

Heparin 이 소 精子的 受精能獲得反應에 미치는 影響에 관한 研究

朴永植·任京淳
서울大學校 農科大學

Study on Effect of Heparin on Bovine Sperm Capacitation

Park, Y.S., K.S. Im
College of Agriculture, Seoul National University

SUMMARY

To investigate the effect of heparin on sperm capacitation. The acrosome reaction of bovine sperm which were incubated in mTALP containing heparin and the *in vitro* development of bovine follicular oocytes which were cocultured with heparin-treated sperm were evaluated, and the results were as follows:

1. When bovine fresh sperm were incubated in mTALP solution containing 0, 5, 10 and 25 μ g/ml heparin for 15 to 840 minutes, there was no significant difference between motilities of heparin-treated sperm and untreated sperm, but the acrosome-reaction rate of heparin-treated sperm was significantly higher than that of untreated sperm. Moreover the acrosome reaction rate of sperm treated with heparin was significantly increased after incubating for 15 minutes.
2. When fresh sperm were incubated in mTALP solution containing 10 μ g/ml heparin for 840 minutes, the motility of sperm incubated for 840 minutes was lower than those of sperm incubated for 0, 15, 60 and 120 minutes, but the acrosome-reaction rate of sperm incubated for 840 minutes was higher than those of the others.
3. When frozen-sperm were incubated in mTALP solution containing 10 μ g/ml heparin for 120 minutes, the acrosome reaction rate of sperm was significantly increased after incubating for 15 minutes.
4. When fresh sperm treated with heparin were cocultured with bovine follicular oocytes, 16.7 to 23.7% of the oocytes were developed to 2-8 cell stage.

(Key word: Heparin, Capacitation, Acrosome reaction, IVF)

I. 緒 論

精子는 雌性生殖道管에서 受精能力을 획득하는데 (Iritani와 Niwa, 1977; Imai 등, 1977), 이러한 雌性生殖道管에는 精子的 受精能獲得을 유발하는 glycosaminoglycans(GAGs)가 함유되어 있다고 보고된 바 있다(Lee와 Ax, 1984). 특히 Handrow 등(1982)은 GAGs 중에서 heparin 이 가장 강

력한 尖帽反應 誘發能力을 가지고 있다고 보고하였으며, Parrish 등(1985)도 heparin 을 이용하여 체외에서 精子的 尖帽反應率 및 體外受精率을 높였다고 보고한 바 있다. 그러나 heparin 의 受精能獲得 誘發能力은 개체의 精液에 따라서, 또는 精子的 培養條件 및 환경에 따라서 달라질 수 있다. Becker 등(1977)은 凍結融解過程에서 精子的 活力이 저하될 뿐만 아니라, 尖帽가 손상된다고 하였으나, Babusik 등(1986)은 凍結이 精子

의 尖帽反應을 촉진시킨다고 하였다. 한편 受精能獲得한 精子는 卵子와 受精하면서 尖帽反應을 수행하는데, Graham 과 Foote(1984)는 精子의 尖帽反應 遂行能力의 差異를 이용해서 수소간 受胎能力의 差異 즉 精子의 受精能獲得能力의 차이를 평가하려고 시도하였다.

본 실험에서는 heparin 이 소 精子-, 受精能獲得에 미치는 影響을 살펴보기 위하여, 수소의 新鮮 및 凍結 精液에 heparin 을 처리하여 培養한 精子의 尖帽反應을 조사하고 아울러 heparin 처리에 의해서 수정능 획득한 新鮮精子를 卵胞卵子와 公배양하여 卵자의 發生을 조사하였다.

II. 材料 및 方法

原精液과 凍結精液을 Ca-free mTALP 液(Parrish 등, 1985)으로 10배 희석하여 1,200rpm 으로 10분간 遠心分離하여 상등액을 제거한 다음, ml 당 1억의 精子가 포함되도록 mTALP 液으로 精子펠릿을 부유하였다. 부유한 精液을 heparin 이 첨가된 mTALP 液과 동량으로 희석하여 39°C에서 840분간 培養한 다음, 精子의 活力과 尖帽反應率을 조사하였다. 이때 heparin 의 終末濃度는 각각 0, 5, 10 및 25 μ g/ml 가 되도록 조정하였다.

