전성을 측정하기 위하여 Jeyendran 등 (1984)의 방법을 변형하여 저삼투압 용액을 이용한 정자 미부의 팽창형태를 분석하였다 (Hypo-Osmotic Swelling Test: HOST). 37°C의 저장액 (150mOsm/kg, 0.45% NaCl 용액) 1 ml에 정자 샘플 100  $\mu$ l를 혼합하여 37°C에서 5분간 정지시킨 후 slide glass에 도말하였다. 도말한 표본은 개체 당 2개의 slide를 만들어 표본당 200개의 정자를 카운트 하여 정자막의 온전성을 평가하였다.

### 침체막 변화 양상의 측정

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 Chlortetracycline (CTC) 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 침체막 변화 양상을 조사하였다. 정액을 400  $\times$ g에서 2분간 원심분리하여 세척한 다음 500  $\mu$ l의 CTC 용액 (750  $\mu$ M CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cysteine in 20 mM Tris buffer; pH 7.8)을 혼합하여 20초간 암실에서 상온배양하였다. CTC 반응을 고정시키기 위하여 10  $\mu$ l의 12.5% glutaraldehyde를 혼합하여 4°C에서 보관하였다. 염색 후 24시간 이내에 판독하였으며, 정자 침체막 양상의 판독 기준은 Fraser (1995)의 분류를 따라 정자 두부가 전체적으로 형광 발광을 할 경우 수정능획득이 일어나지 않은 F pattern으로, 적다면 부분에 띠가 형성되어 침체 아랫부분에서 형광 발광을 할 경우 수정능획득이 일어난 B pattern으로 구분하였으며, 마지막으로 정자 두부가 형광 발광을 하지 않거나, 얼룩덜룩한 발광을 할 경우 침체반응이 일어난 AR pattern으로 구분하였다.

### 정자의 난자내 침투 능력 평가

10주~15주령 사이의 햄스터에 PMSG 30 IU를 복강내 주사하고, 48시간 후 hCG 30 IU를 복강 주사하여 배란을 유도하였다. hCG 주사 15시간 후 개복하여 난관을 채취하여 난관내 배란된 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 0.1% hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 제거한 다음 0.1% trypsin을 처리하여 투명대를 제거하였다.

동결 용해된 정자를 PBS를 이용하여 400  $\times$ g, 2회 원심분리하여 동결보존액을 제거한 다음, 10  $\mu$ g/ml의 hepa-

rin이 포함된 TALP 배양액을 이용하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10분간 수정능획득을 유도하였다. 수정능획득이 유도된 정자는 2 $\times$ 10<sup>5</sup> live sperm/ml로 농도를 조절하여 투명대가 제거된 햄스터 난자와 3.5시간 동안 공배양하였다. 3.5시간 후 공배양된 난자를 2~3회 세척하여 slide glass 위에 올려 mounting한 다음 methanol : acetic acid (3:1, v/v) 용액에서 24시간 동안 고정시켰다. 고정된 난자는 1% lacmoid를 이용하여 염색한 후 위상차 현미경을 이용하여 침투된 정자의 변화를 관찰하였다 ( $\times$  400 magnification).

정자의 난자내 침투 능력의 평가는 Oh 등의 방법 (2010a)을 이용하여 계산하였다.

### 통계 분석

통계 분석은 통계분석 프로그램 (SPSS version 18.0)을 이용하였으며, 항산화제의 첨가가동결 용해 후 정자의 성장에 미치는 영향에 대한 결과는 ANOVA를 이용하여 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### LDL과 항산화제가 동결 용해 후 정자의 운동성과 생존율에 미치는 영향

제주흑우의 동결정액 제조시 LDL과 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가가 동결 용해 후 정자의 운동성 및 생존율에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 2와 같다.

본 실험의 결과 운동성에 있어 실험구와 대조구 사이의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 생존율에 있어 모든 실험구가 대조구에 비하여 유의적으로 높은 생존율을 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 그러나 대조구를 제외한 모든 실험구 사이의 생존율은 유의적 차이를 나타내지 않았다.

