

## Nitric Oxide가 인간 정자세포의 기능에 미치는 효과에 대한 연구

문화병원 불임연구실, 조재동 산부인과<sup>1</sup>, 부산대학교 자연과학대학 분자생물학과<sup>2</sup>

주보선 · 문화숙 · 박수진 · 문재연 · 조재동<sup>1</sup> · 김한도<sup>2</sup>

### The Dose-Dependent Effects of Nitric Oxide on Human Sperm Cell Function

Bo Sun Joo, Hwa Sook Moon, Sue Jin Park, Jae Yeoun Moon,  
Jae Dong Cho<sup>1</sup> and Han Do Kim<sup>2</sup>

*Infertility Research Laboratory, Moon Hwa Hospital, Pusan, Cho Jae Dong OB/GY,  
Chang-Won<sup>1</sup>, Department of Molecular Biology, College of Natural Science,  
Pusan University, Pusan<sup>2</sup>, Korea*

#### = Abstract =

This study was performed to determine the effects of nitric oxide on human sperm cell function. Semen samples were obtained from normal healthy volunteers. Motile spermatozoas collected by swim-up method were incubated up to 24 hours in Ham's F-10 medium supplemented with a various concentration of sodium nitroprusside (nitric oxide releasing agent). Sperm motility, hyperactivation, acrosome reaction rate, and acrosin activity were determined.

The results are as follows;

1. 1mM of SNP resulted in a significant decrease in sperm motility ( $44.8\% \pm 8.9\%$ : $78.1\% \pm 6.3\%$ , and hyperactivation ( $10.4\% \pm 6.4\%$ : $47.7\% \pm 9.5\%$ ) after incubation for 3 hours compared with the control group (Ham's F-10 alone), but had no effect on acrosome reaction.
2. At 100 $\mu$ M SNP, sperm motility was reduced after incubation for 6 hours ( $54.8\% \pm 3.2\%$ ) compared with that of the control group ( $82.7\% \pm 8.9\%$ ), but hyperactivation and acrosome reaction were not affected.
3. However, a lower concentration (less than 10 $\mu$ M) of SNP had no effect on sperm motility and hyperactivation for 8 hours of incubation but significantly decreased them when incubation periods were increased up to 24 hours compared with the control group. On the other hand, 1 $\mu$ M and 10 $\mu$ M SNP significantly increased the acrosome reaction rate in both acrosomal status ( $17.3\% \pm 5.2\%$ ,  $23.5\% \pm 4.7\%$ , respectively) and acrosin activity ( $34.3\mu$ IU  $\pm$   $10.5\mu$ IU,  $45.6\mu$ IU  $\pm$   $5.6\mu$ IU, respectively) as compared with the control group ( $7.0\% \pm 4.0\%$ ,  $9.5\mu$ IU  $\pm$   $3.4\mu$ IU).

These results indicate that SNP, NO releasing agent, has a dose-dependent effects on the sperm cell function. Therefore it may positively affect the fertilization by promoting acrosomal reaction at a lower concentration (less than 10 $\mu$ M).

**Key Words:** Nitric oxide (NO), Sodium nitroprusside (SNP), Sperm motility, Hyperactivation, Acrosomal status, Acrosin activity

## 서 론

척추동물에 있어서 정자의 운동성과 acrosome reaction은 수정을 위해 반드시 필요한 것으로 알려져 있다. 사람의 경우 여성의 자궁속으로 들어온 정자가 난자와 수정을 이루기 위해서는 끈적 끈적한 점액을 활발하게 통과하면서 hyperactivation과 capacitation이라는 수정의 전제반응을 거쳐야만 수정에 적합한 운동성을 획득하게 된다. 인간의 정자는 capacitation과정을 거치면서 또는 퇴화되면서 superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide와 같은 reactive oxygen species (이하 ROS)를 자체적으로 생성한다 (Aitken *et al.*, 1987; de Lamirande *et al.*, 1995; Mckinney *et al.*, 1996).

ROS는 불완전한 전자쌍을 공유하는 활성화된 자유라디칼의 일종이다. 정자의 막은 많은 양의 불포화 지방산을 함유하고 있어 ROS와 같은 free radical에 의해 lipid peroxidation (지질 인산화)됨으로써 민감하게 반응한다 (Jones *et al.*, 1979; Aitken *et al.*, 1992). 실제로 ROS가 농도에 따라 정자의 운동성이나 acrosome reaction 등에 영향을 미쳐 정자의 수정기능을 조절하는 것으로 알려져 있다 (de Lamirande & Gangon 1993; Griveau *et al.*, 1994, 1995; Bize *et al.*, 1991).

Nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 L-citrulline으로 전환되는 동안 in vivo에서 합성되어지는 또 하나의 free radical로서 ROS와 마찬가지로 정자의 수정기능에 영향을 미칠 수 있다 (Stamler *et al.*, 1992). NOS는 남성 및 여성의 생식기관을 포함한 다양한 세포에서 발견되어진다 (Wong & Garber, 1992; Sladek *et al.*, 1993). 또한 남성 및 여성생식계에는 NO를 생성할 수 있는 여러 종류의 세포들, 즉 mononucleate phagocytes, endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblast 등이 존재한다 (Nathan, 1992; Moncada *et al.*, 1991). 더구나 생식기에 염증 또는 손상이 생겼을 때 seminal plasma에는 macrophage와 leukocytes가 증가하며 그 면역반응으로 인해 NO생성이 증가한다.

최근 NO가 정자의 수정 기능에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Tomlinson *et al.*, 1992; Zini *et al.*, 1995). 그러나 NO가 정자 기능에 미치는 효과는 free radical의 특성상 농도에 따라 많은 차이가 있다 (Komada *et al.*, 1996;

Weinberg *et al.*, 1995). NO는 반감기가 매우 짧고 쉽게 분해되기 때문에 저자는 더욱 안정한 Sodium nitroprusside (SNP)를 실험에 이용하였다. Sodium nitroprusside (SNP)는 NO를 생성하는 대표적인 NO 유도물질의 하나이다 (Ioannidis & de Groot, 1993). 그러므로 본 연구는 SNP의 농도에 따른 인간 정자의 운동성, hyperactivation, acrosome reaction rate를 분석함으로써 NO가 정자세포의 기능에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 정자 처리

정액 시료는 정액검사 결과 정상 ( $>20 \times 10^6$  spermatozoa/ml,  $>40\%$  motility,  $>50\%$  normal form)으로 판정된 20명의 지원자로부터 2~3일간의 금욕기간 후 얻었다. 멸균 용기에 채취된 정액은 상온에서 30분 동안 방치함으로써 액화시킨 다음 자동정자분석기 (Medical Supply, SI-100)를 이용하여 정자의 농도, 운동성, 형태를 측정하였다. 정액을 10% 제대혈청이 첨가된 Ham's F-10 culture medium (Gibco)에서 원심분리하여 2회 세척하였다. 운동성 정자는  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  배양기에서 1시간 동안 배양함으로써 Swim-up 방법에 의해 회수하였다. 회수된 정자는 최종 농도가  $20\text{-}30 \times 10^6/\text{ml}$  되도록 나누어 실험에 이용하였다.

### 2. Sodium nitroprusside (SNP)의 처리

SNP (Sigma)는 혈청이 첨가되지 않은 Ham's F-10 배양액에 녹여 10mM stock solution으로 준비한 후  $50\mu\text{l}$ 씩 분주하여  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 사용 직전에 동일 배양액으로 희석하여 사용하였으며, SNP는 10nM~1mM까지 다양한 농도로 처리하였다. 대조군은 SNP를 처리하지 않은 배양액에서 배양시킨 정자세포를 대상으로 하였다.

### 3. 정자 운동성과 hyperactivation 측정

SNP가 정자 운동성과 hyperactivation에 미치는 효과를 다양한 배양시간에 따라 측정하였다. 즉, 0.18ml의 운동성 정자 부유액에 100nM~10mM의 SNP  $20\mu\text{l}$ 씩을 첨가한 후  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  배양기에서 1시간부터 24시간까지 배양시켰다. 정해진 시간에 정자 부유액의  $7\mu\text{l}$ 를 제거해서 자동정자분석기를 이용하여 정자의 운동성과 hyperactivation을 분석하였다.

#### 4. Acrosome reaction의 평가

Acrosome reaction rate는 acrosomal status와 acrosin activity를 조사함으로써 측정하였다. 1 $\mu$ M~1mM 농도의 SNP를 정자 부유액에 첨가하고 12시간 동안 배양시킨 다음 원심분리 (400g, 10분)하였다. 정자세포 침전물에 대해서는 acrosomal status를, 상층액에 대해서는 acrosin activity를 측정하였다.

