

Dilauroylphosphatidylcholine(PC12)이 소 精子的 受精能獲得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 Dilauroylphosphatidylcholine(PC12) on Bovine Sperm Capacitation

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

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effect of concentration of PC12 and washing of sperm on sperm motility and acrosome reaction, and the effect of sperm incubated in mTALP solution containing PC12 112.5 μ g/ml on development of follicular oocytes matured *in vitro*. The results obtained were as follows.

1. When fresh sperm was once washed and then incubated in mTALP solution containing 0, 75, 112.5 and 225 μ g/ml PC12 for 15minutes, 225 μ g/ml showed significantly lower percent of motile sperm than 0, 75, 112.5 μ g/ml, but 225 μ g/ml showed significantly higher percent of acrosome reacted sperm than 0, 75, 112.5 and 225 μ g/ml.
2. When once or twice washed fresh sperm was cultured in mTALP containing 112.5 μ g/ml PC12 for 15minutes, no-washing showed significantly higher percent of motile sperm than once- and twice-washing showed significantly higher percent of acrosome reacted sperm than no- and once-washing.
3. When sperm was cultured in mTALP containing PC12 112.5 μ g/ml for 15minutes and then was cocultured with bovine follicular oocytes matured *in vitro*, 11.2 to 22.4% of the oocytes were cleaved to more than 2cell stage.

(Key words: PC12, Capacitation, Acrosome reaction, IVF)

I. 緒 論

原形質膜의 構成成分인 磷脂質 특히 lysophosphatidylcholine(PC12)은 精子的 受精能獲得反應을 유발한다고 보고되고 있다(Fleming 과 Yanagimachi, 1981; Ohzu 와 Yanagimachi, 1982; Yanagimachi 와 Suzuki, 1985).

Graham 과 Foote(1987a, b)는 PC12를 超音波로 처리하여 제조한 liposome 이 함유된 mTALP 용액에

서 精자를 培養하였을 때 尖帽反應과 卵子侵入率이 증가하였다고 보고하였다. 精자를 세척하여 精子膜에 결합되어 있는 表面成分을 제거함으로써 受精率을 증진시켰다는 보고도 있다(Fraser, 1984).

본 實驗은 PC12가 소 精자의 尖帽反應과 소 卵胞卵자의 體外發生率을 증진시키는지를 조사하기 위하여 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

(1) 精子用 mTALP 液

삼투압 290~300mOsm, pH 7.4로 조정된 TL stock solution(Parrish 등, 1985) 100ml에 사용직전에 BSA 600mg, pyruvate 11mg, gentamycin 5mg을 첨가하였다.

(2) PC12 liposome

PC12 5.4mg을 15ml의 시험관에 넣고 질소가스를 관류시킨 다음, 12ml의 Ca free mTALP液(Graham 등, 1986)을 첨가한 후 超音波處理하여 용해하였다. PC12를 균일하게 용해한 다음 遠沈分離하여 사용할 때까지 液體窒素에 보관하였다.

(3) 卵子成熟用 培養液

삼투압 290~300mOsm, pH 7.0으로 조정된 TL stock solution(Bavister와 Yanagimachi, 1977) 3.7ml에 fetal calf serum 0.3ml, pyruvate 66 μ g 및 glucose 2.7mg을 사용직전에 첨가한 다음 직경 0.22 μ m의 공극으로 여과하였다.

(4) 卵子受精用 培養液

삼투압 290~300mOsm, pH 7.0으로 조정된 TL stock solution(Bavister와 Yanagimachi, 1977) 5ml에 BSA 30mg과 pyruvate 0.11mg을 사용직전에 첨가한 다음 직경 0.22 μ m의 공극으로 여과하였다.

2. 實驗 方法

實驗 1: PC12가 精子的 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

原精液을 Ca free mTALP液으로 10배 稀釋하여 650g로 5분간 遠沈分離한 다음 上澄液을 제거하여 洗滌한 精자를 0, 75, 112.5 및 225 μ g/ml PC12가 첨가된 mTALP液으로 부유하여 39°C에서 15분간 培養하였다.

實驗 2: 反復洗滌이 精자의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

原精液을 Ca free mTALP液으로 10배 稀釋하여 650g로 5분간 遠沈分離한 다음 上澄液을 제거하고

精자를 mTALP液으로 부유한 후(1차 洗滌), 1차 洗滌한 精자를 동일한 方法으로 反復洗滌하였다(2차 洗滌). 1차 또는 2차 洗滌精자를 112.5 μ g/ml PC12가 첨가된 mTALP溶液에 부유하여 39°C에서 15분간 培養하였다.

