

Progesterone과 BSA를 이용한 동결정액내 정자의 선별

박 영 식
경북대학교 농과대학

Sperm Selection in Frozen-semen Using Progesterone and BSA

Y. S. Park

College of Agriculture, Kyungbuk National University

SUMMARY

The aim of this study is to elucidate sperm chemotaxis and to set up the optimal condition for selection of motile and capacitated sperm from bovine frozen-semen. Thus, the effects of semen-washing after thawing, concentrations of progesterone (P4) and bovine serum albumin (BSA), and sperm-washing frequency on sperm selection were examined. For evaluating their effects, number, viability and acrosome reaction of sperm swim-up separated from semen, which were incubated for 30 minutes at 36°C in the M2 solution containing P4 and BSA, were investigated.

For frozen-semen just after thawing, sperm recovery and viability were not significantly different between P4-treated and -untreated semen. However, washing frozen-semen decreased the number of sperm and increased the viability of sperm that were recovered from semen treated with P4.

Progesterone affected the recovery rate, the viability and the acrosome-reaction rate of sperm recovered from washed frozen-semen. Especially, number of motile and capacitated sperm were highest in semen treated with 50 μ g/ml among 0, 20, 50 and 100 μ g/ml of P4 concentrations.

BSA affected the recovery rate and the viability of sperm recovered from washed frozen-semen that were treated with 50 μ g/ml of P4. Especially, the percentage of viable sperm were highest in semen treated with 4mg/ml among 0, 2, 4, and 6mg/ml of BSA concentrations.

Repeatedly sperm-washing did not affect the recovery rate and the viability of sperm recovered from washed frozen-semen that were treated with 50 μ g/ml of P4 and 4mg/ml of BSA.

In conclusion, using progesterone and BSA could efficiently make the selection of motile and capacitated sperm from washed frozen-semen.

(Key words: sperm, selection, washing, progesterone, bovine serum albumin)

서 론

정액으로부터 정장을 제거하거나 정자를 농축하기 위하여 다양한 정자의 분리(separation) 방법이 개발되어 왔다. 최근 체외수정기술의 발달과 더불어

어 swim-up separation에 의한 운동정자의 분리 (Kuzan 등, 1987; Parrish와 Foote, 1987)가 널리 이용되고 있으나, swim-up separation에 의해 분리된 정자를 이용하여 난자와 체외수정을 유도하는 경우, 공배양되는 정자의 수가 많으면 다정자침입의 빈도가 증가하여 발생율이 저하되고 정자의 수가 적으면 수정율이 감소하는 경향이 있다. 따라서 수정율과 발생율을 높이기 위해서는 운동능뿐만 아니라 수정능력을 가진 정자를 선별(selection)하여 체외수정에 이용하여야 한다.

정자는 화학물질에 접근하거나 도망가려는 특별한 운동성을 가지고 있다. Gnassi 등(1985)이 캅타이드 N-formyl-Met-Leu-Phe가 인간 정자를 유인하여 운동능에 영향을 미친다고 보고한 이래, 화학적 주성(chemotaxis)을 이용하여 정자를 선별하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

정자의 운동성에 영향을 미치는 다양한 생리활성 물질중에서 인간난포액내 지분자량의 소수성 물질 (Ralt 등, 1994) 또는 난포액으로부터 추출한 지질성 물질 (Vadillo-Ortega 등, 1994; Villanueva 등, 1995)의 정자유인효과가 보고된 바 있다. 또한 난포액내 스테로이드에 대한 정자의 주화성 실험 (Sliwa, 1995; Villanueva 등, 1995)에서 progesterone (P4)만이 농도 의존적으로 정자를 유인하였다고 보고되었다.

이러한 정자의 주화성에 관한 연구와 달리, Makler 등(1992)은 난포액에는 인간정자를 유인하는 효과가 없으며, Makler 등(1995)도 이미 알려진 정자유인물질이나 배척물질에 대해 인간정자가 반응하지 않았다고 보고하였다.

한편 세포배양액에 첨가되는 bovine serum albumin(BSA)은 세척후 저하된 정자의 활력을 회복시키며 (Lidholmer와 Eliasson, 1974), 정자의 수정능 획득과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Neill과 Olds-Clarke, 1987). 또한 정자의 세척은 운동특성과 투명대제거 햄스터난자내 침투성을 변화시키는 것으로 보고된 바 있다 (Aitken, 1990).