##### 1) Acrosomal Status의 측정

Acrosomal status의 측정은 FITC-labeled Concanavalin A lectin (Sigma)을 이용하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다 (Holden *et al.*, 1990). 정자세포 침전물을 고정시키기 위해 1.5ml의 4% formaldehyde in 150mM PBS (pH 7.4)에서 1~2시간 동안 상온에 둔다.

세포 고정후 원심분리 (3,350g, 2분)하여 소량의 고정액만을 남겨두고 나머지 상층액은 버린다. 소량의 고정액으로 정자침전물을 재현탁시킨 다음 slide glass위에 도말하여 자연 건조시킨다. 0.2M glycine으로 3회 세척한 후 10mM PBS (pH 7.4)로 2회 더 세척한다. PBS에 녹인 100 $\mu$ g FITC-Con A/ml을 처리하여 도말된 정자를 labelling시킨다. PBS로 다시 3회 정도 세척한 후 mount하여 400 $\times$  형광현미경하에서 관찰한다. Acrosomal region전체에 걸쳐 형광을 나타내는 정자를 acrosome-reacted로 판정하였으며 (Fig. 4.), slide당 200개 정자를 count하여 acrosome reaction rate를 결정하였다. 모든 각 처리군에 대해 slide는 2장씩 준비하였다.

##### 2) Acrosin activity의 측정

Acrosin activity의 측정은 Kennedy 등 (Kennedy *et al.*, 1989) 방법에 따라 수행하였다. 90 $\mu$ l의 상층액과 1ml의 reaction mixture (1mg/ml of N-benzoyl-DL-arginine-p-nitranilide [BAP-NA] HCl in 0.055M NaCl, 10%[v/v] dimethyl sulfoxide, 0.1%[v/v] Triton X-100)를 혼합한 다음 상온에서 3시간 동안 반응시킨다. 100 $\mu$ l의 0.5M benzamidine을 첨가함으로써 반응을 중지시키고 405nm 파장에서 흡광도를 측정하여 acrosin activity를 정량한다. Acrosin activity는  $\mu$ IU/ $10^6$  spermatozoa로 나타낸다.

#### 5. 통계적 처리

실험결과의 통계학적 유의성은 Chi square test 방법을 사용하였으며, 유의수준을 5%로 하여 p값이 0.05보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다.

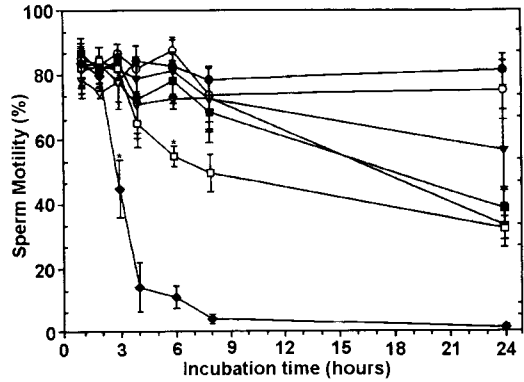


Fig. 1. Effect of SNP on sperm motility at 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 hours. Control (-●-), 10nM (-○-), 100nM (-▽-), 1 $\mu$ M (-△-), 10 $\mu$ M (-□-), 100 $\mu$ M (-◇-), 1mM (-◇-). Data represent mean  $\pm$  S.D., n=20, \*p<0.05.

## 결 과

### 1. SNP의 정자의 운동성과 hyperactivation에 대한 효과

정자의 운동성과 hyperactivation을 다양한 농도의 SNP를 처리한 후 배양시간에 따라 조사하였다. 1mM SNP 농도 (44.8% $\pm$ 8.9%)에서는 3시간 배양 후, 100 $\mu$ M SNP 농도 (54.8% $\pm$ 3.2%)에서는 6시간 배양 후에 정자의 운동성이 대조군 (각각 78.1% $\pm$ 6.3%, 82.7% $\pm$ 8.9%)에 비해 유의하게 감소하였다 (p<0.05). 배양 8시간까지는 1mM 농도를 제외하고는 SNP 농도에 따른 운동성의 차이가 거의 없었으며, 저농도 (100nM 이하)일수록 그러한 효과는 뚜렷했다. 그러나 배양 24시간 후 정자의 운동성은 10nM 농도 (74.8% $\pm$ 9.1%)를 제외하고는 모든 농도에서 대조군 (81.1% $\pm$ 7.8)보다 유의하게 낮았다 (100nM, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M; 56.3% $\pm$ 12.5%, 33.0% $\pm$ 6.6%, 38.2% $\pm$ 6.4%, 32.1% $\pm$ 3.5%, 순서대로) (Fig. 1).