體外成熟한 卵胞卵子와의 體外受精에는 液體室素에서 사멸시킨 死滅精子(killed sperm)와 ml 당 10 μ g 의 heparin 이 첨가된 mTALP 液으로 부유하여 39°C에서 15분간 培養한 新鮮精子(fresh sperm)를 사용하였다. 직경 2~5mm 의 卵胞에서 採卵한 未成熟 卵자를

fetal calf serum 0.3ml, pyruvate 66 μ g, FSH 30 μ g 및 glucose 2.7mg 이 첨가된 2.7ml 의 TL stock solution(Bavister 와 Yanagimachi, 1977)에 부유한 후, 5% CO₂, 100% 습도 및 39°C에서 28시간 培養하여 成熟시켰다. 이렇게 준비된 精子와 卵자를 BSA 30mg 과 pyruvate 0.11mg 이 첨가된 5ml 의 TL stock solution 에 부유하여 5% CO₂, 100% 습도 및 39°C에서 4일간 培養한 다음, 受精卵의 發生率을 조사하였다.

III. 結果

1. Heparin 이 소 精子의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

소 新鮮精子를 heparin 이 ml 당 0, 5, 10 및 25 μ g 첨가된 mTALP 液에서 15, 60, 120 및 840분간 培養하였을 때, 精子의 活力과 尖帽反應率은 Table 1과 같다.

精子의 活力은 heparin 濃度간에 유의한 차이가 없었으나 ($p > 0.05$), 精子의 尖帽反應率은 15분간 培養에서 heparin 10 μ g/ml 이 3.9%로서 0 및 25 μ g/ml 의 2.2 및 2.7%보다 유의하게 ($P < 0.01$) 높았으나, 5 μ g/ml 의 3.4%와는 유의한 차이가 없었다. 또한 精子의 尖帽反應率은 60 및 120분간 培養 공히 heparin 5, 10 및 25 μ g/ml 가 0 μ g/ml 보다 유의하게 높았으나 5, 10 및 25 μ g/ml 간에는 유의차가 없었다. 한편 精子의 尖帽反應率은 840분간 培養에서 heparin 10 μ g/ml 이 다른 처리구보다 유의하게 높았다. 그러므로

Table 1. Effect of heparin concentration on sperm motility and acrosome reaction of bovine fresh semen

Heparin (μ g/ml)	Incubation time(minute)							
	15		60		120		840	
	MOT	AR	MOT	AR	MOT	AR	MOT	AR
0	63.3 ^{NS}	2.2 ^c	58.3 ^{NS}	3.1 ^b	54.4 ^{NS}	4.2 ^b	33.3 ^{NS}	15.2 ^b
5	63.3	3.4 ^{ab}	60.0	5.3 ^a	57.2	6.6 ^{ab}	28.9	19.2 ^b
10	62.2	3.9 ^a	58.3	5.6 ^a	54.4	7.9 ^a	30.0	27.3 ^a
25	62.8	2.7 ^{bc}	58.9	4.3 ^{ab}	52.2	6.9 ^a	25.5	18.5 ^b

a, b, c : significantly different at $P < 0.01$ in the same column

NS : not significantly different ($P > 0.05$)

MOT : sperm motility(%), AR : acrosome reaction rate(%)

소의 新鮮精子는 10 μ g/ml의 heparin이 첨가된 mTALP液에서 15분 이상 培養하면 尖帽反應이 증진 되는 것으로 示唆된다.