이상에서 언급한 바와 같이 논쟁이 되고 있는 정자 주화성의 유무를 밝히고, 나아가서 효율적인 정자의 선별조건을 확립코져 본 연구를 실시하였다. 이를 위하여 정자의 화학적 유인물질로 알려진 pro-

gesterone(P4)을 이용, 동결정액의 용해후 세척, P4와 BSA의 처리농도, 정자의 세척빈도가 회수된 정자의 수와 생존성 및 수정능획득에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배양액

정자의 분리를 위하여 사용되는 M2 용액은 94.66mM NaCl, 4.78mM KCl, 1.71mM CaCl₂, 1.19mM KH₂PO₄, 1.19mM MgSO₄ · 7H₂O, 4.15mM NaHCO₃, 20.85mM HEPES, 23.28mM Na-lactate, 0.33mM Na-pyruvate 및 5.56mM glucose를 첨가하여 제조되었다. 준비한 M2 용액에 BSA를 실험조건에 따라 적량 첨가하여 BSA-M2용액을 제조하였다. 또한 progesterone(P4)은 ethanol에 용해한 다음 실험조건에 따라 적량 첨가되었으며, 이때 사용되는 ethanol의 농도는 정자배양용액의 1%가 되도록 하였다.

수정능획득한 정자에서 침모반응을 유도하기 위해 5 μM의 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Cohen-Dayag 등, 1995)를 정자배양용액에 첨가하였다. 이때 PMA는 DMSO에 용해하였으며, 정자배양용액에 첨가되는 DMSO의 농도는 0.5%가 되도록 하였다.

2. 실험방법

실험 1: 용해후 세척의 효과

동결정액(축협중앙회 유우개량사업소)을 용해하기 전에 M2용액에 4mg/ml의 BSA를 첨가하여 BSA-M2(BM)용액을 준비하였다. 또한 BM 1ml에 10 μl의 ethanol만 첨가한 용액(EBM)과 BM 1ml에 P4의 종말농도가 28 μg/ml가 되도록 P4를 함유한 10 μl의 ethanol을 첨가한 용액(PEBM)을 각각 준비하였다.

용해직후의 동결정액으로부터 정자를 분리하기 위하여, 동결정액이 들어있는 0.5ml 스트로를 액체 질소로부터 회수하여 흐르는 수도물에 1분간 용해하였다. 미리 준비한 BM, EBM 및 PEBM 용액이 들어있는 원심분리관 저면에 용해 직후의 동결정액

100 μ l를 조용히 침적하여 분리층을 형성한 다음 원심분리관을 36 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치하여 배양하였다. 배양 후 상등액 0.5ml를 회수하여 정자의 수와 생존성을 조사하였다.

한편, 용해후 세척한 동결정액으로부터 정자를 분리하기 위하여, 용해한 동결정액을 원심분리관에 넣고 2ml의 BM용액을 첨가하여 정액을 5배 희석하였다. 희석한 동결정액을 1500rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 정자펠렛에 60 μ l의 BM용액을 첨가하여 정자를 재부유하였다. 한편 미리 준비한 BM, EBM 및 PEBM용액이 각각 1ml씩 들어있는 원심분리관 저면에 세척후 재부유한 동결정액 20 μ l를 침적하고 동일한 방법으로 배양한 다음 상등액 0.5ml를 회수하여 정자의 수와 생존성을 조사하였다.

실험 2: Progesterone의 효과

용해한 동결정액을 원심분리관에 넣고 BSA가 4mg/ml 첨가된 M2용액(BM) 2ml를 첨가하여 정액을 5배 희석하였다. 희석한 정액을 1,500rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 정자펠렛에 80 μ l의 BM용액을 첨가하여 정자를 재부유하였다. 한편 P4가 각각 0, 20, 50 및 100 μ g 첨가된 1ml의 BM용액이 들어있는 원심분리관 저면에 세척한 동결정액 20 μ l를 조용히 침적하여 분리층을 형성하였다. 준비된 원심분리관을 36 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음 상등액 0.5ml를 회수하여 정자의 수와 생존성을 조사하였다. 한편 배양된 정자의 수정능 획득 정도를 평가하기 위해서 배양후 회수한 용액에 5 μ M의 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 첨가하여 35 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음 정자의 침모반응율을 조사하였다.