정자의 hyperactivation은 배양 3시간 후 1mM SNP 농도 (10.4% $\pm$ 6.4%)에서 대조군 (47.7% $\pm$ 10.0%)에 비해 유의적으로 감소하였다 (p<0.05). 배양 24시간 후 hyperactivation은 정자의 운동성과 마찬가지로 10nM SNP 농도 (18.1% $\pm$ 11.3%)를 제외하고는 대조군 (21.7% $\pm$ 11.2%)에 비해 유의하게 감소하였다 (100nM, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M; 8.1% $\pm$ 12.5%, 5.3% $\pm$ 2.1%, 3.8% $\pm$ 6.4%, 3.3% $\pm$ 6.5%, 순서대로) (Fig. 2). 정자의 운동성과 hyperactivation은

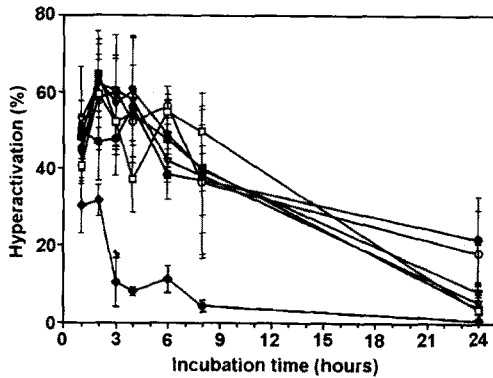


Fig. 2. Effect of SNP on sperm hyperactivation at 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 hours. Control (-●-), 10nM (-○-), 100nM (-▽-), 1µM (-△-), 10µM (-□-), 100µM (-◇-), 1mM (-◇-). Data represent mean ± S.D., n=20, \*p<0.05.

SNP의 농도가 높을수록 (100µM 이상), SNP 처리 후 배양시간이 길수록 감소한 반면, 저농도 SNP (10µM 이하)에서는 큰 영향을 받지 않았다.

## 2. SNP가 Acrosome reaction rate에 미치는 영향

1µM~1mM의 SNP를 정자 부유액에 처리하여 12시간 동안 배양시킨 다음 정자 침전물에 대해 acrosomal status를 측정하였다. Acrosomal reacted 정자의 빈도는 100µM SNP농도 (8.9%±7.9%)를 제외한 다른 세 농도 (1µM, 10µM, 1mM; 순서대로 \*17.3%±5.2%, \*\*23.5%±4.7%, \*\*63.5%±10.2%)에서 대조군 (7.0%±4.0%)보다 유의하게 높았다 (\*p<0.05, \*\*p<0.005). 상층액에 대해 조사된 acrosin activity는 1µM (34.3µIU±10.5µIU)과 10µM (45.6µIU±5.6µIU) SNP 농도에서만 대조군 (9.5µIU±3.4µIU)에 비해 훨씬 높게 나타났다 (p<0.005, Fig. 3). 그러나 100µM (10.3µIU±4.0µIU)과 1mM (6.6µIU±2.5µIU)에서는 대조군과 큰 차이가 없었으며, 1mM 농도의 경우 acrosomal status와 acrosin activity간 acrosome reaction rate가 일치하지 않았다. Figure 4는 다양한 농도의 SNP 처리시 acrosome reacted spermatozoa와 intact spermatozoa의 형광현미경 사진을 보여주고 있다.