2. 수소개체와 培養時間이 소 新鮮精子的 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

소 新鮮精자를 mTALP液에서 0, 15, 60, 120 및 180분간 培養하였을 때, 精자의 活力과 尖帽反應率은 Table 2와 같다.

mTALP液에서 0, 15, 60, 120 및 840분간 培養하였을 때, 精자의 平均 活力은 77.2, 61.3, 58.9, 54.6 및 31.4%로 培養 840분이 培養 0, 15, 60 및 120분

보다 유의하게 ($P < 0.01$) 낮았다. 培養기간에 있어서 精자의 活力은 홀스타인이 한우보다 유의하게 ($P < 0.01$) 높았다. 한편 精자의 平均 尖帽反應率은 培養 0, 15, 60, 120 및 840분에서 각각 0.9, 3.0, 4.6, 6.4 및 20.0%로 培養 840분이 培養 0, 15, 60 및 120분보다 유의하게 ($P < 0.01$) 높았다. 840분간 培養된 精자의 尖帽反應率은 KNC 1이 31.2%로서 HOL 1과 2의 14.6과 14.4%보다 유의하게 ($P < 0.05$) 높았다. 전반적으로 培養時間이 길어짐에 따라서 精자의 活力은 감소하였으나, 尖帽反應率은 유의하게 증가하였다.

3. 수소개체와 培養時間이 소 凍結精자의 活力과 尖

Table 2. Effect of individual bull and incubation time on sperm motility and acrosome reaction of bovine fresh semen

Bull	Incubation time (minute)									
	0		15		60		120		840	
	MOT	AR	MOT	AR	MOT	AR	MOT	AR	MOT	AR
KNC 1	61.7 ^{NS}	0.8 ^b	44.6 ^B	3.5 ^a	39.2 ^C	5.3 ^{NS}	36.7 ^B	7.7 ^a	17.9 ^B	31.2 ^a
HOL 1	86.7	1.6 ^a	76.7 ^A	3.7 ^a	75.4 ^A	4.9	69.2 ^A	6.4 ^{ab}	42.5 ^A	14.6 ^b
HOL 2	83.3	0.4 ^b	67.5 ^A	1.9 ^b	62.1 ^B	3.5	57.9 ^A	5.1 ^b	33.8 ^A	14.4 ^b
Mean	77.2 ^y	0.9 ^j	61.3 ^y	3.0 ^{ij}	58.9 ^y	4.6 ^{ij}	54.6 ^y	6.4 ⁱ	31.4 ^x	20.0 ^h

a, b : significantly different at $P < 0.05$ in the same column

A, B, C : significantly different at $P < 0.01$ in the same column

h, i, j ; x, y, z : significantly different at $P < 0.01$ in the same row

KNC : Korean Native Cattle, HOL : Holstein

Table 3. Effect of individual bull and incubation time on sperm motility and acrosome reaction of bovine frozen semen

Bull	After thawing	Incubation time (minute)								
		0		15		60		120		
		MOT	AR	MOT	AR	MOT	AR	MOT	AR	
KNC 1	43.8 ^{NS}	2.3 ^C	36.3 ^{AB}	2.0 ^D	30.0 ^A	8.1 ^C	17.5 ^A	25.7 ^{BC}	18.8 ^{AB}	33.6 ^C
HOL 1	38.8	1.4 ^C	38.8 ^{AB}	2.2 ^D	33.8 ^A	7.4 ^C	31.3 ^A	37.1 ^B	28.8 ^A	49.9 ^B
HOL 2	46.3	0.4 ^C	42.5 ^{AB}	2.7 ^D	37.5 ^A	14.1 ^C	33.8 ^A	39.1 ^{AB}	28.8 ^A	57.7 ^{AB}
HOL 3	47.5	3.6 ^C	47.5 ^A	12.5 ^C	35.0 ^A	15.4 ^C	30.0 ^A	14.2 ^C	30.0 ^A	47.9 ^{BC}
HOL 4	45.0	10.3 ^B	30.0 ^B	25.5 ^B	10.0 ^B	30.9 ^B	20.0 ^A	31.3 ^{BC}	10.0 ^{AB}	63.5 ^{AB}
HOL 5	50.0	17.5 ^A	15.0 ^C	29.1 ^A	5.0 ^B	46.2 ^A	5.0 ^B	55.7 ^A	5.0 ^B	67.9 ^A
Mean	45.2 ^x	5.9 ^d	35.0 ^{xy}	12.3 ^{cd}	25.2 ^{yz}	20.4 ^c	22.9 ^z	33.9 ^b	20.2 ^z	47.5 ^a