### LDL과 항산화제의 조합이 동결 용해 후 정자막 온전성에 미치는 영향

Table 3은 제주흑우 정액의 동결정액 제조에 있어 LDL, taurine, hypotaurine 그리고 trehalose가 동결 용해 후 정자막 온전성의 변화에 미치는 영향에 대하여 연구한 결

Table 2. Effect of LDL and LDL-antioxidants on motility and viability of frozen-thawed sperm

	Motility (%)	Viability (%)
Control	64.00 $\pm$ 9.62	56.25 $\pm$ 6.42 <sup>c</sup>
LDL	67.00 $\pm$ 5.70	63.40 $\pm$ 7.39 <sup>ab</sup>
LDL - taurine	70.00 $\pm$ 5.00	69.70 $\pm$ 6.12 <sup>a</sup>
LDL - hypotaurine	68.00 $\pm$ 5.70	67.25 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>
LDL - trehalose	70.00 $\pm$ 5.00	64.55 $\pm$ 2.43 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Values with different superscripts within same column are significantly different by ANOVA ( $p<0.05$ ). Data are presented as mean $\pm$ SD.

**Table 3. Effect of LDL and LDL-antioxidants on sperm membrane integrity of frozen-thawed sperm**

	Swelled sperm(%)
Control	51.90 ± 9.99 <sup>c</sup>
LDL	61.65 ± 5.18 <sup>b</sup>
LDL - taurine	70.55 ± 5.16 <sup>a</sup>
LDL - hypotaurine	64.45 ± 5.85 <sup>ab</sup>
LDL - trehalose	64.50 ± 2.78 <sup>ab</sup>

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts within same column are significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Data are presented as mean ± SD.

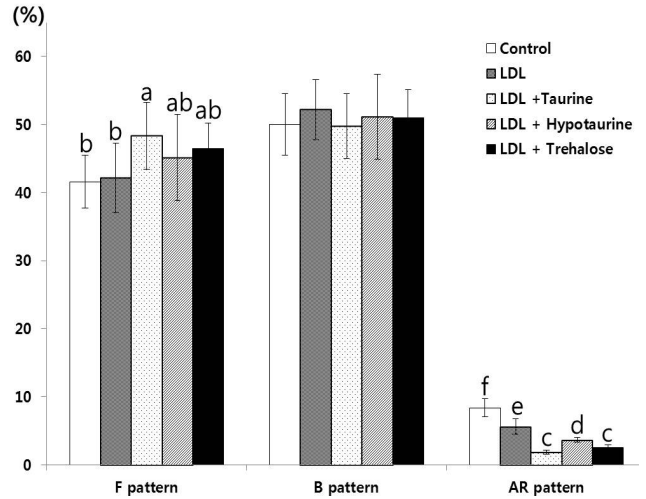
과이다. LDL-*taurine* 조합은 동결 용해후 꼬리막이 팽창된 정자의 비율이 대조구에 비하여 유의적으로 증가한 결과를 보였다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 실험구 사이의 유의적 차이는 나타나지 않았다.

**LDL과 항산화제의 조합이 동결 용해 후 정자의 침체막 변화에 미치는 영향**

제주흑우 동결정액의 제조에 있어 LDL과 *taurine*, *hypotaurine* 그리고 *trehalose*가 동결 용해 후 정자의 침체막 변화에 미치는 영향에 관한 결과는 Fig. 1에 나타나 있다. F pattern의 비율에 있어 LDL-*taurine*의 처리는 대조구에 비하여 유의적으로 높은 수준을 나타냈으나 ( $p < 0.05$ ), 실험구 사이의 유의적 차이는 없었다. B pattern의 비율은 모든 실험구 사이의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 AR pattern의 비율에 있어 LDL-*taurine*과 LDL-*trehalose*의 처리시 유의적으로 낮은 수준의 AR pattern 비율을 나타냈으며, LDL-*hypotaurine* 그리고 LDL 처리의 순으로 대조구에 비하여 모두 유의적으로 낮은 수준의 AR pattern을 나타냈다 ( $p < 0.05$ ).

