

## 소의 항정자항체가 정자의 수정능획득 및 침체반응에 미치는 영향

추영재 · 김제성 · 이병천 · 황우석

서울대학교 수의학과

### Effect of Antisperm Antibodies on Capacitation and Acrosome Reaction of Bovine Spermatozoa

Y. J. Choo, K. S. Kim, B. C. Lee and W. S. Hwang

*Department of Veterinary Medicine, Seoul National University*

#### SUMMARY

The present study was performed to investigate the effects of caffeine and heparin on capacitation and acrosome reaction of bovine spermatozoa, effects of antisperm antibodies on acrosome reaction of bovine spermatozoa. The rates of acrosome reaction in control group, caffeine treated group, heparin treated group, caffeine-heparin complex treated group were 40.3, 54.3, 63.3, 72.3%, respectively and there were significant differences among the groups( $p < 0.01$ ), especially higher in caffeine-heparin complex treated group than the others. The rates of acrosome reaction of antisperm antibodies serum supplemented groups(5, 10 and 20%) were 60.4, 48.9 and 37.1%, respectively and there were significant differences among the groups( $p < 0.01$ ), and the more increases in serum concentrations, the more decreases in acrosome reaction, but this phenomenon was not seen in fetal calf serum supplemented group and heifer serum group. When the serum concentration was 5%, the rates of acrosome reactions were significantly lower in fetal calf serum supplemented group than heifer serum group and in antisperm antibodies serum group( $p < 0.01$ ), and there were no significant differences between heifer serum group and antisperm antibodies serum group( $p < 0.01$ ). When the serum concentrations were 10%, 20%, the rates of acrosome reactions were significantly lower in antisperm antibodies serum supplemented group than in fetal calf serum group and in heifer serum group( $p < 0.01$ ), and there were no significant differences between fetal calf serum group and heifer serum group( $p < 0.01$ ).

These results indicate that caffeine-heparin complex treatment is very effective for inducing acrosome reaction of bovine spermatozoa and that antisperm antibodies block acrosome reaction.

(Key words : acrosome reaction, caffeine, heparin, antisperm antibodies)

#### 서론

정자의 수정능획득과 침체반응은 수정에 필요한 일련의 변화로서(Yanagimachi, 1981; Bedford, 19

70; Austin, 1967), 수정능획득이 된 정자는 원형질막의 구조가 변하고 꼬리의 심한 운동성(hyperactivation)이 나타난다.(Eddy, 1988; Yanagimachi, 1988; Cooper, 1986; Yanagimachi, 1981). 침체반응은 수정능획득이 된 정자의 원형질막과 침체외막

이 융합되어 침체 내부의 효소들이 누출되고 침체 외막이 탈락하게 되는 현상이다.(Yanagimachi, 1981; Piko와 Tyler; 1964; Austin과 Bishop, 1958)

소 정자의 수정능획득 및 침체반응을 체외에서 인공적으로 유도하기 위하여 caffeine(Pard 등, 1989; Niwa와 Ohgoda, 1988; Crister, 1984)과 heparin(Niwa와 Ohgoda, 1988; Parrish 등, 1988; Lu 등, 1987; Xu 등, 1986; Parrish 등, 1985), 생체에서 분리한 암소의 자궁과 난관(Iritani와 Niwa, 1977), 소 난포액(Fukui 등, 1983), 화학조성배지(Iritani 등, 1984), Ca-ionophore(김 등, 1991; Takahashi와 Hanada, 1984; Byrd, 1981), bovine serum albumin(Takahashi와 Hanada, 1984; Fulka 등, 1982; Byrd, 1981) 및 cAMP(Crister, 1984) 등에 의한 연구가 이루어져 왔다. 수정능획득정자의 특징인 hyperactivation은 cAMP의 증가와 밀접하게 관련된다는 보분(Yanagimachi, 1981; Hicks 등, 1972; Garbes 등, 1971a; Casillas와 Hoskins, 1970)과 포유동물 정자의 운동성이 caffeine을 수정능획득배지에 첨가, 배양하였을 때 증가 및 연장되었다고 하였으며 (Scoenfelder 등, 1975; Hicks 등, 1972; Garbes 등, 1971a,b), caffeine이 마우스 정자의 cAMP수준을 증가시켜 정자의 수정능획득을 높여 체외수정율을 향상시켰다고(Fraser 등, 1979)보고하였다. Parrish 등(1985)은 정자가 포함된 수정능획득배지에 heparin을 첨가하여 정자의 높은 침체반응율과 난자투과율을 얻었으며, Niwa와 Ohgoda(1988)는 수정능획득배지에 caffeine과 heparin을 복합처리하여 높은 침체반응률과 수정율을 유도하였다. 또한 정자의 기능을 저해하여 면역학적인 불임을 유발하는 요인인 항정자항체(antisperm antibodies)에 관한 연구가 진행되어 Menge(1980)는 항정자항체가 수정에 있어서 필수적인 정자와 경관점액 통과, 수정능획득, 침체반응, 투명대 부착 등의 기능을 저해하여 불임을 유발한다고 하였다.