실험 3: BSA의 효과

용해한 동결정액을 원심분리관에 넣고 BSA가 함유되어 있지 않은 2ml의 M2용액을 첨가하여 정액을 5배 희석하였다. 희석한 정액을 1,500rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 정자펠렛에 80 μ l의 M2용액을 첨가하여 정자를 재부유하였다. 한편, 50 μ g의 P4를 함유한 1ml의 M2용액에 BSA를 0, 2, 4, 및 6mg/ml 첨가하여 준비한 각각

의 원심분리관 저면에 세척한 동결정액 20 μ l를 침적하고 36 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 다음 상등액 0.5ml를 회수하여 정자의 수와 생존성을 조사하였다.

실험 4: 정자의 반복세척 효과

용해한 동결정액을 4mg/ml의 BSA가 첨가된 2ml의 M2용액으로 5배 희석한 다음 3개의 원심분리관에 각각 0.8ml씩 분주하였다. 희석한 정액을 1,500rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하였다. 한 개의 원심분리관에 있는 정자펠렛에 20 μ l의 BM용액을 첨가하고 정자를 재부유한 다음 회수한 동결정액 20 μ l를 50 μ g의 P4가 첨가된 1ml의 BM용액에 침적하고 36 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 한편 나머지 두 개의 원심분리관에 들어 있는 정자펠렛에 BM용액 0.79ml를 첨가하여 재부유한 다음 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 한 개의 원심분리관에 있는 정자펠렛에 20 μ l의 BM용액을 첨가하여 재부유한 다음 회수한 동결정액 20 μ l를 50 μ g의 P4가 첨가된 1ml의 BSA-M2용액에 침적하고 동일한 방법으로 배양하였다. 한편 나머지 한 개의 원심분리관에 있는 정자펠렛에 BM용액 0.79ml를 첨가하여 재부유한 다음 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 남은 한 개의 원심분리관에 있는 정자펠렛에 20 μ l의 BM용액을 첨가하여 재부유한 다음 회수한 동결정액 20 μ l를 50 μ g의 P4가 첨가된 1ml의 BSA-M2용액에 침적하고 동일한 방법으로 배양하였다.

3. 통계처리

언어진 결과는 분산분석(ANOVA)에 의하여 통계처리하였으며, Dunkun 다중검정에 따라 처리간 차이의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 동결정액의 처리가 정자의 분리에 미치는 영향
용해후의 동결정액과 용해후 희석, 세척한 동결정액을 P4와 ethanol이 첨가된 BM용액에 침적하고 배양하여 정자의 swim-up separation을 유도한 다음 회수한 용액내 정자의 회수율과 생존율은 Table 1과 같다.

Table 1. Number and viability of sperm recovered from thawed and washed frozen-semen after swim up separation

Solution*	Thawed frozen-semen			Washed frozen-semen		
	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Recovery rate (%)#	Percentage of viable sperm (%)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Recovery rate (%)#	Percentage of viable sperm (%)
BM	83.1 \pm 20.4	—	86.8 \pm 2.1 ^{ns}	71.2 \pm 15.0	—	83.3 \pm 2.0 ^d
EBM	83.9 \pm 19.7	101.1 \pm 5.0 ^{ns}	83.4 \pm 3.3	72.2 \pm 16.9	107.6 \pm 3.8 ^a	84.2 \pm 2.5 ^d
PEBM	80.1 \pm 18.5	98.4 \pm 3.4	87.8 \pm 3.0	47.8 \pm 10.9	60.2 \pm 3.0 ^b	90.8 \pm 1.6 ^c

*: BM (BSA-M2), EBM (Ethanol-BSA-M2), PEBM (Progesterone-Ethanol-BSA M2)

#: No. of recovered-sperm in a treatment / No. of recovered-sperm in control

^{ns}: not significantly different ($p > 0.05$) in the same column

^{a,b}: significantly different at $p < 0.01$ in the same column

^{c,d}: significantly different at $p < 0.05$ in the same column

융해 직후 동결정액으로부터 정자를 분리하는 경우, BM(대조구), EBM 및 PEBM(처리구)에서 회수한 정자의 수는 83.1 \pm 20.4, 83.9 \pm 19.7 및 80.1 \pm 18.5($\times 10^4$)였으며, BM대조구를 기준으로 한 EBM처리구와 PEBM처리구의 정자회수율은 101.1 \pm 5.0과 98.4 \pm 3.4%로서 처리간에 유의한 차이가 없었다. 또한 BM대조구, EBM처리구 및 PEBM처리구의 정자생존율은 86.8 \pm 2.1, 83.4 \pm 3.3 및 87.8 \pm 3.0%로서 이 들간에 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