**LDL과 항산화제의 조합이 동결 용해 후 정자의 수정능력에 미치는 영향**

Table 4는 투명대가 제거된 햄스터 난자를 이용하여



**Fig. 1. Effect of LDL and LDL-antioxidants on capacitation status of frozen-thawed sperm.** <sup>a,b</sup> F pattern values for various cryoprotectants with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). <sup>c-f</sup> AR pattern values for various cryoprotectants with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

정자의 난자내 침투능력을 조사하여 수정능력을 평가하는 방법으로 제주흑우 정액의 동결정액 제조에 있어 LDL, *taurine*, *hypotaurine* 그리고 *trehalose*가 동결 용해 후 정자의 수정능력에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 본 실험의 결과, LDL-*taurine* 실험구가 대조구에 대하여 유의적으로 높은 응성전핵 형성율과 SFI를 나타냈을 뿐만 아니라 ( $p < 0.05$ ), LDL의 단독 처리에 비하여도 유의적으로 높은 수준의 응성전핵 형성율과 SFI를 나타냈다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 LDL-*hypotaurine*, LDL-*trehalose* 실험구와 비교하였을 때, LDL-*taurine* 실험구가 다소 높은 응성전핵 형성율과 SFI를 나타냈지만 이들 사이의 유의적 차이는 없었다. 또한, decondensed sperm 비율에 있어 LDL, LDL-*taurine*, LDL-*hypotaurine* 그리고 LDL-*trehalose* 실험구 모두 대조구에 비하여 유의적으로 높은 결과를 나타냈다 ( $p < 0.05$ ).

**Table 4. Effect of taurine, hypotaurine and trehalose on sperm penetration ability using zona-free hamster oocytes**

	PN	DC	EN	SFI
Control	0.40 ± 0.55 <sup>c</sup>	1.00 ± 0.71 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.84	0.36 ± 0.13 <sup>c</sup>
LDL	1.20 ± 0.84 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.45 <sup>a</sup>	1.60 ± 0.65	0.58 ± 0.19 <sup>b</sup>
LDL - taurine	2.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.55 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.55	0.88 ± 0.11 <sup>a</sup>
LDL - hypotaurine	1.40 ± 0.55 <sup>ab</sup>	2.20 ± 0.45 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.71	0.70 ± 0.10 <sup>ab</sup>
LDL - trehalose	1.60 ± 0.55 <sup>ab</sup>	2.20 ± 0.45 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.00	0.74 ± 0.13 <sup>ab</sup>

PN: Pronucleus, DC: Decondensed sperm, EN: Enlarged sperm, SFI: Sperm fertility index. SFI=(PN×2+DC+EN)/No. of oocytes. SFI was calculated by method of Oh et al., (2010a).

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts within same column are significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Data are presented as mean ± SD.