Bronson(1990)은 사람에서, 정자 표면에 부착하는 항정자항체가 정자의 활력, 수정능획득, 침체반응, 난구세포와의 부착, 투명대 통과, 경관점액의 통과, 정자발생 등의 다양한 경로를 통하여 정자의 기능은 저해하여 불임을 유발한다고 하였으며, Zo-

uari 등(1992)도 항정자항체의 정자활력과 침체반응의 저해를 보고하였다. 소(Lander 등, 1990), 말(Lee 등, 1993), 개(Rosenthal 등, 1984), 돼지(Feymei 등, 1990)등의 동물에서는 인위적으로 정자를 면역증강제와 함께 피아에 주사하여 항정자항체의 생성을 규명하였다. 그밖에 기니픽(Johnson, 1968), 토끼(O'Rand, 1981; Alexander와 Tung, 1977), 마우스(Mclaren, 1964), 랫트(Bigazzi 등, 1977; Rumke, 1970), 원숭이(Alexander, 1974), 칠면조(Yu와 Burke, 1979)등의 동물에서도 항정자항체가 면역학적 불임의 원인이라는 주장이 제기되었다.

이상에서와 같이 소 정자의 수정능획득 및 침체반응에 영향을 미치는 요인과 체외에서의 수정능획득 유도방법 및 수정방법 개선에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다. 이에 저자는 동결융-해한 소 정자를 이용하여 정자의 체외수정능획득과정에서 배양액 중의 caffeine과 heparin처리가 수정능획득과 침체반응에 미치는 효과와 항정자항체를 포함한 혈청이 소 정자의 침체반응에 미치는 영향을 규명하여 체외수정의 효율을 향상시키기 위하여 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료

본 실험에서 정자는 straw당  $5 \times 10^7$  개의 정자가 들어 있는 유우 동결정액을 사용하였다. 혈청은 서울대학교 수의과대학 계류사에 사육하고 있는 10개월령의 처녀우로부터 얻은 처녀우혈청과 FCS(Gibco Co., USA) 및 항정자항체가 포함되어 있는 것이 확인된 혈청(antisperm antibodies serum; 이하 항정자항체혈청으로 약함)을 제공받아 사용하였다.

### 2. 배양액의 준비

정액의 희석, 세정 및 정자의 체외배양에는 modified sperm-TALP (Parrish 등, 1988; 이하 sperm-TALP로 약함)를 변형시켜 기본배양액으로 사용하였다.(Table 1, 2)

Stock solution은 각각의 시약을 순서대로 넣어 녹인 후 4℃에 냉장보관하였다. 배양액에는 stock

Table 1. Components of stock solution for modified sperm-TALP

Components	/Distilled water (500 mL)
NaCl	3.3300 g
KCl	0.1175 g
NaHCO <sub>3</sub>	1.0520 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0235 g
Sodium lactate(60% syrup)	0.93 mL
Phenol red	0.0050 mL
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0500 g

Table 2. Components of a modified sperm-TALP

Components	/Stock solution(74.25 mL)
HEPES	0.0900 g
Sodium pyruvate	0.0083 g
Penicillin /streptomycin	750 µL

solution 74.25 mL에 HEPES, sodium pyruvate, penicillin /streptomycin을 순서대로 넣어 녹인 후 pH를 7.2~7.4로 조정한 후 0.2 µm의 millipore로 제균한 다음 사용하였다.