융해 후 세척한 동결정액에서 정자를 분리하는 경우, BM(대조구), EBM 및 PEBM(처리구)에서 회수한 정자의 수는 71.2 \pm 15.0, 72.2 \pm 16.9 및 47.8 \pm 10.9($\times 10^4$)였으며, BM대조구를 기준으로 한 EBM처리구와 PEBM처리구의 정자회수율은 107.6 \pm 3.8와 60.2 \pm 3.0%으로서 EBM처리구에 비해 PEBM처리구에서 유의하게 낮았다($p < 0.01$). 한

편 BM대조구, EBM처리구 및 PEBM처리구의 정자생존율은 83.3 \pm 2.0, 84.2 \pm 2.5 및 90.8 \pm 1.6%로서, EBM처리구는 BM대조구와 유의한 차이가 없었으나, PEBM처리구는 BM대조구와 EBM처리구보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

2. P4의 농도가 정자의 분리에 미치는 영향

P4를 0, 20, 50 및 100 μ g 함유한 1ml의 BM용액에 세척한 동결정액 20 μ l를 침적하고 배양하여 정자의 swim-up separation을 유도한 다음 회수한 용액 내 정자의 회수율과 생존율 및 PMA처리 후 정자의 침모반응율은 Table 2와 같다.

세척한 동결정액으로부터 정자를 분리하기 위하여 사용되는 P4의 농도를 각각 0(대조구), 20, 50 및 100 μ g/ml(처리구)였을 때, 회수된 정자의 수는 72.9 \pm 9.5, 57.5 \pm 9.3, 69.2 \pm 10.9 및 66.8 \pm 14.8($\times 10^4$)였으며, 대조구를 기준으로 산출한 정자의 회

Table 2. Effect of P4 concentrations on sperm recovery, viability and capacitation of washed frozen-semen

Concentrations of P4(μ g/ml)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Recovery rate# (%)	Percentage of viable sperm (%)	Acrosome reaction rate (%)
0	72.9 \pm 9.5	—	84.0 \pm 1.2 ^d	63.5 \pm 3.8 ^e
20	57.5 \pm 9.3	70.8 \pm 3.9 ^b	82.8 \pm 2.0 ^d	80.0 \pm 0.8 ^{cd}
50	69.2 \pm 10.9	94.5 \pm 5.2 ^a	90.0 \pm 0.7 ^c	84.4 \pm 2.4 ^c
100	66.8 \pm 14.8	89.2 \pm 8.1 ^{ab}	91.0 \pm 2.2 ^c	72.9 \pm 3.1 ^d

#: No. of recovered sperm in a treatment / No. of recovered-sperm in control

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

^{c,d,e}: significantly different at $p < 0.01$ in the same column

수율은 20, 50 및 100 μ g/ml 처리구가 각각 70.8 \pm 3.9, 94.5 \pm 5.2 및 89.2 \pm 8.1%로서 50 μ g/ml 처리구가 100 μ g/ml 처리구와 유의한 차이는 없었으나 20 μ g/ml 처리구에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$). 회수된 정자의 생존율은 대조구, 20, 50 및 100 μ g/ml 처리구가 각각 84.0 \pm 1.2, 82.8 \pm 2.0, 90.0 \pm 0.7 및 91.0 \pm 2.2%로서 50 μ g/ml 처리구가 100 μ g/ml 처리구와 유의한 차이가 없었으나, 대조구와 20 μ g/ml 처리구에 비해 유의하게 높았다($p < 0.01$). 한편 회수된 정자의 수정능 획득정자 비율을 측정하기 위해 조사한 침모반응율은 각각 63.5 \pm 3.8, 80.0 \pm 0.8, 84.4 \pm 2.4 및 72.9 \pm 3.1%로서, P4 처리구는 대조구에 비하여 유의하게 높은 침모반응율을 나타내었으며, 특히 50 μ g/ml P4 처리구가 대조구 및 다른 P4 처리구에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.01$).

3. BSA가 정자의 분리에 미치는 영향

BSA를 각각 0, 2, 4, 및 6mg/ml 첨가한 P4(50 μ g/ml) 함유 M2용액에 세척한 동결정액을 침적하고 배양하여 정자의 swim-up separation을 유도한 다음 회수한 용액내 정자의 수와 생존율은 Table 3과 같다.