## 고찰

일반적으로 난황은 소의 정액을 동결 보존하는데 있어 널리 사용되고 있다. 그것은 난황 안에 LDL이 존재하여 동결 용해되는 과정동안 정자의 손상을 감소시키기 때문이다 (Akhter 등, 2012). LDL은 약 87%의 지질과 12%의 단백질로 구성되어 있으며, 단백질과 인지질의 띠로 둘러싸인 중성지방 core에 기인한 (Cook과 Martin, 1969) 지름 약 35 nm의 구형대로 존재하는 데 (Anton 등, 2003), Quinn 등 (1980)은 동결 과정에서 LDL이 터지면서 LDL의 인지질이 정자 막 표면에 보호막을 형성한다고 제시하였다. LDL에서 기인된 인지질은 정자의 동결 과정에서 정자 막의 인지질을 대체한다고 보고된 바 있다 (Graham과 Foot, 1987). 즉, LDL이 동결 용해에서 기인되는 손상으로부터 정자를 보호하는 기작은 정자막의 인지질을 LDL로 대체함으로써 정자막을 안정시켜 동결 과정동안 정자 막의 단백질의 손상을 최소화 하는 것이라 할 수 있다 (Akhter 등, 2012). Hu 등 (2011)은 소의 동결정액 제조에 있어 LDL의 첨가가 동결 용해 후 정자의 운동성이 유의적으로 증가하였다고 보고한 바 있다. 또한, taurine은 동결된 정자가 산소가 공급되는 조건에 노출되거나 동결 용해 과정동안에 ROS로부터 정자를 보호하는 역할을 하는 비효소적 물질이며 (Alvarez와 Storey, 1983; Chen 등, 1993), hypotaurine은 정자의 동결 과정동안에 정자의 운동성, 형태 그리고 기능적인 정자막 온전성을 개선시키는 역할을 수행하며 (Meizel 등, 1980; Boatman 등, 1990), trehalose는 정자의 plasma membrane 안에서 인지질과의 상호작용을 통해 정자막 유동성을 증가시켜 동결 용해의 손상에 대한 정자의 저항성을 증가시킨다고 보고되었다 (Aboagla와 Terada, 2003). 본 연구의 결과, 모든 실험구에서 대조구에 비하여 유의적으로 높은 생존율을 나타냈으나 ( $p<0.05$ ), 실험구들 사이의 유의적 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 LDL이 가진 정자의 생존능력 보호에 대한 기능이 충분하여 항산화제의 역할이 크게 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다. 정자막의 온전성은 정자의 대사뿐만 아니라 난자와의 수정 및 정자의 수정능획득과 침체반응과도 밀접한 관계가 있어 정자의 수정능을 평가하는데 유용한 지표로 사용되고 있다 (Jeyendran 등, 1984). 따라서 HOST를 이용한 정자막 온전성 검사는 직접적으로 인공수정을 시행하거나, 체외수정방법을 통한 검사를 수행하는 것보다 시간과 비용적인 면에서 절약할 수 있으며, 손쉽게 수정능력을 예측할 수 있다. Table 3의 결과에서 LDL 단독 처리 실험구는 대조구에 비하여 유의적으로 높은 swelled sperm의 비율을 나타냈다. 그러나 LDL-taurine을 처리한 실험구의 swelling sperm의 비율은 LDL 단독 처리 실험구보다 유의적으로 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). 이는 LDL의 처리가 정자막을 안정시켜 동결 과정동안 정자 막의 단백질의 손상을 최소화한 것으로 판단되지만, taurine의 첨가로 인해 taurine이 ROS로부터 정자를 보호하는 역할이 LDL의 기능을 보다 안정적으로 유지시켜 주는 것으로 판단된다.

정자가 수정능획득 및 침체 반응 시 칼슘 이온이 작용하는 데, 정자 두부 특정 부위 내에 칼슘 이온의 존재를 antibiotic chlortetracycline 형광물질로 측정하는 방법이

개발되고 (Fraser 등, 1995), Kommisrud (2002)은 이 CTC 방법을 이용하여 수정능획득 및 침체 반응과 수정 능력 간의 관계를 보고하여 CTC를 이용한 정액 품질에 대한 평가 가능성을 제시한 바 있다. 또한, Oh 등 (2010b)은 돼지 정자의 수정능 예측을 위해 CTC 방법의 사용은 수정 능력이 불량한 개체를 예측하는 데 있어 유용하다고 보고한 바 있다. CTC를 이용한 정자의 수정능획득을 측정하기 위해서 Fraser 등 (1995)이 제시한대로 수정능획득이 일어나지 않은 F pattern과 수정능획득이 일어난 B pattern 그리고 침체 반응이 일어난 AR pattern으로 분류한다. 냉각기간 동안 세포막은 변성을 겪게 되며, 막 단백질의 파괴가 일어나 세포막의 인지질로부터 탈락하게 되어 인지질은 fluid에서 gel phase로 변화하게 되며, 이러한 막의 변화는 calcium ion channel의 기능적 손상을 초래하며, 결과적으로 세포 내  $Ca^{2+}$  농도의 상승을 야기하여 수정능획득이나 침체반응과 같은 기작을 보이게 된다 (Szasz 등, 2000; Pena 등, 2003). 따라서 동결 용해 후 capacitation-like state의 정자 비율이 사출 시 보다 약 25% 정도 높게 나타난다 (Pena 등, 2003). Fig. 1에서 보는 바와 같이 동결 용해 후 F pattern의 비율이 대조구에 비하여 LDL 단독 처리구를 제외한 모든 실험구에서 유의적으로 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). 이러한 결과는 항산화제로서 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose가 LDL과 함께 ROS로부터 정자를 보호하는 역할을 증진시킨 것으로 판단된다. 또한, AR pattern의 비율에 있어 LDL-taurine, LDL-hypotaurine, LDL-trehalose 그리고 LDL 처리 순으로 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 수준을 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 이러한 결과는 buffalo의 동결 정액 제조에 있어 taurine의 첨가 (Shiva Shankar Reddy 등, 2010), 양에서 hypotaurine의 첨가 (Bucak 등, 2009) 그리고 돼지에 있어 trehalose의 첨가 (Hu 등, 2009)는 동결로 인해 발생하는 capacitation-like state의 정자 비율을 감소시키는 데 영향을 준다는 보고와 부합하며, LDL 단독 처리 시 보다 이들 항산화제의 첨가 시 AR pattern의 비율이 감소하는 것으로 미루어, LDL과 항산화제의 조합은 동결 용해 후 정자의 품질을 개선시키는 가능성을 제시한다고 판단된다.