### 3. Caffeine과 Heparin의 준비

Caffeine은 stock solution에 10 mM농도로 첨가하여 전술한 방법으로 제균한 후 냉동보관하고 필요시에 용해시켜 사용하였다. Heparin은 stock solution에 10 µg/mL농도로 첨가하여 전술한 방법으로 제균한 후 냉동보관하고 필요시에 용해시켜 사용하였다. Caffeine처리군, heparin처리군 및 caffeine, heparin복합처리군에는 sperm-TALP에 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., USA., 이하 BSA로 약함)를 0.6%농도로 첨가하여 전술한 방법으로 제균하여 사용하였고, FCS, 처녀우혈청, 항정자항체혈청처리군은 BSA 대신 각각의 혈청을 sperm-TALP에 5, 10, 20% 농도로 첨가하여 전술한 방법으로 제균하여 사용하였다.

### 4. 체외배양조건

정자는 각 처리군의 정자부유액을 round bottom tube에 놓고 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 및 습도가 포

화된 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 체외배양하였다.

### 5. 정자의 준비

동결정액은 온탕용해법으로 37°C 수조에서 30초간 담그어 용해한 후 15 mL 원심관에 넣어 37°C 수조에 보관하였다. 동결보호제를 제거하기 위하여 BSA가 첨가된 sperm-TALP를 용해한 정액에 천천히 가한 후 잘 섞어 500 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 과정을 2회 반복하여 동결보호제를 제거한 후 정자수 2.5×10<sup>6</sup> 개/mL가 되도록 sperm-TALP로 재부유시켰다.

### 6. 정자의 처리

대조군은 정자에 sperm-TALP만 부유하고, caffeine처리군은 준비된 정자부유액에 caffeine을 10 mM 농도가 되게 첨가하였다. Heparin처리군은 준비된 정자부유액에 heparin을 10 µg/mL 농도가 되게 첨가하였고, caffeine-heparin 복합처리군은 caffeine을 10 mM농도, heparin을 10 µg/mL 농도가 되게 첨가하였다. FCS첨가군, 처녀우혈청첨가군, 항정자항체혈청첨가군은 정자의 수정능 획득과 침체반응유도목적으로 caffeine(10 mM)과 heparin(10 µg/mL)이 복합된 정자부유액에 BSA 대신 각 혈청을 5, 10, 20%의 농도로 첨가하였다.

### 7. 정자의 염색

정자의 침체반응률과 생존율은 triple stain(Prudence와 Richard, 1981)을 이용하여 확인하였다.

정자부유액은 4시간 배양후 동량의 2% trypan blue용액을 첨가하여 39°C에서 15분간 배양하였다. 배양을 끝낸 정자부유액은 실온에서 600g 으로 5분간 원심시켜 상층액을 제거하였고 phosphate buffered saline(Gibco BRL Co., USA; 이하 PBS로 약함)에 재부유시켰다. 이 과정을 3회 반복하여 정자를 세정하였고, 세정된 정자는 3% glutaraldehyde(Sigma Chemical Co., USA)가 포함된 0.1 M cacodylate buffer(Sigma Chemical Co., USA)로 30분간 고정시킨 후 원심분리를 통해 glutaraldehyde를 제거하고 정자를 Dulbecco's phosphate buffered saline(Gibco, USA; 이하 D-PBS로 약함)에 최종농도 3×10<sup>7</sup> 개/mL로 재부유시켜 slide glass