A, B, C, D : significantly different at $P < 0.01$ in the same column

a, b, c, d ; x, y, z : significantly different at $P < 0.01$ in the same row

NS : not significantly different ($P < 0.05$)

Table 4. Effect of heparin-treated sperm on *in vitro* development of bovine follicular oocytes

Sperm	Expl.	No. of oocytes	No. of oocytes cleaved	Developmental stage (cell)				Cleavage rate (%)
				2	3~4	5~8	>8	
Killed	1	35	0	0	0	0	0	0
Treated with								
Heparin	1	69	14	6	3	1	4	20.3
	2	38	9	4	2	1	2	23.7
	3	24	4	2	0	0	2	16.7

帽反應에 미치는 影響

融解後 洗滌한 凍結精자를 ml 당 10 μ g의 heparin을 첨가한 mTALP液에서 0, 15, 60 및 120분간 培養하였을 때, 精자의 活力과 尖帽反應率은 Table 3과 같다.

精子活力은 融解 직후에는 대체간에 유의한 차이가 없었으나, 120분간 培養기간에서는 KNC 1과 HOL 1, 2 및 3이 HOL 4와 5보다 유의하게 높았다. 精자의 尖帽反應率은 HOL 5가 가장 높았고, KNC 1이 가장 낮았다. 특히 120분간 培養하였을 때, KNC 1이 HOL 1과 2보다 유의하게 낮았다. 대체로 培養時間이 길어짐에 따라서 精子活力은 감소하였으나, 尖帽反應은 증가하였으며, 培養 15분에서 尖帽反應率이 유의하게 증가하였다.

4. Heparin이 처리된 精자가 소 卵胞卵자의 體外發生에 미치는 影響

Heparin(10 μ g/ml)이 첨가된 mTALP液에서 培養된 精자와 體外成熟시킨 소 卵胞卵자를 4일간 공배양하였을 때, 卵자의 體外發生은 Table 4와 같다.

死滅精자로 培養한 卵胞卵자에서는 分割卵이 없었으나(0/35), heparin으로 처리한 新鮮精자로 공배양한 卵자는 16.7~23.7%가 2~8細胞로 分割하였다(27/131).

IV. 考 察

Lee 등(1985)은 精漿에는 glycosaminoglycans (GAGs)가 함유되어 있으며, 이 GAGs가 精자의 尖帽反應을 유발한다고 보고한 바 있다. 또한 Handrow 등(1982)과 Parrish 등(1985)은 GAGs중에서 heparin이 가장 강력한 尖帽反應 誘發因子이며, 10

μ g/ml에서 精자의 尖帽反應이 가장 효율적으로 유발되는데, heparin으로 尖帽反應이 유발된 精자는 體外受精率을 증진시킨다고 보고하였다.

본 實驗에서도 소 精자는 ml 당 10 μ g의 heparin이 첨가된 mTALP液에서 培養되었을 때 尖帽反應이 높게 유발되었으며, heparin으로 처리한 新鮮精자와 公배양한 卵자는 16.7~23.7%가 發生하였다.

한편 實驗에서 사용된 培養液에는 尖帽反應 關聯因子인 Ca(Yanagimachi, 1982)과 BSA(Rogers, 1987)등이 함유되어 있기 때문에, heparin이 尖帽反應에 어느 정도 관여하였는지는 알 수 없다. 그러나 本 實驗에서 heparin으로 처리한 精자가 卵胞卵을 受精하여 發生케 함으로써, heparin은 精자의 受精能獲得에 影響을 미치는 것으로 추론할 수 있다.

한편 體外에서 培養된 精자의 活力과 尖帽反應率은 수소개체간에 차이가 있는데, 이러한 차이를 이용해서 수소의 受胎率을 예견하려는 시도가 있었다. Ax 등(1985)은 新鮮精液의 精子尖帽反應率은 高受胎牛가 低受胎牛보다 높았다고 하였으며, Graham 등(1987)은 凍結精液의 경우 精子尖帽反應率은 低受胎牛가 高受胎牛보다 높는데, 이는 低受胎牛의 精자가 凍結融解過程에서 상대적으로 쉽게 尖帽消失이 유발되고 이어서 老化됨으로서 受精에 참여하는 기회를 잃는 것으로 推論한 바 있다.

