

BSA, Caffeine, Heparin 및 Progesterone을 이용한 수정능획득정자의 양적 선별

김경화 · 여영근 · 박영식
경북대학교 농과대학

Quantitative Selection of Capacitated-sperm with BSA, Caffeine, Heparin and Progesterone

K. H. Kim, Y. K. Yeo and Y. S. Park

College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

To make up the medium for quantitative selection of capacitated-sperm through sucrose layer, the effects of BSA, caffeine, heparin and progesterone on sperm swim-up migration and movement were examined. And the results obtained were as follows:

1. BSA of 4mg/ml in bMSS stimulated sperm migration and movement, and attracted capacitated-sperm.
2. Caffeine of 5mM in bMSS containing 4mg/ml BSA stimulated sperm movement and attracted capacitated-sperm.
3. Heparin of 20 μ g/ml in bMSS containing both 4mg/ml BSA and 5mM caffeine stimulated movement and capacitation of sperm.
4. Progesterone of 50 μ g/ml in bMSS containing all 4mg/ml BSA, 5mM caffeine and 20 μ g/ml heparin (BCHP-MSS) attracted capacitated-sperm.
5. Effect of BCHP-MSS on sperm attraction was not different from effect of 10% follicular fluid solution (FF-MSS) on sperm swim-up separation.

In conclusion, bMSS with 4mg/ml BSA, 5mM caffeine, 20 μ g/ml heparin and 50 μ g/ml progesterone (BCHP-MSS) was a optimal condition for selection of capacitated-sperm through sucrose layer.

(Key words : BSA, caffeine, heparin, progesterone, sperm selection, swim-up migration, movement, capacitation, sucrose layer)

서 론

정액내에는 다양한 생리 상태의 정자가 함유되어 있다. Eisenbach와 Ralt (1992)는 일부 정자가 생리적으로 성숙된 상태일 때 다른 정자는 성숙전이

거나 이미 성숙시기가 지난 상태이며, 수정능력을 획득한 정자가 점차 수정능력을 잃어 가는 동안 다른 정자가 성숙되어 수정능력을 획득한다고 하였다. 특히 Cohen-Dayag 등 (1995)은 정자의 수정능 획득시간은 50분에서 240분 정도로 짧게 유지되며, 이 시기는 화학적 추성을 나타내는 시기와 일치하

*본 연구는 학술진흥재단이 지원하는 연구비(1997)로 수행되었음.

였다고 보고하였다. 이러한 주화적 이동능을 나타내는 수정능획득정자만을 회수할 수 있다면 체외수정, 미세수정 및 체내수정에 요구되는 수정능력을 획득한 정자만을 공급할 수 있을 것이다.

정자의 선별을 위해서는 정자의 이동을 자극하고 활력을 증진시키며 수정능획득반응을 유발하거나 수정능력을 획득한 정자의 이동을 자극할 수 있어야 한다. 정자의 이동을 자극하는 물질에 대한 연구에서 박(1996)은 bovine serum albumin (BSA)이 정자의 swim-up 이동을 자극한다고 보고한 바 있다. 정자의 활력을 자극하는 것으로 알려진 caffeine(Homonnai 등, 1976)은 cyclic nucleotide phosphodiesterase 저해체로서 세포내 cAMP의 농도를 증가시켜 미성숙 정자의 전진운동을 자극하는 것으로 보고된 바 있다(Kann과 Serres, 1980). 정자의 수정능획득반응을 유발하는 것으로 알려진 heparin은 정자 내로 Ca^{2+} 의 유입을 증진시키며(First와 Parrish, 1987), 탈수정능인자를 정자막으로부터 제거하여(Oliphant 등, 1985) 정자의 침모반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 마지막으로 수정능력을 획득한 정자의 이동을 자극하는 것으로 알려진 progesterone(Vadillo Ortega 등, 1994; Villanueva-Diaz 등, 1995; Sliwa, 1995; 박, 1996)은 정자의 수정능획득을 직접 유발하여 수정율에 영향을 미치며(Barboni 등, 1995) 또한 정자내 Ca^{2+} 의 빠른 유입을 조장하여(Thomas와 Meizel, 1989) 침모반응을 유발하는 것으로 보고된 바 있다(Osman 등, 1989). 이상에서 언급한 albumin, caffeine, heparin 및 progesterone은 정자의 운동성과 수정능획득에 영향을 미치며 따라서 이들을 이용하면 수정능획득정자의 선택적 분리가 가능할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 수정능획득정자의 양적 선별을 가능케 하는 배양액을 개발하기 위하여 BSA, caffeine, heparin 및 progesterone이 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하고 나아가서 새로운 조성한 정자선별용액의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 정자선별용 기초용액의 준비

