

X-537A 가 精子洗滌液內 水素이온濃度와 소 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

朴永植·任京淳

서울대학교 農科大學

Effect of X-537A on Hydrogen Ion Concentration in Sperm Washed Solution and Sperm Acrosome Reaction in Bovine

Park, Y.S. and K.S. Im

College of Agriculture, Seoul National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate effects of X-537A on hydrogen ion concentration in sperm washed solution and sperm acrosome reaction. The results obtained were as follows.

1. When bovine sperm was twice washed with SHP solutions of pH 6.8 and 7.4 and again washed with SHP solution containing $4\mu\text{M}$ of X-537A, in case of pH 6.8 the sperm washed with $4\mu\text{M}$ of X-537A showed significantly ($p<0.01$) higher hydrogen ion concentration in sperm washed solution than the sperm washed without X-537A.
2. When the sperm was twice washed with SHP solution and then washed with SHP solution containing $4\mu\text{M}$ of X-537A, sperm acrosome reaction rate was significantly ($p<0.01$) increased from 12min after incubation in the sperm washed without X-537A, but was significantly ($p<0.01$) increased from 8 min after incubation in the sperm washed with $4\mu\text{M}$ of X-537A.
3. When the sperm was twice washed with SHP solution and then washed with SHP solution containing 0, 4 and $40\mu\text{M}$ of X-537A, and then incubated in m-TALP for 120 min, sperm acrosome reaction rate was significantly ($p<0.01$) increased from 15 min after incubation in 0, 4 and $40\mu\text{M}$ of X-537A. However at 60 min incubation $40\mu\text{M}$ of X-537A showed significantly ($p<0.01$) higher sperm acrosome reaction rate than 0 and $4\mu\text{M}$ and at 120 min incubation 4 and $40\mu\text{M}$ of X-537A showed significantly ($p<0.01$) higher acrosome reaction rate than $0\mu\text{M}$ of X-537A.

I. 緒 論

Monovalent cation ionophore인 monensin 과 nigericin 은 기니픽 精子內 Na 이온의 증가 및 증가된 Na 과 Ca 의 교환을 자극하여 尖帽反應을 유발한다고 보고된 바 있으며(Hyne, 1984a, b; Hyne 과 Edward, 1985), divalent cation ionophore A23187은 Ca 과 함께 精子의 尖帽反應을 유발한다고

보고되고 있다(Byrd, 1981; 1982; Fraser, 1982; Green, 1978; Jamil 과 White, 1981; Shams-Borhan 과 Harrison, 1981; Talbot 등, 1976).

한편 1價 및 2價 陽이온을 수송하는 X-537A (lasalocid)는 分子量이 596KD 이고 $\text{Cs} > \text{Rb} = \text{K} > \text{Na} > \text{Li}$; $\text{Ba} > \text{Sr} > \text{Ca} > \text{Mg}$ 의 순으로 이온 선택성을 가지고 있으며, Ca^{2+} 과 Na^+ 에 대하여 동일한 수송능을 가지고 있다. X-537A 는 농도경사에 반해서 Ca 를

소포내로 농축시키며, histamine 수송, catecholamin의 방출 및 vasopressin 과 thyroxine의 방출을 자극한다. 또한 X-537A에 의해 유입된 Ca는 受精子 卵자의 성장체 형성, 핵산합성의 자극 및 가수정을 유발시킨다고 보고되고 있다(Henderson, 1971; Pressman, 1976; Reed, 1976).

본 實驗은 양이온의 수송능을 가지고 있는 X-537A가 精子洗滌液內 水素이온 농도의 변화 및 精子의 尖帽反應에 미치는 影響을 검토하기 위하여 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. X-537A가 精子洗滌液內 水素이온 농도에 미치는 影響

홀스타인 精液을 pH가 6.8과 7.4로 조정된 SHP液(朴과任, 1991)으로 10배 희석하여 1,400rpm으로 5분간 遠心分離한 다음 SHP液으로 精자를 동량이 되도록 부유하여 1,200rpm으로 5분간 遠心分離하였다. 이 洗滌한 精자를 X-537A가 0 및 4 μ M 함유한 SHP液으로 동량이 되게 재부유하여 1,200rpm으로 5분간 遠心分離한 다음 上等液內 水素이온 농도의 변화를 측정하였다(朴과任, 1991). 吸光度差間變化가 陰의 값을 가질 때 上等液에는 水素이온이 증가하였다는 것을 의미한다.

2. X-537A가 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

헤어포드 精液을 SHP液으로 6배 희석하여 1,600rpm으로 5분간 遠心分離한 다음, SHP液으로 精자를 동량이 되도록 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 이 精자를 X-537A가 0과 4 μ M 첨가된 SHP液으로 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 이 精자를 pH 7.4인 mTALP液(朴과任, 1991)으로 동량이

되도록 부유하여 39°C에서 15분간 培養한 다음, 精子의 尖帽反應率을 조사하였다.