위에 도달한 후 공기중에서 건조시켰다. 건조된 도말표본은 39℃에서 0.8% Bismark brown Y(Sigma Chemical Co., USA)용액으로 5분간 염색을 한 후 증류수로 세척하고 건조시켰다. 건조된 도말표본은 0.8% rose bengal(Sigma Chemical Co., USA)용액으로 30분간 염색하여 세척하고 농도차를 둔 알코올에 slide glass를 연속해서 담그어 조직내의 수분을 제거한 다음 공기 중에서 건조시켰다. 염색된 slide glass는 xylene에 담근 다음 꺼내어 Permunt로 봉입한 다음 광학현미경( $\times 1,000$ )하에서 표본당 200개씩의 정자를 세어 정자의 생사와 침체반응을 확인하였다. 정자의 생사와 침체반응확인인 triple stain(Prudence와 Richard, 1981)의 방법에 준하여 생존정자는 침체후부가 밝은 갈색으로 염색된 것을, 사멸정자는 trypan blue염색액의 침투로 침체후부가 청색으로 짙게 염색된 것을 기준으로 하였다. 그리고 침체반응이 일어난 정자의 침체부는 흰색 또는 밝은 갈색으로 염색된 것을, 정상 침체를 가진 정자는 침체부가 분홍색으로 염색된 것을 기준으로 하였다.

### 8. 통계학적 분석

모든 실험결과치는 Chi-square test로 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. Caffeine과 heparin이 소 정자의 수정능획득과 침체반응에 미치는 영향

수정능획득배지(sperm-TALP)에 caffeine과 heparin을 첨가하여 정자의 수정능획득과 침체반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조군, caffeine처리군, heparin처리군, caffeine-heparin복합처리군으로 실험을 한 결과, 침체반응률은 대조군 40.3%, caffeine처리군 54.3%, heparin처리군 63.3% 및 caffeine-heparin복합처리군이 72.3%로서 각 군간의 유의성이 인정되었으며( $p < 0.01$ ), caffeine-heparin복합처리군이 가장 높은 침체반응률을 보였다(Fig. 1).

### 2. 항정자항체가 침체반응에 미치는 영향

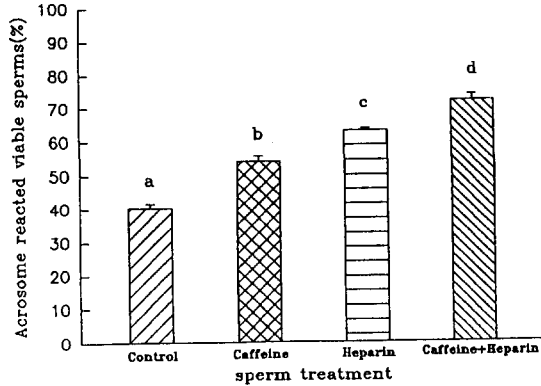


Fig. 1. Effect of caffeine and heparin on sperm capacitation and acrosome reaction. Means with different superscripts are different ( $P < 0.01$ ).

항정자항체가 포함되어 있는 혈청을 수정능획득 배지내에 첨가하여 침체반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 FCS첨가군, 치너우혈청첨가군, 항정자항체 혈청첨가군 등으로 나누어서 실험을 한 결과는 다음과 같다.

1) 각 혈청의 첨가농도가 침체반응에 미치는 영향  
FCS첨가군의 침체반응률은 혈청첨가농도 5%군이 53.8%, 10%군이 74.3% 및 20%군이 60.5%로서 혈청농도가 10%일 때 가장 높은 침체 반응률을 보였으며, 혈청농도별간의 유의성이 인정되었다( $p <$

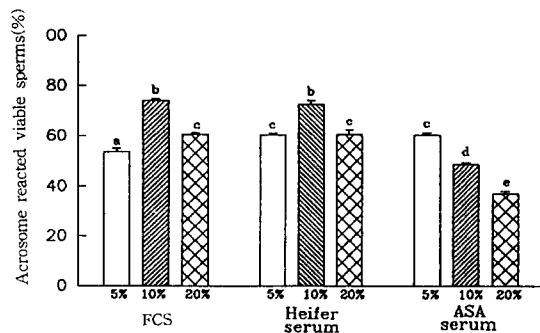


Fig. 2. Effects of antisperm antibodies on acrosome reaction. Means with different superscripts are different ( $p < 0.01$ ).