정액의 회석과 정자의 세척 및 배양을 위하여 108mM NaCl, 4.5mM KCl, 1.0mM KH_2PO_4 , 4.15mM $NaHCO_3$, 20.85mM HEPES, 3.0mM $CaCl_2$, 0.9mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 23.28mM Na-lactate, 0.3mM Na-pyruvate, 및 5.0mM glucose를 첨가하고 pH 7이 되도록 조정한 정자선별용 기초용액(basic medium for sperm selection, bMSS)을 준비하였다.

2. 실험계획

1) 실험 1: BSA의 적정농도

정자의 선별을 위한 BSA의 적정 첨가농도를 결정하기 위하여 BSA를 0, 4, 10, 및 20%가 되도록 첨가한 bMSS(B-MSS)를 준비하였다. 준비한 용액 980 μ 를 15ml 원심분리관에 주입하고 미리 36°C에서 10분간 온도를 평형시켰다. 한편 동결정액을 용해하고 bMSS로 5배 희석한 다음 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 10mM의 sucrose가 함유된 bMSS(su-MSS) 60 μ 를 첨가하여 정자펠릿을 재부유하였다. 재부유한 정액 20 μ 를 미리 준비한 B-MSS 980 μ 아래에 주입한 다음 36°C에서 10분간 배양하였다. 배양후 상층액 500 μ 를 회수하여 정액성상검사판을 이용하여 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다. 또한 회수된 정자 중에서 수정능획득정자의 비율을 구하기 위하여 배양후 회수한 상층액에 5 μ M의 phorbol 12-myristate 13-acetate를 첨가하고 36°C에서 30분간 배양한 다음 침모반응율을 조사하였다.

2) 실험 2: caffeine의 적정농도

정자의 선별을 위한 caffeine의 적정 첨가농도를 결정하기 위하여 실험 1에서 결정된 BSA가 함유된 bMSS(B-MSS)에 caffeine을 0, 1, 5 및 10mM이 되도록 첨가하였으며, 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수한 상층액으로부터 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율 및

수정능획득정자의 비율을 조사하였다.

3) 실험 3: heparin의 적정농도

Heparin의 적정 첨가농도를 결정하기 위하여 실험 1과 실험 2에서 결정된 BSA와 caffeine이 함유된 bMSS(BC-MSS)에 heparin을 0, 1, 10 및 20 μ g/ml이 되도록 첨가하였으며, 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수한 상층액으로부터 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율 및 수정능획득정자의 비율을 조사하였다.

4) 실험 4: progesterone의 적정농도

Progesterone의 적정 첨가농도를 결정하기 위하여 실험 1, 실험 2, 및 실험 3에서 결정된 BSA, caffeine, 및 heparin이 함유된 bMSS(BCH-MSS)에 progesterone을 0, 10, 50, 및 100 μ g/ml이 되도록 첨가하였으며, 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수한 상층액으로부터 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율 및 수정능획득정자의 비율을 조사하였다.

5) 실험 5: 새로운 배양조건과 난포액의 질자선별효과 비교

실험 1, 실험 2, 실험 3 및 실험 4에서 결정된 수준으로 BSA, caffeine, heparin 및 progesterone이 모두 첨가된 bMSS(BCHP-MSS)의 정자 선별효과를 조사하기 위하여, 난포액을 10% 함유한 bMSS(FF-MSS)와 BCHO-MSS를 준비하였으며, 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수한 상층액으로부터 회수된 정자의 수와 운동정자의 비율 및 수정능획득정자의 비율을 조사하였다. 한편 난포액은 신선한 난소에 있는 직경이 2~5mm인 난포로부터 난포액을 회수하여 2,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리후 상층액만을 회수하여 실험에 사용할 때까지 -40 $^{\circ}$ C에서 동결보존하였다.