이러한 정자의 운동성, 생존성, 정자막 온전성, 수정능획득 양상의 검사들은 모두 정자의 수정능력을 위해 없어서는 안될 요소들이다. 정자의 기능을 평가하는 방법 중에서 정자의 수정능력을 평가하는 데 있어 최적의 방법은 분명 체외수정을 통한 평가법이다. 그러나 체외수정 방법을 이용하는 데 있어 필수적인 조건으로 난구세포와 난자세포가 모두 성숙된 난자가 필요하며, 이는 비용적으로, 또 시간적으로 소모가 생기는 방법이다. 투명대가 제거된 햄스터 난자를 이용한 정자의 난자내 침투 검사법은 사람에서 널리 사용되고 있는 수정능력 평가법으로 (Yanagimachi 등, 1976), 정자가 정상적으로 수정되는 데 필요한 생리적 활성을 완벽하게 측정할 수 있다 (Aitken, 1994). 본 연구의 결과, 모든 실험구에서 대조구와 비교하여 용성전핵 형성율과 SFI가 유의적으로 증가하였다 ( $p<0.05$ ). 뿐만 아니라 LDL-taurine 처리구는 모든 실험구에서 가장 높은 용성전핵 형성율과 SFI를 나타냈으나, LDL 단독 처리구만이 유의적 차이를 나타냈다 ( $p<0.05$ ). Hu 등 (2010)은 LDL의 첨가가 DNA integrity, motility, mem-

brane integrity 모두를 개선시킨다고 보고한 바 있으며, taurine은 소의 동결정액 제조에 있어 ROS로부터 정자를 보호하여 수정능력을 개선시킨다고 보고된 바 있다 (Uysal 등, 2007; Sariozkan 등, 2009). 본 실험의 결과, LDL과 taurine의 상호작용이 정자의 난자내 침투능력을 향상시켜 보다 높은 응성전핵 형성율과 SFI를 나타낸 것으로 판단된다. 본 실험의 결과를 종합하여 보면 LDL 단독으로도 동결 용해 과정에서 ROS로부터 정자가 손상됨을 막아주는 역할을 수행하지만 taurine, hypotaurine, trehalose 등의 항산화제의 첨가로 이들의 상호작용이 ROS로부터 정자를 보호하는 데 있어 상승작용을 하는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구의 결과 제주흑우의 안정적인 동결 정액의 제조에 있어 LDL, taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가는 동결 용해 후 정자의 능력을 개선시키는 데 효과가 있음을 보여주고 있다.