## 고 찰



Fig. 3. A photomicrograph of bovine sperm using light microscopy. Sperm were stained for viability and acrosome reaction by Triple stain. LAR, live acrosome reacted sperm; DAR, dead acrosome reacted sperm; LAU and live acrosome.

0.01). 처녀우혈청첨가군의 첨체반응률은 혈청첨가농도 10%군(72.5%)이 5%군(60.3%)과 20%군(60.6%)보다 유의성 있게 높았고( $p < 0.01$ ), 항정자항체혈청첨가군의 첨체반응률은 각각 혈청첨가농도 5%군(60.4%), 10%(48.9%), 20%(37.1%)으로 나타나 혈청농도별간의 유의성이 인정되었으며( $p < 0.01$ ), 혈청첨가농도가 증가할수록 첨체반응률은 낮아졌다(Fig. 2).

### 2) 동일농도의 FCS, 처녀우혈청 및 항정자항체혈청이 첨체반응에 미치는 영향

혈청첨가농도 5%일때의 첨체반응률은 FCS첨가군이 53.8%로서 항정자항체혈청첨가군의 60.4%와 처녀우혈청첨가군의 60.3%보다 유의적으로 낮게 나타났고( $p < 0.01$ ), 혈청첨가농도 10%일때의 첨체반응률은 항정자항체혈청첨가군이 48.9%로서 처녀우혈청첨가군의 72.5%, FCS첨가군의 74.3%보다 유의적으로 낮게 나타났으며( $p < 0.01$ ), 혈청첨가농도 20%일때의 첨체반응률은 항정자항체혈청첨가군이 37.1%로서 처녀우혈청첨가군의 60.6%, FCS첨가군의 60.5%보다 유의적으로 낮게 나타났다( $p < 0.01$ )(Fig. 2).

포유동물 정자의 수정능획득 및 첨체반응을 유도하기 위하여 caffeine을 수정능획득배지에 첨가하였을때 높은 수정능획득율과 첨체반응률을 보여(김 등, 1991; Schoenfeld와 Dubin, 1975; Hicks 등, 1972; Garbes, 1971a,b) 본 실험결과와 유사한 양상을 보였으며, 그 이전에 관해 Fraser 등(1979)은 caffeine이 정자의 cAMP수준을 증가시켜 수정능획득율을 향상시킨다고 하였으며, Casillas와 Hoskins(1970)는 caffeine이 cyclic nucleotide phosphodiesterase로 작용하여 정자내의 cAMP수준을 증가시켜 정자의 운동성을 향상시키고 정자원형질막구조의 변화를 가져와 수정능획득과 첨체반응을 유도한다고 주장하였다.

Lee와 Ax(1984)는 암소의 생식도관에 heparin 유사물질인 glycosamino-glycan이 존재하는 것을 확인하였고, Handrow등(1982)은 glycosamino-glycan의 일종인 heparin이 소 정자의 첨체반응을 유도한다고 하였다. Parrish등(1989)은 heparin이 소 정자의 수정능획득과 첨체반응에 미치는 영향을 조사한 결과, 수정능획득배지내에 heparin첨가군이 heparin을 첨가하지 않은 대조군에 비해 높은 첨체반응률을 보여 본 실험결과와 유사한 성적을 보였으며, heparin이 정자에 작용하는 기전에 관해 Parrish 등(1989)은 heparin이 정자세포내의 pH를 알칼리화시켜 정자원형질막구조의 변화를 촉진시켜 정자의 수정능획득 및 첨체반응을 유도한다고 하였다.

Aoyagi 등(1988)은 BSA가 첨가된 수정능획득배지내에서 caffeine단독처리시는 4시간 배양군에서 80%이상의 체외수정율을 나타냈다고 하였으며, Fraser 등(1979)은 caffeine으로 정자를 전배양시킨 후 76.6%의 수정율을 보였다고하여 본 실험에서 caffeine을 처리하여 정자의 수정능획득과 첨체반응을 유도할 때 2시간동안 배양을 한 결과 첨체반응률이 54.3%로 이들의 성적보다 낮았다. Parrish 등(1988)은 BAS가 첨가된 수정능획득배지내에 heparin(10  $\mu$ L/mL)을 첨가하여 반응시간대 별로 첨체반응을 조사한 결과 4시간 배양군이 가장 높은 첨

침체반응률을 보였다고 하여 본 실험에서의 2시간 배양보다는 시간은 연장되었으나 유사한 결과를 제시하였다.