3. 통계처리

반복처리에 의해 얻어진 결과는 분산분석(ANOVA)에 의해 통계 처리하여 mean SE(standard error)로 표시하였으며, Dunkun 다중검정에 의해 처

리간 차이의 유의성을 검정하였다. 이러한 유의성 검정의 결과는 각 Table에 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 표기하였는데, 이는 처리간에 5% 또는 1% 수준에서 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

결과 및 고찰

1. BSA의 적정 농도

정자의 이동과 운동을 자극하는 것으로 알려진 BSA가 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하였던 바 결과는 Table 1과 같다.

BSA가 0(control), 4, 10 및 20mg/ml 첨가된 bMSS로 scrose 층으로부터 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 각각 7.8 ± 0.8 , 89.2 ± 1.4 , 100.5 ± 3.5 및 $174.8 \pm 16.6 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 20.7 ± 3.7 , 70.7 ± 1.5 , 67.9 ± 1.3 및 $41.6 \pm 1.9\%$ 였고, 침모반응율은 각각 58.9 ± 7.1 , 84.5 ± 3.7 , 78.0 ± 5.0 및 $60.9 \pm 2.5\%$ 였다.

회수된 정자의 수는 BSA 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, BSA 첨가농도가 증가함에 따라서 유의하게 증가하였다. 박(1996)은 BSA가 정자의 swim-up 이동을 자극한다고 보고한 바 있다. 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율도 BSA 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, BSA 4mg/ml와 10mg/ml 첨가구가 20mg/ml 첨가구에 비하여 유의하게 높았다. Harrison 등(1982)도 BSA가 첨가된 배양액에서 30 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양하였을 때 정자의 활력이 증진하였다고 하였다. 한편 20mg/ml BSA 첨가구에서 회수된 정자의 운동성이 오히려 감소되었다. Fournier-Delpech와 Thibault(1993)는 난포액에 함유되어 있는 albumin이 cholesterol의 수용체로 작용하여 정자막으로부터 cholesterol을 제거하여 정자막을 불안정하게 만든다고 보고한 바 있다. 따라서 BSA의 첨가농도가 높아질수록 정자막이 빠르게 불안정하게 되어 조기에 활력을 상실하는 것으로 추론된다. 한편 침모반응율로 표시된 수정능획득정자의 비율은 4mg/ml와 10mg/ml BSA 첨가구가 20mg/ml BSA 첨가구와 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, 20mg/ml BSA 첨가구와 대조구간에는 유의한

Table 1. Effect of BSA additional levels in bMSS on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

BSA (mg/ml)	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
0(control)	7.3 \pm 0.8 ^h	20.7 \pm 3.7 ^c	58.9 \pm 7.1 ^f
4	89.2 \pm 1.4 ^g	70.7 \pm 1.5 ^a	84.5 \pm 3.7 ^e
10	100.5 \pm 3.5 ^f	67.9 \pm 1.3 ^a	78.0 \pm 5.0 ^e
20	174.8 \pm 16.6 ^e	41.6 \pm 1.9 ^b	60.9 \pm 2.5 ^f

Superscripts a, b and c mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.01$.

Superscripts e, f, g, and h mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

차이가 없었다. 즉, BSA 첨가농도가 증가할수록 수정능획득정자의 이동이 오히려 억제되었다. 정자의 swim-up 이동을 자극하는 20mg/ml BSA 첨가구에서 오히려 운동정자의 수가 감소하고 수정능획득정자의 이동이 억제되었는데, 이는 높은 BSA농도에서 정자의 무분별한 swim-up 현상이 일어났기 때문인 것으로 추론된다.

결론적으로 본 실험조건에서 BSA는 정자의 이동과 운동을 자극하였으며, 수정능획득정자의 선별을 위해서는 4mg/ml 수준의 BSA 첨가가 적절한 것으로 사료된다.

2. Caffeine의 적정 농도

정자의 활력을 증진시키는 것으로 알려진 caffeine이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 선별에 미치는 영향을 조사하였던 바 결과는 Table 2와 같다.

BSA가 4mg/ml 첨가된 bMSS (B-MSS)에 caffeine을 0 (control), 1, 5 및 10mM 첨가하여 su-

crose 층으로부터 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 각각 206.0 \pm 3.5, 146.7 \pm 2.0, 154.3 \pm 4.3 및 185.0 \pm 2.6 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 79.8 \pm 4.9, 87.9 \pm 2.3, 92.0 \pm 2.3 및 90.1 \pm 2.5% 였다. 또한 침모반응율은 각각 64.1 \pm 2.2, 69.7 \pm 4.0, 78.8 \pm 4.0 및 74.2 \pm 4.0% 였다.