實驗 3: PC12로 처리된 精자가 卵胞卵의 發生에 미치는 影響

新鮮精자와 凍結精자를 PC12가 112.5 μ g/ml 첨가된 mTALP液으로 부유하여 39°C에서 15분간 培養하였다. 卵자는 직경이 2~5mm의 卵巢卵胞에서 採卵하여 卵子成熟用 培養液으로 反復洗滌한 다음 5% CO₂, 100% 濕度 및 39°C에서 28시간 培養하였다. 준비된 精자와 卵자를 卵子受精用培養液에 부유하여 5% CO₂, 100% 濕度 및 39°C에서 2.5일 또는 4일간 培養하였다.

III. 結果

1. PC12가 精자의 活力과 尖帽反應에 미치는 影響

PC12가 0, 75, 112.5 및 225 μ g/ml 함유된 mTALP液에서 소 新鮮精자를 15분간 培養하였을 때, 運動精자와 尖帽反應精자의 比率은 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of dilauroylphosphatidylcholine(PC12) on percent of motile sperm and acrosome reacted sperm in bovine fresh semen

PC12 (μ g/ml)	Percentage	
	Motile sperm	Acrosome reacted sperm
0	70.0 ^a	2.5 ^a
75	73.3 ^a	1.7 ^a
112.5	70.0 ^a	6.7 ^a
225	20.0 ^b	24.5 ^b

a, b: significantly different at $p < 0.05$ same column

運動精子比率은 225 μ g/ml PC12가 20.0%로서 0, 75 및 112.5 μ g/ml PC12의 70.0, 73.3 및 70.0%로

다 유의하게 낮았으나, 尖帽反應精子比率은 225 μ g/ml PC12가 24.5%로서 0, 75 및 112.5 μ g/ml PC12의 2.5, 1.7 및 6.7보다 유의하게 높았다.

2. 洗滌頻度가 精子的 活力과 尖帽反應에 미치는 影響
1회 및 2회 洗滌精자를 112.5 μ g/ml의 PC12가 함유된 mTALP 液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精자와 尖帽反應精자의 比率은 Table 2와 같다.

Table 2. Effect of washing on percent of motile sperm and acrosome reacted sperm in bovine fresh semen

Sperm	Percentage	
	Motile sperm	Acrosome reacted sperm
Control	90.0 ^a	0.7 ^a
Once-washed	70.0 ^b	6.7 ^a
Twice-washed	70.7 ^b	32.7 ^b

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

運動精子 比率은 2회 洗滌精자가 70.7%로서 1회 洗滌精자의 70.0%와 유의한 차이가 없었으나, 대조구의 90.0%보다 유의하게 낮았다. 한편 尖帽反應精子 比率은 2회 洗滌精자가 32.7%로서 대조구 및 1회 洗滌精자의 0.6 및 6.7%보다 유의하게 높았다.

3. PC12로 처리된 精자가 소 卵胞卵자의 發生에 미치는 影響

PC12 112.5 μ g/ml 가 첨가된 mTALP 液에서 15분간 培養한 新鮮精자와 凍結精자를 體外에서 成熟시킨 소 卵胞卵자와 培養하였을 때, 卵자의 分割率은 Table 3과 같다.

PC12로 처리된 新鮮精자와 培養된 卵자는 11.1~22.4%가 2細胞이상으로 分割하였으며, 凍結精자의 경우 17.3%가 分割하였다.

IV. 考 察

Freeming 과 Yanagimachi(1981)는 기니픽 精자의 尖帽反應을 증진시키기 위해서 85 μ g/ml의 PC12를 사용했으며, Kim 등(1989)은 토끼 精자의 경우 100 μ g/ml의 LPC를 사용한 바 있다. 본 實驗에서는 225 μ g/ml의 PC12가 소精자의 尖帽反應을 가장 높게 유발하였으나, 精자의 活力을 유의하게 감소시켰다. 2회 세척한 정자를 112.5 μ g/ml의 PC12가 함유된 mTALP 液에서 15분간 배양하였을 때 尖帽反應이 유의하게 높게 유발되었을 뿐만 아니라, 精자의 活力도 높게 유지되었는데, 反復洗滌하여 精子表面成分을 제거하면 尖帽反應과 卵자와의 受精能이 증진되었다는 Fraser(1984)의 보고와 일치한다. 또한 Nishimura 등(1989)도 凍結精자를 反復洗滌하여 精자의 卵자 侵入率을 높인 바 있다. 본 實驗에서 112.5 μ g/ml의 PC12가 첨가된 mTALP 액에서 15분간 배양한 新鮮精子 및 凍結精자와 卵胞卵자를 培養하였을 때, 卵자가 2細胞期 이상으로 發生하였는데, Graham 등(1987)은 PC12로 처리한 精자가 透明帶를 제거한 햄스터 卵자를 侵入하였다고 보고한 바 있다.