Park 등(1989) 및 Niwa와 Ohgoda(1988)는 소에서 수정능획득배지에 caffeine과 heparin을 복합 처리한 군이 caffeine과 heparin을 각각 단독처리한 군보다 침체반응률을 높게 유도하여 높은 수정율을 보였다고 하여 본 실험결과와 유사한 성적을 나타내었으며, 이것으로 보아 caffeine과 heparin이 상보적인 역할을 하여 소 정자의 수정능획득과 침체반응을 유도하는데 있어서 상협작용을 한 것으로 사료된다.

Romano 등(1993)은 사람에서, 수정능획득배지 내에 항정자항체에 노출된 정자군이 노출되지 않은 대조군보다 유의적으로 높은 침체반응률을 보였다고 하였고, Francavilla 등(1991)은 정자두부 유래 항정자항체가 포함된 혈청과 정자에 활력정자를 노출시킨 실험군과 노출되지 않은 대조군 사이에는 유의적인 차이가 인정되지 않는다고 하였으나, Zo-uari 등(1991)은 사람 활력정자에 항정자항체를 결합시킨 다음 수정능획득유도물질로 침체반응을 유도한 결과 항정자항체가 결합된 정자군이 결합되지 않은 대조군보다 유의적으로 낮은 침체반응률을 보였다고 하였다. 본 실험에서는 항정자항체가 포함되어 있는 혈청을 수정능획득배지내에 첨가하여 침체반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 FCS첨가군, 처녀우혈청첨가군 및 항정자항체혈청첨가군으로 실험을 한 결과, 10%, 20% 항정자항체혈청첨가군이 각각 10%, 20% FCS첨가군과 10%, 20% 처녀우혈청 첨가군보다 유의적으로 낮은 침체반응률을 보여 FCS첨가군과 처녀우혈청첨가군 사이에는 유의적인 차이가 인정되지 않아 Farahani 등(1981)이 정자와의 접촉없이 자연적으로 생체에서 발생하는 항정자항체의 일종인 정자응집항체와 정자의 침체부와 꼬리에 주로 부착하는 면역형광항체는 처녀우에 존재하지만 수태용에는 영향을 미치지 않는다는 보고와는 그 결과가 유사한 양상을 보였으며, 침체반응에 미치는 영향은 FCS첨가군과 처녀우혈청첨가군 사이에는 유의적인 차이가 인정되지 않아 FCS이 처녀우혈청을 대신하여 항정자항체혈청의 대조군으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한

5%, 10%, 20%의 항정자항체혈청첨가군에서는 항정자항체혈청의 농도가 증가할수록 침체반응률은 낮아짐을 보였고 각각의 혈청첨가농도별간에는 유의성이 인정되었는데, 이는 항정자항체혈청첨가농도가 증가할수록 수정능획득배지내의 항정자항체의 수준이 비례적으로 높아지고 한 정자당 침체에 결합하는 항정자항체의 수가 많아져 수정능획득유도물질에 의한 정자원형질막구조의 변화를 막아 침체반응을 방해하는 것이 아닌가 추측되나 상세한 기전을 규명하기 위해서는 심도있는 후속연구가 요망된다.

## 적 요

소 정자의 체외수정능획득 과정에서 배양액 중에 첨가한 caffeine과 heparin의 수정능획득과 침체반응에 미치는 효과와 항정자항체가 포함되어 있는 혈청을 수정능획득배지내에 첨가하여 침체반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 FCS첨가군, 처녀우혈청첨가군, 항정자항체혈청첨가군 등으로 나누어서 실험을 한 결과 다음과 같은 결론에 도달하였다.