세척한 동결정액로부터 정자를 분리하기 위하여 사용되는 BSA의 농도가 0(대조구), 2, 4 및 6mg/ml(처리구)였을 때, 회수된 정자의 수는 각각 5.3 \pm 0.5, 60.2 \pm 4.2, 57.1 \pm 10.0 및 56.2 \pm 6.1($\times 10^4$)로서 대조구에 비해 BSA처리구에서 유의하게 높았으며($p < 0.01$), BSA처리구간에 유의한 차이는 없었다. 회수된 정자의 생존율은 54.2 \pm 3.3, 88.7 \pm 0.9, 92.4 \pm 1.6 및 86.9 \pm 1.5%로서, 모든 BSA처

Table 3. Effect of BSA concentrations on sperm recovery and viability

Concentrations of BSA (mg /ml)	No. of recovered sperm($\times 10^4$)	Percentage of viable sperm (%)
0	5.3 \pm 0.5 ^b	54.2 \pm 3.3 ^c
2	60.2 \pm 4.2 ^a	88.7 \pm 0.9 ^{ab}
4	57.1 \pm 10.0 ^a	92.4 \pm 1.6 ^a
6	56.2 \pm 6.1 ^a	86.9 \pm 1.5 ^b

^{a,b,c}; significantly different at $p < 0.01$ in the same column

리구가 대조구에 비해 유의하게 높았으며, 4mg/ml 처리구는 2mg/ml 처리구와 유의한 차이가 없었으나 6mg/ml 처리구에 비해 유의하게 높았다($p < 0.01$).

4. 반복세척이 정자의 분리에 미치는 영향

용해한 동결정액을 각각 M2용액으로 1, 2 및 3회 세척한 다음, P4 50 μ g/ml와 BSA 4mg/ml가 함유된 M2용액에 침적하고 배양하여 정자의 swim-up separation을 유도한 다음 회수한 용액내 정자의 수와 생존율은 Table 4와 같다.

정자를 once(1회), twice(2회) 및 thrice(3회) 세척하고 P4 함유 BM용액에서 정자를 분리하였을 때, 회수된 정자의 수는 각각 38.5 \pm 13.3, 24.9 \pm 9.8 및 32.2 \pm 9.1($\times 10^4$)로서 반복세척처리간에 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$). 또한 회수된 정자의 생존율도 90.8 \pm 1.4, 92.7 \pm 0.4 및 91.9 \pm 0.6%로서 처리간에 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$).

고 찰

용해직후의 동결정액으로부터 분리한 정자의 회수율과 생존율은 P4 처리구와 대조구간에 유의한 차이가 없었으나, 용해후 세척한 동결정액으로부터의 정자의 생존율은 P4 처리구가 높았고 회수율은 P4 처리구가 낮았다. 즉, 정자를 분리하기 전에 동결정액을 세척하면 P4에 대한 정자의 반응성이 달라지는 것으로 추론되며, 따라서 P4를 이용하여 정자를 분리하는 경우 분리의 효율성을 높이기 위해서는 용해후 동결정액의 세척이 요구된다. 한편 정자의

Table 4. Effect of sperm-washing frequency on sperm recovery and viability

Sperm-washing frequency	No. of recovered sperm($\times 10^4$)	Percentage of viable sperm (%)
Once	38.5 \pm 13.3 ^{ns}	90.8 \pm 1.4 ^{ns}
Twice	24.9 \pm 9.8	92.7 \pm 0.4
Thrice	32.2 \pm 9.1	91.9 \pm 0.6

^{ns}; not significantly different ($p > 0.05$) in the same column

회수율과 관련하여 Ralt 등(1994)은 어떤 주어진 시간에 정자군 중 일부만이 화학적 반응성을 나타내기 때문에 난포액으로 이동하는 정자의 수가 적다고 하였으며, Cohen-Dayag 등(1994)도 정자군에서 오직 2~12%만이 주어진 시간에 주화적 반응을 나타낸다고 보고한 바 있다. 이러한 결과에 비추어 본 실험에서 정자의 회수율이 낮은 것은 P4에 반응하는 정자의 수가 적었기 때문인 것으로 사료된다. 한편 P4를 용해하기 위해 사용된 ethanol은 정자의 회수율이나 생존율에 영향을 미치지 않았다. 따라서 세척한 동결정액으로부터 정자 이동성의 변화는 P4에 반응해서 유발된 것으로 사료된다.