## 고 찰

자유라디칼 (free radical)은 불완전한 전자쌍을

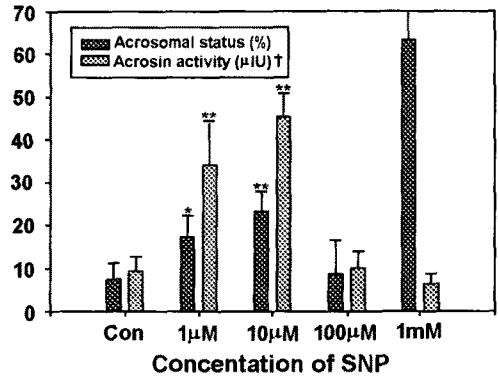
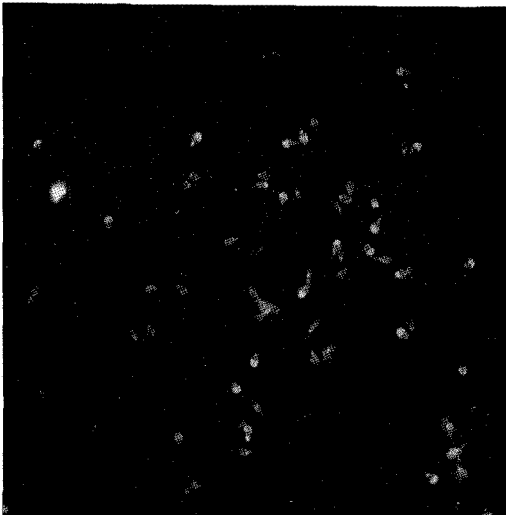
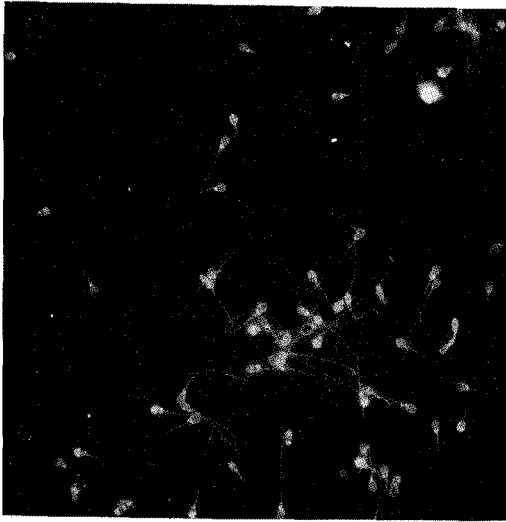
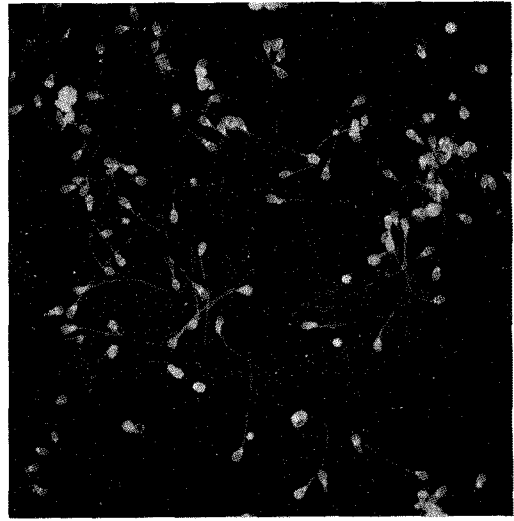
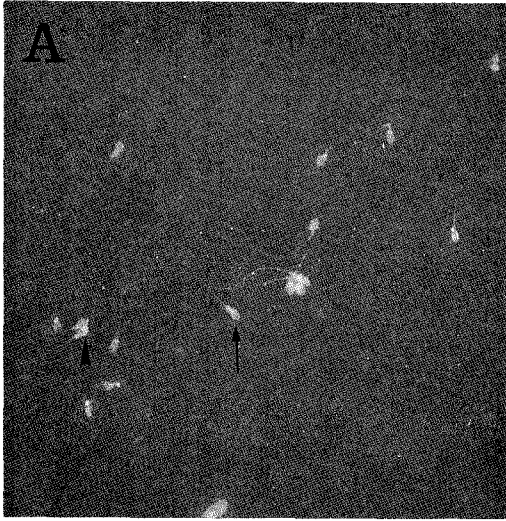


Fig. 3. Effect of various concentration of SNP on acrosome reaction. †: Acrosin activity was expressed as µIU of acrosin/10<sup>6</sup> spermatozoa. Data represent mean ± S.D., n=20. \*: p<0.05, \*\*: p<0.005.

공유하는 활성화된 상태의 분자로, 자신이 안정한 상태로 되기 위해 주변의 안전한 분자를 쉽게 공격하여 주변의 분자를 불안정하게 만드는 일련의 연쇄반응을 유발함으로써 세포의 기능에 영향을 미친다. Superoxide anion, hydrogen peroxide와 같은 ROS와 nitric oxide는 다양한 세포내 기능을 지닌 대표적인 free radical이며, 정자의 막은 많은 양의 불포화지방산을 함유하고 있어 이러한 free radical과 쉽게 반응할 수 있다.