1. 침체반응률은 대조군(40.3%), caffeine단독처리군(54.3%), heparin단독처리군(63.25%) 및 caffeine-heparin복합처리군(72.3%)에서 각 군간의 유의성이 인정되었으며( $p < 0.01$ ), 그중 caffeine-heparin복합처리군이 가장 높은 침체반응률을 보였다.
2. 항정자항체혈청첨가군의 침체반응률은 혈청농도 5%군(60.4%), 10%(48.9%), 20%(37.1%)에서 각 혈청 첨가농도별간의 유의성이 인정되었으며( $p < 0.01$ ), 혈청농도가 증가할수록 침체반응률은 낮아졌다.
3. 혈청첨가농도 10%일때의 침체반응률은 항정자항체혈청첨가군(48.9%)이 FCS첨가군(74.3%) 및 처녀우혈청첨가군(72.5%)보다 유의적으로 낮게 나타났으며( $p < 0.01$ ), 혈청첨가농도 20%일때의 침체반응률도 항정자항체혈청첨가군(37.1%)이 FCS첨가군(60.5%) 및 처녀우혈청첨가군(60.6%)보다 유의적으로 낮게 나타났다( $p < 0.01$ ).

이상의 결과로 보아 caffeine-heparin복합처리가

소 정자의 수정능 획득과 침체 반응을 유도하는데 가장 효과적인 것으로 판명되었고, 항정자항체혈청이 정자의 침체 반응을 억제하는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Alexander NJ, Wilson BJ and Patterson GD. 1974. Vasectomy : Immunological effects in Rhesus monkeys and men. *Fertil. Steril.*, 25:149-156.
- Alexander NJ and Tung KSK. 1977. Immunological and morphological effects of vasectomy in the rabbit. *Anat. Rec.*, 188:339-350.
- Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Frudate M, Fukui Y and Ono H. 1988. Effects results of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30:973-985.
- Austin CR and Bishop MWH. 1958. Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. R. Soc. London Soc. B.*, 149:241-248.
- Austin CR. 1960. Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 3:310-311.
- Austin CR. 1967. Capacitation of spermatozoa. *Int. J. Fert.*, 12:25-31.
- Bedford JM. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.*, (suppl. 2) 128:158.
- Bigazzi PE, Kosuda LL and Harnick LL. 1977. Sperm autoantibodies in vasectomized rats of different inbred strains. *Science*, 197:1282-1283.
- Bronson RA. 1990. Immunology. In *Infertility : A Comprehensive Text*. M.M. Seibel(ed.). Norwalk, CT, Appleton-Lange.
- Byrd W. 1981. *In vitro* capacitation and chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 215:35-46.
- Casillas ER and Hoskins DD. 1970. Activation of monkey spermatozoa adenylyl cyclase by thyroxine and triiodothyronine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 40:255-262.
- Cooper TG. 1986. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization*, Springer-Verlag, Berlin.
- Crister ES, Leibfried ML and First NL. 1984. The effect serum extention, cAMP and caffeine on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 21:625-631.
- Eddy EM. 1988. The spermatozoa. In: *Physiology of Reproduction*. Vol. 1(Knobel E and Neil JD, eds.). Raven Press, New York.
- Farahani JK, Tompkins W and Wagner WC. 1981. Reproductive status of cows and incidence of antisperm antibodies. *Theriogenology*, 15:605-612.
- Fayemi OE, Joo HS and Crabo BG. 1990. Effect of immunization with sperm of seminal plasma on spermatozoal quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 23:245-251.
- Francavilla F, Romano R and Santucci R. 1991. Effect fo spermantibodies on acrosome reaction of human sperm used for the hamster egg penetration assay. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 25:77-80.
- Fraser Lynn R. 1979. Accelerated mouse sperm penetration *in vitro* in the presence of caffeine. *J. Reprod. Fert.*, 57:377-384.
- Fukui Y, Fukushina M and Ono H. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology*, 20:651-660.
- Fulka Jr. J, Pavlok A and Fulka J. 1982. *In vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 64:495-499.
- Garbers DL, First NL, Sullivan JJ and Lardy HA. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.*,