동결성액을 세척하여 P4를 처리한 다음 조사한 정자의 회수율은 20~100 μ g/ml의 P4처리에서 낮았으나 정자의 생존율은 높았다. P4처리간 비교에서는 정자의 회수율과 생존율은 50 μ g/ml처리에서 가장 높았다. 정자의 분리에 사용되는 P4의 농도와 관련하여 Ralt 등(1994)은 정자의 유인반응을 최대로 유발하기 위한 P4의 농도가 10 μ g/ml 이상이라고 하였으며, Sliwa(1995)는 1~100 μ g/ml P4수준에서 이동하는 정자의 수가 증가하였다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험과 같은 조건에서는 50 μ g/ml P4 농도에서 효율적으로 정자를 분리할 수 있을 것으로 사료된다.

분리된 정자의 수정능획득 여부를 판정하기 위해서 PMA를 처리한 다음 조사한 침모반응율은 대조구에 비해 P4처리구에 높았으며, P4처리간 비교에서 정자의 회수율과 생존율이 가장 높았던 50 μ g/ml처리에서 역시 가장 높았다. 즉 P4를 처리한 정액에서 수정능획득한 정자의 비율이 증가하였다. Cohen-Dayag 등(1995)은 정자의 주화적 반응은 수정능획득반응의 한 현상이며, 50분에서 4시간이내의 수정능획득 상태가 끝나면 이 반응도 소실된다고 보고하였다. 또한 P4가 수정능획득반응에서 비롯된 정자내 칼슘유입을 유발한다는 보고(Blackmore 등, 1990)를 고려할 때, P4는 정자의 수정능획득반응을 유발하면서 주화성에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 따라서 swim-up separation에 의한 정자의 분리에 P4를 이용하면 수정능획득한 운동정자를 선별할 수 있을 것으로 사료된다.

BSA(2.6mg/ml)는 P4를 이용한 정자의 선별에

서 정자의 회수율과 생존율을 증가시켰으며, 특히 4mg/ml의 BSA처리에서 생존정자의 회수율이 높았다. 정자의 운동성과 관련하여 Lidholmer와 Eliasson(1974)은 일부만이 세척에 의해 저하된 정자의 활력을 회복시킨다고 하였으며, Neill과 Olds Clarke(1987)은 BSA가 생쥐정자의 수정능획득을 유발과 관련이 있으며 과민운동과 무관하다고 보고한 바 있다. 따라서 BSA를 함유한 용액에서 정자를 분리하면 정자의 활력이 증진되고 수정능획득반응이 유발되기 때문에 정자의 선별을 효율적으로 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

정자의 반복세척이 정자의 회수율이나 회수된 정자의 생존성에 영향을 미치지 않았다. Aitken(1990)은 정장을 제거하기 위하여 정자를 세척하고 배양하였을 때 정자의 운동특성이 변하고 투명내제기핵스터난자내 침투성이 변하였다고 보고한 바 있다. 그러나 정자를 반복세척하였을 때 일어나는 운동성의 변화에 관한 보고는 거의 없다. 본 실험의 결과에 비추어 1회 세척시 예상되는 정자에서의 변화가 2회 및 3회 세척에서 더 진행되지 않았으며 이로 인하여 정자의 운동성에 변화가 없었던 것으로 추론된다. 따라서 동결정액을 이용 정자를 분리하는 경우, 용해후 1회 세척한 정액으로부터 정자를 효율적으로 선별할 수 있을 것으로 사료된다.

한편, Makler 등(1995)은 제외수정에 사용할 난자를 회수할 때 얻은 난포액을 원심분리하여 정자의 주화성을 조사하였는데, 본 실험에 비추어 난자를 회수할 때 얻어진 난포액내 정자유인능을 가진 progesterone의 농도가 높지 않은 난포액을 사용한 경우 정자의 유인반응을 기대하기 어렵다. 또한 이들은 사출한 신선정자를 사용하여 20%의 체대혈청을 함유한 Ham's F-10으로 희석한 다음 세척하고 20분간 배양하여 분리된 정자의 농도와 운동성을 평가하였다. 이와 같은 배양조건에서는 총정자군내 수정능획득한 정자군의 비율이 적을 것으로 추측되며, 따라서 수정능획득한 정자만이 주화능을 나타낸다는 연구결과들을 고려할 때, 화학적 유인물질에 대한 정자의 반응성이 낮아 정자의 주화성에 대한 부정적 견해를 보고한 것으로 추론된다.