본 實驗에서 尖帽反應率은 新鮮精자의 경우 KNC 1이 HOL 1과 2보다 높았으나, 凍結精자의 경우, KNC 1이 HOL 1과 2보다 낮았다. 그러므로 KNC 1의 수태율이 다소 높을 것으로 예상되며, 이러한 결과로 미루어 精자의 尖帽反應은 尖帽膜의 단순한 물리적 파괴로 유발되는 것이 아닌 것으로 사료된다.

V. 摘要

Heparin 이 소 精子的 受精能獲得에 미치는 影響을 규명하기 위하여 精子的 尖帽反應과 體外受精卵의 發生率을 조사하였던 바, 結果는 다음과 같다.

1. 소 新鮮精자를 0, 5, 10 및 25 μ g/ml의 heparin 이 각각 첨가된 mTALP 液에서 15~840분간 培養하였을 때, 精자의 活力은 처리간에 유의차가 없었으나, 精자의 尖帽反應率은 heparin 첨가구가 무첨가구보다 培養 15분 이후부터 유의하게 높았다.
2. 소 新鮮精자를 10 μ g/ml의 heparin 이 첨가된 mTALP 液에서 840분간 培養하였을 때, 精자의 평균 活力은 培養 840분이 培養 0, 15, 60 및 120분보다 유의하게 낮았으나, 精자尖帽反應率은 培養 840분이 培養 0, 15, 60 및 120분보다 유의하게 높았다.
3. 凍結精자를 10 μ g/ml의 heparin 이 첨가된 mTALP 液에서 120분간 培養하였을 때, 培養 15분에서 尖帽反應率이 유의하게 증가하였다.
4. Heparin 으로 처리한 精자를 體外成熟시킨 소 卵胞 卵子和 공배양하였을 때, 16.7~23.7%의 卵子가 2~8細胞로 發生하였다.

(主要語; Heparin, 受精能獲得, 尖帽反應, 體外受精)

VI. 引用文獻

1. Ax, R.L., K. Dickson and R.W. Lenz. 1985. Induction of acrosome reaction by chondroitin sulfates *in vitro* corresponds to nonreturn rates of dairy bulls. J.D.S. 68: 387-390.
2. Babusik, P., J. Pivko and P. Majerciak. 1986. Induction of acrosome reaction in fresh and frozen boar spermatozoa *in vitro*. A.B. A. 54: 402.
3. Bavister, B.D. and R. Yanagimachi. 1977. The effect of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 16: 228-237.
4. Becker, W.C., P.L. Senger, E.P. Aalseth and C.E. Marshall. 1977. Influence of glycerol levels, diluent and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. J. Anim. Sci. 44: 1067-1071.
5. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1984. *In vitro* fertilization of zona-free hamster ova by liposome-treated bovine sperm: A fertility assay. Biol. Reprod. 30(Suppl): 112.
6. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen. Gamete Res. 16: 147-158.
7. Handrow, R.R., R.W. Lenz and R.L. Ax. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 107: 1326-1332.
8. Imai, H., K. Niwa and A. Iritani. 1977. Penetration *in vitro* of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. J. Reprod. Fert. 51: 495-497.
9. Iritani, A. and K. Niwa. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 50: 119-121.
10. Lee, C.N. and R.L. Ax. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. J. D.S. 67: 2006-2009.
11. Lee, C.N., R.R. Handrow, R.W. Lenz and R.L. Ax. 1985. Interaction of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reaction in bovine spermatozoa *in vitro*. Gamete Res. 12: 345-355.
12. Parrish, J.J., J.L. Susko-Parrish and N. L. First. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction

- and fertility of bovine sperm *in vitro*.
Theriogenology. 24 : 537-549.
13. Rogers, B.J. 1978. Mammalian sperm capacitation and fertilization *in vitro*: A critique of methodology. Gamete Res. 1 : 165-223.
 14. Yanagimachi, R. 1982. Requirements of extracellular calcium ion for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in hamster. Gamete Res. 5 : 323-344.