- 5:336-339.
- Garbers DL, Lust WD, First NL and Lardy HA. 1971. Effect of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry*, 10:1825-1831.
- Handrow RR, Lenz RW and Ax RL. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote and acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 107:1326-1332.
- Hicks JJ, Mortinez-Manautou J, Pedron N and Rosado A. 1972. Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. *Fertil. Steril.*, 23:172-179.
- Iritani A and Niwa K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 50:199-121.
- Iritani A, Kasai M, Niwa K and Song H. 1984. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 70:487-492.
- Johnson MH. 1968. Characterization of a natural antibody in normal guinea pig serum reacting with homologous spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 16:503-506.
- Lander MF, Hansen PJ and Drost M. 1990. Antisperm antibodies in cows after subcutaneous and intrauterine immunisation. *Vet. Rec.*, 126:461-462.
- Lee CN and Ax RL. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J. Dairy Sci.*, 67:2006-2009.
- Lee C, Nie GJ, Joo HS and Monont H. 1993. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of antisperm antibodies in horse serum. *Theriogenology*, 40:1117-1126.
- Lu KH, Boland MP, Crosby TF and Gordon I. 1987. *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 27:251 (Abstr.).
- McLaren A. 1964. Immunological control of fertility in female mice. *Nature*, 201:582-585.
- Menge AC. 1980. Clinical immunologic infertility : diagnostic measures, incidence of antisperm antibodies, fertility and mechanisms. In: *Immunological aspects of infertility and fertility regulation*. (Dhinds D and Schmacher GFB, eds.). New York, Elsevier North Holland.
- Niwa K and Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30:733-741.
- O'Rand MG. 1981. Inhibition of fertility and sperm-zona binding an antiserum to the rabbit sperm membrane autoantigen RSA-1. *Biol. Reprod.*, 25:621-628.
- Rark CK, Ohgoda O and Niwa K. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fert.*, 86:577-582.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*, 24:537-549.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38:1171-1180.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL and First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin : Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.*, 41:683-699.
- Piko L and Tyler A. 1964. Fine structural studies of sperm penetration in the rat. *Proc. Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Trento*. 2:372-377.



- Romano R, Santucci R, Marrone V and Rrancavilla F. 1993. Effect of ionophore challenge on hamster egg penetration and acrosome reaction of antibody-coated human sperm. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 29:56-61.
- Rosenthal RC, Meyers WL and Burke TJ. 1984. Detection of canine antisperm antibodies by indirect immunofluorescence and gelatin agglutination. *Am. J. Vet. Res.*, 45:370-374.
- Rumke P and Titas M. 1970. Spermagglutination formation in male rats by subcutaneously injected syngeneic epididymal spermatozoa and by vasoligation or vasectomy. *J. Reprod. Fert.*, 21:69-79.
- Schoenfeld CY, Amelar RD and Dubin L. 1975. Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. *Fertil. Steril.*, 26:158-161.
- Takahashi Y and Hanada A. 1984. Penetration of zona-free hamster eggs *in vitro* by ejaculated bull spermatozoa after treatment with ionophore A23187. *Jap. J. Reprod.*, 30:30-37.
- Xu KP, Greve T, Smith S, Leihman P, Callesen H. and Hyttel P. 1986. Parthenogenetic activation of cattle oocytes matured *in vitro* and cultured in rabbit oviducts. *Therionology*, 25:218(Abstr.).
- Yanagimachi R. 1989. Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development in vitro* (Mastroianni L and Biggers JD, eds), Plenum Press, New York. pp.81-182.
- Yanagimachi R. 1988. Mammalian fertilization. In: *Physiology of Reproduction*. Vol. 1. (Knobil E and Neil JD, eds). Raven Press, New York, pp.135-185.
- Zouari R, De Almeida M and Feneux D. 1992. Effect of sperm-associated antibodies on the dynamics of sperm movement and on the acrosome reaction of human spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.*, 22:59-72.
- 김계성, 황우석, 조충호. 1991. 배양액중의 Calcium 이온농도 및 Caffeine과 Ca-ionophore A23187 처리가 소 정자의 수정능획득에 미치는 영향, *대한수의학회지*, 31:123-130.