SNP는 SIN-1, SNAP 등의 다른 NO 공급원이 NO뿐 아니라 superoxide anion이나 hydrogen peroxide를 동시에 생성하는데 반해 NO만을 형성하며 NO 자체보다 반감기가 긴 안정한 물질이다. 또한 superoxide anion이 NO와 반응하여 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 형성하여 NO의 세포독성을 증가시킬 뿐 아니라 hydrogen peroxide 역시 NO와 반응하여 NO의 중앙 억제 능력을 촉진시키는 것으로 알려져 있으므로 (Ischiropoulos *et al.*, 1992; Farias-Eisner *et al.*, 1996) NO만의 기능을 연구하기 위해서 SNP를 NO의 공급원으로 이용하는 것은 효과적이며, SNP의 효과는 NO에 의한 효과에 사용하는 것으로 판단된다.

본 연구의 *in vitro* 실험에서 SNP는 높은 농도 (100µM, mM)에서 정자의 운동성과 hyperactivation을 감소시켰는데 이는 Weinberg 등 (Weinberg *et al.*, 1995)의 보고와 매우 일치하고 있다. 한편 Tomlinson 등 (Tomlinson *et al.*, 1992)은 1~100µM의 SNP 농도에서도 정자의 운동성이 억제된다고 보고한 반면, Zini 등 (Zini *et al.*, 1995)은 비록



**Fig. 3.** Fluorescence Micrograph of human spermatozoa labelled FITC-Con A lectins. Acrosomal reacted spermatozoa (arrowheads) show intense fluorescence over acrosomal region, whereas intact acrosome (arrow) show no intense labelling ( $\times 400$ ).  
A: control (Not treated SNP), B: Treatment of SNP 1µM, 10µM, 100µM, 1mM, respectively.

SNP와 다른 diethylamine-NONOate와 spermine-NO-NOate를 NO 공급원으로 이용하였다 할지라도 0.3~1mM의 고농도에서는 정자의 운동성이 감소되었으나 0.1mM 이하의 저농도에서는 정자의 운동성과 hyperactivation이 영향을 받지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서도 10 $\mu$ M 이하의 저농도에서는 정자의 운동성이 대조군에 비해 배양후 8시간까지는 큰 영향을 받지 않았다. 그러나 저농도에서도 배양시간이 길어짐에 따라 10nM의 농도를 제외하고는 정자의 운동성과 hyperactivation이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.

최근 NO가 ATP 생성을 감소시키는 것으로 밝혀졌다 (Nathan, 1992; Dimmeler *et al.*, 1992; Moncada & Higgs, 1991). SNP가 농도에 따라 정자의 운동성과 hyperactivation에 영향을 미치는 것은 SNP로부터 생성된 NO가 세포내 호흡과정에 관여하는 효소의 작용을 억제 또는 불활성시킴으로써 ATP 생성을 감소시키기 때문이며, 저농도의 경우 이러한 효소의 활성도에 영향을 미치지 못할 만큼 소량의 NO가 생성되기 때문인 것으로 추측된다. 그러나 저농도에서도 SNP의 처리 시간이 길어지면, 소량의 NO에 의해 유도되는 미세한 세포내 손상이 축적되어 정자의 운동성과 hyperactivation이 감소될 수 있을 것이다.

Acrosome reaction은 정자의 세포막과 outer acrosomal membrane사이에 일어나는 일종의 막 융합 과정으로 그 결과 acrosin 등의 많은 acrosome 내용물들이 밖으로 분비되어 나온다. 정자의 막은 acrosome reaction이나 수정과 같은 막 융합에 필수적인 막 유동성 (membrane fluidity)을 발생시키기 위해 많은 양의 불포화지방산을 함유하고 있다. 그러므로 NO, ROS 등의 free radicals은 정자의 세포막을 쉽게 과산화하여 손상시킴으로써 급격한 운동성 저하와 세포 죽음을 초래할 뿐 아니라 acrosome reaction과 같은 막 융합과정을 방해할 수 있을 것이다 (Alvarez *et al.*, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1989).

이러한 손상효과와는 대조적으로 최근에는 free radicals에 의한 hyperactivation 및 acrosome reaction의 촉진과 같은 이로운 효과가 밝혀졌다 (de Lamirande & Gangon 1993; Griveau *et al.*, 1994; Bize *et al.*, 1991). 더우기 Komada 등 (Komada *et al.*, 1996)은 정자의 운동성에 영향을 미치지 않을 정도의 막 지질의 과산화는 정자의 투명대 결합력을 촉진시킴으로써 수정능력을 증진시킨다고