3. X-537A의 添加水準이 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

헤어포드 精液을 SHP液으로 6배 희석하여 1,600rpm으로 5분간 遠心分離한 다음, SHP液으로 精자를 동량이 되도록 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 이 精자를 X-537A가 0, 4 및 40 μ M 첨가된 SHP液으로 부유하여 동일한 方法으로 遠心分離하였다. 이 精자를 pH 7.4인 mTALP液으로 동량이 되도록 부유하여 39°C에서 120분간 培養한 다음, 精子의 尖帽反應率을 조사하였다.

III. 結果

1. X-537A가 反復洗滌한 精子洗滌液內 水素이온 농도에 미치는 影響

두번 洗滌한 精자를 X-537A가 첨가된 SHP液으로 洗滌하였을 때, 精子洗滌前液과 精子洗滌後液의 吸光度差間變化($\Delta A_o - \Delta A_t$)는 Table 1과 같다.

pH 6.8인 SHP液으로 精자를 洗滌하였을 때 吸光度差間變化는 X-537A의 濃度 4 μ M이 -0.0077로 0 μ M의 0.0087보다 유의하게($p < 0.01$) 컸으며, 한편 pH 7.4에서는 4 μ M이 -0.0123으로 0 μ M의 -0.0037보다 컸으나 유의차는 없었다.

2. X-537A가 精子의 尖帽反應에 미치는 影響

두번 洗滌한 精자를 X-537A로 처리하여 mTALP液에서 培養하였을 때, 精子의 尖帽反應率은 Table 2와 같다.

X-537A를 처리하지 않은 경우 培養 0, 3, 8, 12

Table 1. Effect of X-537A on light absorbance difference between sperm washing solution and sperm-washed solution

pH of sperm washing solution	Light absorbance difference($\Delta A_o - \Delta A_t$)	
	X-537A	
	0 μ M	4 μ M
6.8	0.0087 ^a	-0.0077 ^b
7.4	-0.0037	-0.0123

a, b: significantly different at $p < 0.01$ in the same row

Table 2. Effect of X-537A on bovine sperm acrosome reaction

X-537A (μ M)	Incubation (minute)				
	0	3	8	12	15
0	21.1 ^b	22.3 ^b	32.2 ^b	52.9 ^a	57.7 ^a
4	20.5 ^c	32.2 ^{bc}	41.7 ^{ab}	59.9 ^{ab}	70.3 ^a

a, b, c : significantly different at $p < 0.01$ in the same row

및 15분후의 精子的 尖帽反應率은 21.1, 22.3, 32.3, 52.9 및 57.7%로 培養 後 12분부터 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였으나, X-537A 를 4 μ M 처리한 경우 培養 0, 3, 6, 9, 12 및 15분 후의 精子的 尖帽反應率은 20.5, 32.2, 41.7, 59.9 및 70.3%로 培養 8분부터 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였다. 15분간 培養한 精자의 尖帽反應率은 X-537A 4 μ M 이 70.3%로 0 μ M 의 57.7%보다 높았으나 유의한 차이는 없었다.

3. X-537A 添加水準이 精자의 尖帽反應에 미치는 影響

두번 洗滌한 精자를 X-537A 가 0, 4 및 40 μ M 첨가된 SHP 液으로 洗滌하여 mTALP 液에서 培養하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 Table 3과 같다.

mTALP 液에서 0, 15, 30, 60 및 120분간 배양하였을 때, 精자의 尖帽反應率은 X-537A 0 μ M 이 22.5, 74.9, 87.0, 89.1 및 89.9%, 4 μ M 이 24.2, 80.0, 83.0, 90.5 및 95.6%, 40 μ M 이 24.2, 82.0, 85.7, 96.4 및 97.4%로, 이들 3처리 모두 培養 15분부터 유의하게 증가하였다. 한편 60분간 培養한 精자의 尖帽反應率은 40 μ M 이 96.4%로 0과 4 μ M 의 89.1과 90.

5%보다 유의하게 ($p < 0.01$) 높았으며, 120분간 培養한 精자의 尖帽反應率은 4와 40 μ M 이 95.6과 97.4%로 0 μ M 의 89.9%보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다.

IV. 考 察

본 實驗에서 X-537A 는 精子洗滌液內 水素이온을 증가시키며 濃度 의존적으로 尖帽反應을 촉진시켰다. Hyne(1984a, b)는 monencin 과 같은 monovalent cation ionophore 가 기니픽 精자의 細胞內 Na 농도를 증가시키며, 나아가서 Ca/Na 의 교환을 자극함으로써 尖帽反應을 유발한다고 보고한 바 있다. 그러므로 X-537A 는 精子洗滌液內 水素이온의 증가와 관련해서 精자로 부터 水素이온의 流出과 수소이온의 流出에 따른 精子內로 Na 이온의 流入을 조장하고, mTALP 液에 노출된 精子에서 Na⁺과 Ca²⁺의 교환을 촉진함으로써 尖帽反應을 유발하는 것으로 사료된다.