회수된 정자의 수는 1mM과 5mM caffeine 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 낮았으나 10mM caffeine 첨가구와 대조구간에는 유의한 차이가 없었다. 즉, 낮은 농도의 caffeine은 오히려 BSA의 정자이동자극효과를 억제하는 것으로 사료된다. 회수한 정자중 운동정자의 비율은 5mM caffeine 첨가구에서 가장 높았으나 대조구와 첨가구들간에 유의한 차이가 없었다. 한편 회수된 정자중 수정능획득정자의 비율도 5mM caffeine 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으나, 1mM과 10mM caffeine 첨가구와는 유의한 차이가 없었다. 정자의 활성에 대한 caffeine 첨가농도의 효과에 관한 연구에

Table 2. Effect of caffeine additional levels in bMSS with 4mg/ml BSA on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

Conc. of caffeine(mM)	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
0(control)	206.0 \pm 3.5 ^a	79.8 \pm 4.9	64.1 \pm 2.2 ^f
1	146.7 \pm 2.0 ^c	87.9 \pm 2.3	69.7 \pm 4.0 ^{ef}
5	154.3 \pm 4.3 ^c	92.0 \pm 2.3	78.8 \pm 4.0 ^e
10	185.0 \pm 2.6 ^b	90.1 \pm 2.5	74.2 \pm 4.0 ^{ef}

Superscripts a, b and c mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.01$.

Superscripts e and f mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

서 Diaz 등(1992)은 3.5mM과 7.0mM의 caffeine이 정자의 활력을 증진시켰다고 하였다. Moussa(1983)도 caffeine의 첨가농도에 따라 정자의 운동성이 변하는데, 3~6mM에서 활력을 자극하지만 60mM에서는 오히려 억제하였으며 120mM의 첨가에서는 정자의 부동화현상이 나타났다고 하였다. Levin 등(1981)도 2~6mM의 첨가수준에서 caffeine은 정자의 활력과 대사를 증진시킨다고 하였으며 0.1mM과 40mM수준에서 양비례적으로 phosphodiesterase의 활성을 억제하였다고 보고한 바 있다. 한편 Parrish 등(1994)은 glucose가 heparin 의존적 cAMP의 증가를 억제함으로써 수정능획득반응을 억제하는데, caffeine이 양비례적으로 glucose의 억제효과를 역전시킨다고 하였다. 본 실험에서 사용되는 bMSS에는 에너지원으로 glucose를 사용하고 있는데, caffeine의 적정 첨가는 정자의 활력의 증진뿐만 아니라 glucose에 의한 수정능획득반응 억제효과를 역전시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 caffeine은 정자의 이동을 억제하지만 운동과 수정능획득정자의 이동을 증가시키며, 특히 수정능획득정자의 선별을 위하여 5mM의 caffeine의 첨가가 적정한 것으로 사료된다.

3. Heparin의 적정 농도

정자의 수정능획득을 유발하는 것으로 알려진 heparin이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 선별에 미치는 영향을 조사하였던 바 결과는 Table 3과 같다.

BSA와 caffeine이 각각 4mg/ml와 5mM 첨가된 bMSS(BC-MSS)에 heparin을 0(대조구), 1, 10

및 20 μ g/ml 첨가하여 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 각각 78.3 \pm 4.8, 73.0 \pm 6.7, 60.2 \pm 5.6 및 75.8 \pm 6.7 \times 10⁴였으며, 운동정자의 비율은 각각 84.5 \pm 1.7, 89.0 \pm 1.3, 90.9 \pm 1.0 및 92.3 \pm 0.7%였고, 침모반응율은 각각 72.8 \pm 1.8, 80.8 \pm 4.2, 80.9 \pm 4.1 및 88.6 \pm 1.2%였다.