보고하였다. 또한 Zini 등 (Zini *et al.*, 1995)도 저농도의 NO는 in vitro에서 사람 정자의 capacitation을 촉진시킨다고 주장하였다. 본 연구에서도 1 $\mu$ M과 10 $\mu$ M SNP 농도에서 acrosome reaction rate가 acrosomal status와 acrosin activity 측정 모두에서 대조군에 비해 유의하게 높았으나 정자의 운동성에는 영향을 미치지 않았다. 그러므로 1 $\mu$ M과 10 $\mu$ M SNP 농도는 정자의 운동성을 감소시키지 않으면서 acrosome reaction rate를 증가시키므로 정자의 수정 기능을 촉진시키는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 앞으로 체외수정기법을 통해 이들 농도의 SNP가 수정에 미치는 직접적인 효과에 대한 연구가 필요하며 아울러 nanomole (nM) 수준에서 SNP가 acrosome reaction에 미치는 효과에 대한 조사도 진행되어야 할 것이다.

그러나 1mM SNP 농도에서는 acrosomal status 측정 결과 높은 빈도의 acrosome reacted 정자가 관찰되었으나 acrosin activity는 대조군과 유의한 차이가 발견되지 않았다. 이는 1mM SNP에서 나타난 대부분의 acrosome reacted 정자는 acrosome reaction의 결과가 아니라 정자의 세포막이 파괴되어 나타난 false-positive일 것으로 추측된다. 형광물질이 부착된 lectins을 이용한 대부분의 인간 정자세포의 acrosome reaction 염색법은 세포고정 시 정자세포막을 파괴할 수 있는 ethanol을 사용하고 있는데, 본 연구에서 이용된 Con-A lectins 염색법은 ethanol 대신 aldehyde를 사용함으로써 세포고정액으로 인한 세포막 파괴를 예방하였다 (Hass *et al.*, 1988). 그러므로 1mM SNP에 의해 유도된 고농도의 NO가 세포막 손상을 초래했을 것이다. 따라서 앞으로 고농도의 SNP 처리 시 정자 세포의 viability 검사가 시행되어야 할 것이다.

앞선 연구에서 불임 여성들 가운데 일부, 특히 자궁내막증을 지닌 환자의 peritoneum과 난관에서 macrophage 수가 급증하였으며, 사람의 정상 정자는 in vitro에서 macrophage에 의해 고정화되어 파괴되는 것으로 밝혀졌다 (Muscatto *et al.*, 1982; Haney *et al.*, 1983; Halme *et al.*, 1982). 또한 최근에는 경미한 자궁내막증 소견을 보이는 환자의 peritoneal fluid가 정자의 운동성과 난자 투과성을 감소시키는 것으로 밝혀졌다 (Aeby *et al.*, 1997). 한편 macrophage와 smooth muscle cells은 고농도의 NOS 발현을 유도하여 NO 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 앞으로 남성 및 여성 생식계에 있어서 macrophage와 muscle cells을 활

성화시켜 NO 생성을 촉진시키는 요인이 무엇이며, 이들 요인이 불임의 원인과 어떤 관계를 갖고 있는지에 대한 연구가 있어야 할 것이다. 이러한 연구들은 과도한 자유라디칼의 생성으로 인해 초래되는 면역적 불임을 치료하는데 기여할 수 있을 뿐 아니라, 나아가 NO의 잠재적인 유전적 손상효과를 주의할 수 있다면 피임의 한 방법으로도 활용될 수 있을 것이다.

결론적으로 고농도(1mM)의 SNP는 정자의 운동성과 hyperactivation을 급격히 감소시킨다. 반면, 저농도 (10 $\mu$ M 이하) SNP는 정자의 운동성과 hyperactivation에 거의 영향을 미치지 않으나 acrosome reaction rate를 촉진시킴으로써 수정에 긍정적인 역할을 할 수 있을 것이다.

## 결 론

Nitric oxide (NO)가 정자세포의 기능에 미치는 효과를 조사하기 위해 NO 공급원인 SNP를 다양한 농도로 처리한 다음 배양시간에 따라 정자의 운동성과 hyperactivation, acrosome reaction rate를 측정 한 결과는 다음과 같다.

1. 1mM SNP에서는 배양 3시간 후부터 정자의 운동성과 hyperactivation이 급격히 감소되었으나 acrosome reaction은 영향을 받지 않았다.

2. 100 $\mu$ M SNP에서는 배양 6시간 후부터 정자의 운동성이 감소되었으나 hyperactivation과 acrosome reaction은 큰 영향을 받지 않았다.