적 요

본 연구는 소 동결정액을 이용 정자의 주화성을 규명하고, 수정능획득 정자의 선별조건을 확립하기 위하여 실시하였다. 동결정액의 용해후 세척, progesterone(P4)과 bovine serum albumin(BSA)의 처리농도 및 정자 세척빈도가 정자의 선별에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 동결정액을 P4와 BSA가 첨가된 M2용액에서 36°C 30분간 배양하여 swim-up separation을 유도한 다음 회수한 정자의 수, 생존성 및 침모반응을 조사하였다.

1. 용해직후의 동결정액을 P4로 처리하여 회수한 정자의 수와 생존율은 대조구와 차이가 없었으나, 용해후 세척하여 P4로 처리한 동결정액으로부터의 정자 회수율은 감소하였고 생존율은 증가하였다.
2. P4는 세척한 동결정액으로부터 정자의 회수율, 회수된 정자의 생존율, 회수된 정자의 침모반응에 영향을 미치는데, P4 처리농도 0, 20, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 중 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P4처리에서 수정능획득한 운동정자의 비율이 가장 높았다.
3. BSA는 P4 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 세척-동결정액으로부터의 정자 회수율과 생존율에 영향을 미치는데, BSA 처리농도 0, 2, 4, 및 6 mg/ml 중 4 mg/ml BSA처리에서 생존정자의 회수율이 가장 높았다.
4. 정자의 반복세척(1~3회)은 P4 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 BSA 4 mg/ml 를 처리한 동결정액으로부터의 정자 회수율이나 생존율에 영향을 미치지 않았다.

결론적으로 progesteron과 BSA를 이용하면 용해후 세척정액으로부터 수정능력을 획득한 운동정자를 효과적으로 선별할 수 있다.

참고문헌

Aitkin RJ. 1990. Motility parameters and fertility in "Control of Sperm Motility Biological and Clinical Aspects" (Ed. C Gagon). CRC Press, pp. 285-302.

Blackmore P, Beebe S, Danforth D and Alexander N. 1990. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.*, 265:1376-1380.

Cohen-Dayag A, Ralt D, Tur-Kaspa I, Manor M, Makler A, Dor J, Mashiach S and Eisenbach M. 1994. Sequential acquisition of chemotactic responsiveness by human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 50:786-790.

Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S and Eisenbach M. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92:11039-11043.

Gnessi L, Ruff MR, Fraioli F and Pert CB. 1985. Demonstration of receptor-mediated chemotaxis by human spermatozoa. A novel quantitative bioassay. *Exp. Cell Res.*, 161(1): 219-30.

Kuzan FB, Hillier SL and Zarutskie PW. 1987. Comparison of three wash technique for selecting and concentrating the motile sperm from semen in oligospermia. *Br. J. Urol.*, 51: 587.

Lidholmer C. and Eliasson R. 1974. The effects of albumin, magnesium, and zinc on human survival in different fractions of split ejaculates. *Fertil. Steril.*, 25:424.

Makler A, Blumenfeld Z, Stoller J, Yoffe N and Reichler A. 1995. Inability of human sperm to change their orientation in response to external chemical stimuli. *Fertil. Steril.*, 63:1077-1082.

Makler A, Reichler A, Stoller J and Feigin PD. 1992. A new model for investigating in real-time the existence of chemotaxis in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 57:1066-1074.

Neill JM and Olds-Clark P. 1987. A computer-as-

- sisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.*, 18:121.
- Parrish JJ and Foote RH. 1987. Quantification of bovine sperm separation by a swim-up separation method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J. Androl.*, 8:259.
- Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I and Ben-Shlomo I. 1994. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol. Reprod.*, 50:774-785.
- Sliwa LT. 1995. Chemotaction of mouse spermatozoa induced by certain hormones. *Arch-Androl.*, 35: 105-10.
- Vadillo-Ortega F, Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez QB, Bermejo L and Bustos-Lopez H. 1994. Chemotactic factor for spermatozoa: a new biological function of progesterone. *Gynecol. Obstet. Mex.*, 62: 127-30.
- Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez J, Bermejo-Martinez L and Vadillo-Ortega F. 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil-Steril.*, 64(6): 1183-8.