회수된 정자의 수는 heparin 첨가구와 대조구간 유의한 차이가 없었다. 즉, heparin은 정자의 이동에 영향을 미치지 않았다. 회수된 정자중 운동정자의 비율은 10과 20 μ g/ml heparin 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으나, 1 μ g/ml 첨가구와 유의한 차이는 없었다. 즉, heparin의 첨가농도가 증가할수록 정자의 운동성이 증가하였다. Hananah 등(1996)도 난포액내 glycosaminoglycan이 정자의 활력을 증진시킨다고 보고한 바 있다. 회수된 정자중에서 수정능획득 정자의 비율은 20 μ g/ml heparin 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으나, 1 μ g/ml과 10 μ g/ml heparin 첨가구와는 유의한 차이가 없었다. 즉, heparin 첨가농도가 증가할수록 수정능획득정자의 비율이 증가하였는데, heparin이 정자의 swim-up 이동을 자극하지 않으면서 회수된 정자의 운동을 자극한다는 결과를 고려할 때 높은 농도의 heparin은 분리된 정자에서 수정능획득반응을 유발하는 것으로 추론된다. 정자의 수정능획득에 대한 heparin의 영향에 관한 연구에서 Parrish 등(1989)은 난관액에는 열에 안정한 heparin 유사 물질이 있으며 이는 정자의 수정능획득을 유발한다고 하였고, Parrish 등(1988; 1994)은 10 μ g/ml 수준의 heparin을 첨가하여 4시간 배양한 정자에서

Table 3. Effect of heparin additional levels in bMSS with 4mg/ml BSA and 5mM caffeine on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

Conc. of heparin(μ g/ml)	No. of sperm recovered(\times 10 ⁴)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
0(control)	78.3 \pm 4.8	84.5 \pm 1.7 ^d	72.8 \pm 1.8 ^b
1	73.0 \pm 6.7	89.0 \pm 1.3 ^{cd}	80.8 \pm 4.2 ^{ab}
10	60.2 \pm 5.6	90.9 \pm 1.0 ^c	80.9 \pm 4.1 ^{ab}
20	75.8 \pm 6.7	92.3 \pm 0.7 ^c	88.6 \pm 1.2 ^a

Superscripts a and b mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.01$.

Superscripts c and d mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

수정능획득반응이 유발되어 있다고 보고하였다. Heparin이 정자의 수정능획득반응을 유발하는 기전에 관한 연구에서 Uguz 등(1994)은 heparin이 정자의 cAMP와 단백질의 인산화를 증진시킨다고 하였으며, Galantino-Homer 등(1997)도 heparin의 첨가농도와 배양시간에 비례하여 cAMP 의존적 경로에 의해 조절되는 tyrosine 인산화단백질이 증가하였으며, cAMP의 조절이 단백질활성효소(PK-A)에 의해 증대되기 때문에 정자의 수정능획득과정에서 단백질 tyrosine 인산화과정과 cAMP/PK-A의 역할이 요구된다고 보고한 바 있다.

결론적으로 heparin은 정자의 운동을 자극하였으며, 정자의 수정능획득반응을 유발하였다. 본 실험 조건에서 수정능획득정자의 선별을 위하여 20 μ g/ml heparin의 첨가가 적절한 것으로 사료된다.

4. Progesterone의 적정 농도

수정능력을 획득한 정자의 이동을 자극하는 것으로 알려진 progesterone이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 선별에 미치는 영향을 조사하였던 바 결과는 Table 4와 같다.

BSA, caffeine, heparin을 각각 4mg/ml, 5mM 및 20 μ g/ml 함유한 bMSS(BCH-MSS)에 progesterone을 각각 0, 10, 50 및 100 μ g/ml 첨가하여 sucrose 층으로부터 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 83.1 \pm 3.1, 68.7 \pm 2.9, 69.8 \pm 1.2 및 63.0 \pm 6.5 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 90.4 \pm 1.6, 87.4 \pm 2.7, 89.7 \pm 2.2, 및 78.5 \pm 2.6 %였고, 첨모반응율은 77.3 \pm 2.6, 81.8 \pm 2.6, 93.4 \pm 1.3 및 89.6 \pm 0.9%였다.

회수된 정자의 수는 progesterone첨가구가 대조구에 비하여 감소하였으며 첨가구간에는 유의한 차이가 없었다. 즉, progesterone은 정자의 이동을 억제하였다. Lee와 Blandau(1979)도 생리적 수준보다 높은 수준의 progesterone이 정자의 유영속도를 떨어뜨린다고 보고한 바 있다. 회수된 정자중 운동정자의 비율은 100 μ g/ml progesterone 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 감소하였으나, 10 μ g/ml과 50 μ g/ml progesterone첨가구와 대조구간에는 유의한 차이가 없었다. 즉, 고농도의 progesterone은 정자의 운동성을 억제하였다. Mbizvo 등(1990)도 progesterone이 첨가된 배양액에서 정자가 과민 운동성을 보였으나 운동정자 비율은 감소하였다고 보고한 바 있다. 회수된 정자 중에서 수정능획득 정자의 비율은 50 μ g/ml과 100 μ g/ml progesterone 첨가구가 대조구와 10 μ g/ml progesterone첨가구에 비하여 유의하게 높았다. 즉, 50 μ g/ml과 100 μ g/ml progesterone의 첨가가 수정능획득정자의 이동을 촉진하였다. Kay 등(1994)은 생리적 수준의 progesterone이 첨가된 배양액에서 정자의 수정능획득반응이 증가하였다고 하였으며, Barboni 등(1995)도 progesterone이 수정능획득반응을 유발하여 수정율에 영향을 미치는 것으로 보고한 바 있다.