## 적 요

본 연구에서는 제주흑우의 유전자원 보존과 증식에 있어 성공적인 인공수정을 위한 안정적인 동결정액 제조법을 수립하고 동결 용해 후 정자의 품질을 개선하기 위하여 제주흑우의 동결 정액 제조시 LDL, taurine, hypotaurine 그리고 trehalose를 첨가하여 이들이 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향에 대하여 알아보하고자 수행하였다. 제주흑우의 정액 동결 시 LDL, LDL-taurine, LDL-hypotaurine 그리고 LDL-trehalose의 첨가는 (63.40%±7.39, 69.70%±6.12, 67.25%±3.21, 64.55%±2.43) 대조구에 (56.25%±6.42) 비하여 모두 유의적인 생존율의 증가를 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 정자막 온전성 검사를 통한 꼬리막 팽창 정자의 비율은 LDL-taurine을 첨가 실험구에서 70.55%±5.16, LDL-hypotaurine 첨가 실험구에서 64.45%±5.85, LDL-trehalose 실험구에서 64.50%±2.78, LDL 단독 첨가 실험구에서 61.65%±5.18로 대조구 51.90%±9.99보다 모두 유의적으로 높은 결과를 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 동결 용해 후 정자의 침체막 변화 양상에 있어서는 B pattern의 비율은 대조구와 실험구 모두 유의적 차이가 없었으며, F pattern은 LDL-taurine의 조합만이 대조구와 유의적인 차이를 나타내며 증가하였다 ( $p<0.05$ ). 그러나 AR pattern의 비율은 LDL-taurine, LDL-trehalose, LDL-hypotaurine 그리고 LDL 처리의 순으로 대조구에 비하여 모두 유의적으로 낮은 수준의 AR pattern의 비율을 나타냈다( $p<0.05$ ). 정자의 수정능력 평가에 있어 LDL-taurine, LDL-hypotaurine 그리고 LDL-trehalose 모두 대조구에 대하여 유의적으로 높은 응성전핵 형성율과 SFI를 나타냈으며 ( $p<0.05$ ), 특히 LDL-taurine의 첨가는 LDL의 단독 처리에 비하여도 유의적으로 높은 수준의 응성전핵 형성율과 SFI를 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 또한, decondenced sperm 비율에 있어 LDL, LDL-taurine, LDL-hypotaurine 그리고 LDL-trehalose 실험구 모두 대조구에 비하여 유의적으로 높은 결과를 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 본 연구의 결과는 제주흑우 정액의 동결정액 제조에 있어 안정적인 제조법을 공급할 수 있으며, 동결 용해 후 정자의 기능 개선 방법에 보다 많은 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2012년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사 후연수과정지원사업에 의해 이루어진 것임.

## 인용문헌

1. Aboagla EM, Terada T (2003): Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 69:1245-1250.
2. Aitken RJ (1994): Pathophysiology of human spermatozoa. *Curr Opin Obstet Gynecol* 6:128-135.
3. Akhter S, Ansari M, Andrabi S, Rakha B, Ullah N, Khalid M (2012): Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 47: 815-819.
4. Alvarez JG, Storey BT (1983): Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 29:548-555.
5. Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH (1987): Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24: 324-331.
6. Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beaumont V, David-Briand E, Rabesona H (2003): Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem* 83:175-183.
7. Babiak I, Glogowski J, Luczynski MJ, Luczynski M, Demianowicz W (1999): The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology* 52: 473-479.
8. Barak Y, Amit A, Lessing JB, Paz G, Hommonai ZT, Yogev L (1992): Improved fertilization rate in an *in vitro* fertilization program by egg yolk-treated sperm. *Fertil Steril* 58:197-198.
9. Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Larrat M, Tainturier D (2008): The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70:1478-1488.
10. Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P (2004): Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 70: 708-717.
11. Bergeron A, Manjunath P (2006): New insights towards understanding the mechanisms of sperm pro-