Table 3. Effect of PC12-treated sperm on development of bovine follicular oocytes

Sperm	Expl	No. of oocytes	No. of oocytes cleaved	Cleavage rate	Developmental stage (cell)			
					2	3~4	5~8	>8
Fresh	1	23	4	17.4	0	3	1	-
Fresh	2	46	6	13.0	3	2	1	-
Fresh	3	63	7	11.1	4	2	1	-
Fresh	4	49	11	22.4	7	2	0	2
Frozen	4	52	9	17.3	6	1	1	1

결론적으로 PC12는 소 精자의 尖帽反應 뿐만 아니라 受精能獲得을 유발하는 能力을 가지고 있으며, 尖帽反應의 유발은 精子 頭部の 表面成分과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다.

V. 摘要

PC12의 첨가수준과 精자의 洗滌이 精자의 運動性과 尖帽反應에 미치는 影響과, 112.5 μ g/ml의 PC12가 첨가된 mTALP 液에서 新鮮精자와 凍結精자를 15분간 培養하여 體外에서 成熟한 卵胞卵과 培養하였을 때, 卵자의 發生率에 미치는 影響을 검토하였던 바, 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. PC12가 0, 75, 112.5 및 225 μ g/ml 함유한 mTALP 液에서 소 新鮮精자를 15분간 培養하였을 때, 運動精子比率은 225 μ g/ml가 0, 75, 112.5 및 225 μ g/ml보다 유의하게 낮았으나 尖帽反應精子比率은 225 μ g/ml가 0, 75, 112.5 및 225 μ g/ml보다 유의하게 높았다.
2. 1회 및 2회 洗滌精자를 112.5 μ g/ml의 PC12가 함유된 mTALP 液에서 15분간 培養하였을 때, 運動精子比率은 대조구가 1회 및 2회 洗滌精子보다 유의하게 높았으나 尖帽反應精子比率은 2회 洗滌精자가 대조구 및 1회 洗滌精子보다 유의하게 높았다.
3. PC12가 112.5 μ g/ml 함유된 mTALP 液에서 15분간 培養한 精자를 體外에서 成熟시킨 卵胞卵자와 培養하였을 때, 11.2~22.4%가 2細胞 이상으로 發生하였다.
(主要語: PC12, 受精能獲得, 尖帽反應, 體外受精)

VI. 引用文獻

1. 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.
2. Fleming, A.D. and R. Yanagimachi. 1981. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig

spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. Gamete Res. 4: 253-273.

3. Fraser, L.R. 1984. Mouse sperm capacitation *in vitro* involves loss of a surface associated inhibitory component. J. Reprod. Fert. 72: 373-384.
4. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987a. Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen. Gamete Res. 16: 133-145.
5. Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987b. 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.
6. Graham, J.K., R.H. Foote and S.R. Hough. 1987. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome treated sperm from the bull, ram, stallion and boar. Biol. Reprod. 37: 181-188.
7. Graham, J.K., R.H. Foote and J.J. Parrish. 1986. Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs. Biol. Reprod. 35: 413-424.
8. Kim, C.K., K.S. IM, X. Zheng and R.H. Foote. 1989. *In vitro* capacitation and fertilizing ability of ejaculated rabbit sperm treated with lysophosphatidylcholine. Gamete Res. 22: 131-141.
9. Nishimura, K., H. Matsunaga, Y. Fujitani and S. Kitano. 1987. Improvement of fertilizable of frozen spermatozoa in bovine *in vitro* fertilization. 日本 繁殖技術研究紙 9: 107-109.

10. Ohzu, E. and R. Yanagimachi. 1982. Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin. J. Expl. Zool. 224 : 259-263.
11. 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 : 573-549.
12. Yanagimachi, R. and F. Suzuki. 1985. A further study of lysolecithin-mediated acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. Gamete Res. 11 : 29-40.