60분 이상 培養한 精자의 尖帽反應率은 X-537A 첨가구가 무첨가구보다 유의하게 ($p < 0.01$) 증진되었다. 차과 任(1991)은 SHP 液으로 反復洗滌한 精자를

Table 3. Effect of concentration of X-537A on sperm acrosome reaction during incubation

X-537A (μ M)	Incubation (minute)				
	0	15	30	60	120
	- Percentage -				
0	25.5 ^c	74.9 ^b	87.0 ^a	89.1 ^a y	89.9 ^a Y
4	24.2 ^d	80.0 ^c	83.0 ^c	90.5 ^b y	95.6 ^a X
40	24.2 ^c	82.0 ^b	85.7 ^b	96.4 ^a x	97.4 ^a X

a, b, c, d : significantly different at $p < 0.01$ in the same row

x, y : significantly different at $p < 0.01$ in the same column

X, Y : significantly different at $p < 0.05$ in the same column

mTALP에 배양하면 培養 15분에 尖帽反應이 유발된다고 보고하였다. X-537A를 첨가한 경우 배양 15분에 80% 이상의 精子가 침체반응을 일으킨 것으로 볼 때, 이때까지 受精能獲得을 못하였거나 尖帽反應이 억제된 精子까지도 尖帽反應을 강제 유발시키는 것으로 사료된다.

한편 40 μ M X-537A가 처리된 精子는 대부분이 精子의 頭部와 尾部 또는 尾部の 증편부와 주부간의 분리가 있었다. 이와 같이 과도한 inophore수준은 精子의 손상을 초래하는데, Byrd(1981)는 Ca와 BSA에 노출된 소 精子의 尖帽反應을 유발하기 위해서 1~10 μ M 수준의 A23187을 사용하였다.

V. 摘要

본 實驗에서는 X-537A가 精子洗滌液內 水素이온농도와 소 精子의 尖帽反應에 미치는 影響을 조사하였던바 結果는 다음과 같다.

1. 精子를 pH 6.8과 7.4 SHP液으로 두 번 洗滌한 다음 X-537A가 4 μ M 첨가된 SHP液으로 洗滌하였을 때, 精子洗滌液內 水素이온은 pH 6.8의 경우 X-537A 첨가구가 무첨가구보다 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였다.
2. 精子를 SHP液으로 두 번 洗滌한 다음 X-537A가 4 μ M 첨가된 SHP液으로 洗滌하였을 때, 尖帽反應率은 X-537A 무첨가구에서는 배양 12분부터 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였으나, X-537A 4 μ M 첨가구는 培養 8분부터 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였다.
3. 精子를 SHP液으로 두 번 洗滌한 다음 X-537A가 0, 4 및 40 μ M이 첨가된 SHP液으로 洗滌하여 mTALP液에서 120분간 培養하였을 때, 精子의 尖帽反應率은 3처리 共히 배양 15분부터 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였으며, 培養 60분에서는 精子의 尖帽反應率은 40 μ M이 0과 4 μ M보다 유의하게 ($p < 0.01$) 높았으며, 培養 120분에서는 4와 40 μ M이 0 μ M보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높았다.

VI. 引用文獻

1. Byrd, W. 1981. *In vitro* capacitation and the chemically induced acrosome reaction. J. Expl. Zool. 215: 35-46.
2. Fraser, L.R. 1982. Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J. Androl. 3: 212-219.
3. Green, D.P.L. 1978. The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. J. Cell Sci. 32: 137-151.
4. Henderson, P.J.F. 1971. Ion transport by energy-conserving biological membranes. Ann. Rev. Microbiol. 25: 393-428.
5. Hyne, R.V. 1984a. A bicarbonate and calcium induction of rapid guinea-pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. A.B.A. 53: 416(No. 3130).
6. Hyne, R.V. 1984b. Bicarbonate and calcium-dependent induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. Biol. Reprod. 31: 312-323.
7. Hyne, R.V. and K.P. Edwards. 1985. Influence of 2-deoxy-D-glucose and energy substrates on guinea-pig sperm capacitation and acrosome reaction. J. Reprod. Fert. 73: 59-69.
8. Jamil, K. and I.G. White. 1981. Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. Arch. Androl. 7: 283-292.
9. Pressman, B.G. 1976. Biological applications of ionophores. Ann. Review Biochem. 45: 501-530.
10. Reed, P.W. 1976. Ionophores. Methods in enzymology 8: 435-454.
11. Shams-Borhan, G. and R.A.P. Harrison. 1981. Production, characterization and use of ionophore-induced, calcium-dependent

- acrosome reaction in ram spermatozoa.
Gamete Res. 4 : 407-432.
12. Talbot, P., R.G. Summers, B.L. Hylander, E.M. Keough and L.E. Franklin. 1976. The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187. J. Expl. Zool. 198 : 383-392.
13. 朴永植, 任京淳. 1991. 精子洗滌液의 pH 와 洗滌頻度 및 수소個體가 精子洗滌液內 水素이온濃度와 소 精子的 尖帽反應에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌. 15(1) : 7-13.