- tection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 73: 1338-1344.
12. Boatman DE, Bavister BD, Cruz E (1990): Addition of hypotaurine can reactivate immotile Golden Hamster spermatozoa. *J Androl* 11:66-72.
  13. Bolten M, Weissbach L, Kaden R (2005): Cryopreserved human sperm deposits: Usability after decades of storage. *Urologe A* 44:904-908.
  14. Bucak MN, Ateşşahin A, Varişli O, Yüce A, Tekin N, Akçay A (2007): The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67:1060-1067.
  15. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA, Coyan K, Başpınar N, Ozkalp B (2009): Effects of hypotaurine, cysteamine and amino acids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Res Vet Sci* 87:468-472.
  16. Chen Y, Foote RH, Tobback C, Zhang L, Hough S (1993): Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. *Dairy Sci* 76:1028-1034.
  17. Cook WH, Martin WG (1969): Egg lipoproteins. In: Tria E, Scanu AM (eds.). *Structural and Functional Aspects of Lipoproteins in Living Systems*. Academic Press, New York, USA, pp 579-615.
  18. Curry MR, Millar JD, Watson PF (1994): Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observation. *Biol Reprod* 51:1014-1021.
  19. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ (1993): Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32-44.
  20. Dunn HO, Bratton RW, Collins WJ (1950): Fertility and motility of bovine spermatozoa in buffered whole egg extenders. *J Dairy Sci* 33:434-437.
  21. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT (2002): Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 71: 13-23.
  22. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995):  $Ca^{2+}$ -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40:233-241.
  23. Funahashi H, Sano T (2005): Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology* 63:1605-1616.
  24. Graham JK, Foote RH (1987): Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24:42-52.
  25. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
  26. Hu JH, Li QW, Li G, Chen XY, Yang H, Zhang SS, Wang LQ (2006): The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Aust J Anim Sci* 19:486-494.
  27. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY (2008): Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 57: 257-262.
  28. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS, Zhao HW (2009): The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod Domest Anim* 44:571-575.
  29. Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK, Li X (2010): Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *J Anim Sci* 88:1657-1662.
  30. Hu JH, Jiang ZL, Lv RK, Li QW, Zhang SS, Zan LS, Li YK, Li X (2011): The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* 62:83-87.
  31. 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.
  32. Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW, Zhang SS (2007): Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 54:301-304.
  33. 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.
  34. Lamia A, Daniel T, Laetitia J, Chantal T, Olivier G, Jean LC, Marc A (2004): Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61:895-907.
  35. Lasley JF, Mayer DT (1944): A variable physiological factor necessary for the survival of bull spermatozoa. *J Anim Sci* 3:129-135.
  36. Leibo SP, Bradly L (1999): Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon. C. (eds.). *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*, Cache Raven Press. Illinois, USA, pp 501-516.
  37. Liu Z, Foote RH, Brockett CC (1998): Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 37:219-230.
  38. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M (2002): Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg

- yolk. *Biol Reprod* 67:1250-1258
39. Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A (2009): Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. *Theriogenology* 71: 248-253.
  40. Mazur P (1984): Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: c125-142.
  41. Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ (1980): Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive track fluids of several mammals. *Dev Growth Differ* 22:483-494.
  42. Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscoc C :(2007) Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 68:204-212.
  43. Molinia FC, Evans G, Quintana Casares PI, Maxwell WMC (1994): Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 36: 113-122.
  44. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M (2002): Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57:1695-1706.
  45. Oh SA, You YA, Park YJ, Pang MG (2010)a: The sperm penetration assay predicts the litter size in pigs. *Int J Androl* 33:604-612.
  46. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG (2010)b: Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 121:131-138.
  47. Peña AI, López-Lugilde L, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG (2003): Studies on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. *Reprod Domest Anim* 38:27-35.
  48. Phillips P, Lardy AL (1940): A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Sci* 23: 399-404
  49. Purdy PH (2006): A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res* 6:215-225.
  50. Quinn PJ, Chow PYW, White IG (1980): Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil* 60:403-407.
  51. Sariozkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A (2009): The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58:134-138.
  52. Szasz F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti And L, Gadella BM (2000): Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev* 55:289-298.
  53. Shannon P, Curson B (1983): Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *N Z J Agric Res* 26:187-189.
  54. Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G, Atreja SK (2010): Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 119:183-190.
  55. Storey BT, Noiles EE, Thompson KA (1998): Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37:46-58.
  56. Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D (1997): Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of *Poitou jackass sperm*. *Cryobiology* 34:385-393.
  57. Uysal O, Bucak MN, Yavas I, Varush O (2007): Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J Anim Vet Adv* 6:1362-1366.
  58. Vishwanth R, Shannon P (2000): Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62:23-53.
  59. Watson PF (2000): The causes of reduces fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481- 492.
  60. Watson PF, Martin CI (1975): The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Aust J Biol Sci* 28:145-152.
  61. Watson PF (1976): The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 58°C and deep-freezing. *J Therm Biol* 1:137-141.
  62. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976): The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15:471-476.

(접수일자: 2012. 7. 10 / 채택일자: 2012. 9. 24)