3. 10 $\mu$ M 이하의 SNP에서는 정자의 운동성과 hyperactivation이 배양 8시간까지는 큰 차이가 없었으나 24시간 동안 배양했을 경우 10nM SNP를 제외하고는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 한편 acrosome reaction은 10 $\mu$ M과 1 $\mu$ M SNP 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다.

그러므로 이러한 결과들은 10 $\mu$ M 이하의 SNP가 정자의 운동성과 hyperactivation에는 변화를 주지 않고 acrosome reaction을 촉진시킴으로써 수정 과정에 긍정적으로 작용할 수 있음을 시사하고 있다.

## 인 용 문 헌

Aeby TC, Huang T, Nakayama RT: The effect of peritoneal fluid patients with endometriosis on human sperm function in vitro. *Am J of Obstet*

*Gynecol* 1996, 174, 1779-1785.

Aitken RJ, Clarkson JS: Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 459-469.

Aitken RJ, Bluckingham D, Harkiss D: Use of a xanthine oxidase oxidant generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993, 97, 441-450.

Alvarez JG, Trouchtone JC, Blasco L, Storey BT: Spontaneous lipidperoxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: Superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987, 8, 338-343.

Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C: Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 1991, 44, 398-403.

de Lamirande E, Gangnon C: A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1993, 16, 21-25.

de Lamirande E, Gangnon C: Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biol Med* 1995, 18, 487-495.

Dimmerler S, Lottspeich F, Brune B: Nitric oxide causes ADP ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-d-phosphate-dehydrogenase. *J Biol Chem* 1992, 267, 16771-16774.

Farias-Eisner R, Chaudhuri G, Aeberhard E, Fukoto JM: The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide/hydrogen peroxide and implication to cell resistance/susceptibility. *J Biol Chem* 1996, 271, 6144-6151.

Griveau JF, Renard P, le Lannou D: An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 1994, 17, 300-307.

Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Lannou DL: Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995, 103,

- 17-26.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: "Free radicals in Biology and Medicine." 2nd Ed. Oxford: Clarendon Press, pp 188-209.
- Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj S: Pelvic macrophages in normal and infertile women: the role of patent tubes. *Am J of Obstet Gynecol* 1982, 142, 890-895.
- Haney AF, Miskuonis MA, Weiberg JB: Macrophages and infertility: Oviductal macrophages as potential mediators of infertility. *Fertil Steril* 1983, 39, 310-315.
- Hass GG, DeBault LE, D'Cruz O, Shuey R: The effect of fixative and/or air-drying on the plasma and acrosomal membranes of human sperm. *Fertil Steril* 1988, 50, 487-492.
- Holden CA, Hyne RV, Sathananthan AH, Trounson AO: Assessment of human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. *Mol Reprod Dev* 1990, 25, 247-257.
- Ioannidis I and de Groot H: Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem J* 1993, 296-341.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS: Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992, 298, 446-451.
- Jones R, Mann T and Sherins RJ: Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979, 31, 531-537.
- Kennedy WP, Kaminiski JM, Vauder Ven HH, Jeyendran RS, Reid DS, Blackwell J, Biefield P, Zaneveld LJD: A Simple clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J Andrology* 1989, 10, 21-27.
- Komada H, Kuribayashi, Gangon C: Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl* 1996, 17, 151-157.
- Mckinney KA, Lewis SEM, Thompson W: Reactive oxygen species generation in human sperm: Luminol and lucigenin chemiluminescence probes. *Archives of Andrology* 1996, 36, 119-125.
- Moncada S, Higgs EA: Endogenous Nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991, 21, 361-374.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43, 109-42.
- Muscatto JJ, Hanet AF, Weinberg JB: Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: a possible cause of infertility in endometriosis. *Am J of Obstet Gynecol* 1982, 144, 503-510.
- Nathan C: Nitric oxide as a secondary product of mammalian cells. *FASEB J* 1992, 6, 3051-3064.
- Sladek MS, Regenstein AC, Lykins D, Robert JM: Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decrease on the last day of pregnancy. *Am J of Obstet Gynecol* 1993, 169, 1258-1291.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscatzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 1992, 258, 1898-1902.
- Tomlinson MJ, East SJ, Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID: Preliminary communication: Possible role of reactive nitrogen intermediates in leukocyte-mediated sperm dysfunction. *Am J Reprod Immunol* 1992, 27, 89-92.
- Weinberg JB, Doty E, Bonaventura J, Hanney AF: Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil Steril* 1995, 64, 408-413.
- Wong SK, Garber DI: Receptor guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 1992, 90, 199-305.
- Zini A, Lamirande ED, Gangon C: Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1995, 16, 424-431.