결론적으로 progesterone은 정자의 이동과 운동을 감소시켰으나 수정능획득정자의 비율을 증가시켰다. 본 실험조건에서는 수정능획득정자의 선별을 위하여 50 μ g/ml progesterone의 첨가가 적절한 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of progesterone additional levels in bMSS with 4mg/ml BSA, 5mM caffeine, and 20 μ g/ml heparin on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

Conc. of P4(μ g/ml)	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
Control	83.1 \pm 3.1 ^c	90.4 \pm 1.6 ^c	77.3 \pm 2.6 ^b
10	68.7 \pm 2.9 ^d	87.4 \pm 2.7 ^{cd}	81.8 \pm 2.6 ^b
50	69.8 \pm 1.2 ^d	89.7 \pm 2.2 ^c	93.4 \pm 1.3 ^a
100	63.0 \pm 6.1 ^{bd}	78.5 \pm 2.6 ^d	89.6 \pm 0.9 ^a

Superscripts a and b mean that treatments in the same column are significantly different at p<0.01.

Superscripts c and d mean that treatments in the same column are significantly different at p<0.05.

Table 5. Effect of bMSS containing BSA (4mg/ ml), caffeine (5mM), heparin (20 μ g/ ml), and progesterone (50 μ g/ ml) on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

P4	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
FF-MSS	69.9 \pm 4.4	93.5 \pm 1.9 ^c	74.8 \pm 4.4
BCHP-MSS	56.3 \pm 3.6	81.9 \pm 1.6 ^d	80.3 \pm 6.6

Superscripts c and d mean that treatments in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

5. 새로운 배양액과 난포액의 정자선별효과 비교

BSA, caffeine, heparin 및 progesterone이 첨가된 bMSS (BCHP-MSS)의 수정능획득정자의 선별 효과를 조사하기 위하여 난포액이 10% 함유된 bMSS (FF-MSS)의 효과와 비교하였던 바 얻어진 결과는 Table 5와 같다.

난포액을 10% 함유한 bMSS (FF-MSS)와 BSA (4mg/ml), caffeine (5mM), heparin (20 μ g/ml) 및 progesterone (50 μ g/ml)이 함유된 bMSS(BCHP-MSS)로 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 각각 56.3 \pm 3.3과 69.9 \pm 4.4 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 81.9 \pm 1.6과 93.5 \pm 1.9% 였고, 첨모반 응율은 각각 80.3 \pm 6.6과 74.8 \pm 4.4% 였다.

회수된 정자의 수는 BCHP-MSS 처리구가 FF-MSS 대조구보다 낮았으나 유의한 차이는 없었다. 회수한 정자 중 운동정자의 비율은 BCHP-MSS 처리구가 FF-MSS보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 이는 새로 조성된 배양액에는 에너지원이나 보호물질이 제한되어 있어서 swim-up 이동 후 정자의 운동능이 감소되었기 때문인 것으로 추론된다. 한편 수정능획득정자의 비율은 BCHP-MSS 처리구가 FF-MSS 대조구에 비하여 높았으나 유의한 차이는 없었다.

결론적으로 새로 조성한 BCHP-MSS는 난포액 함유 배양액과 유사한 정자의 선별기능을 나타내었으며, 따라서 BCHP-MSS는 수정능획득정자의 양적 선별에 적절한 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 sucrose 층으로부터 수정능획득정자의

swim-up 분리를 효율적으로 유도할 수 있는 정자선별용 용액을 제조하기 위하여, BSA, caffeine, heparin 및 progesterone이 정자의 이동과 운동에 미치는 효과를 조사하였던 바, 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. bMSS에 첨가된 4mg/ml BSA는 정자의 이동과 운동을 자극하고 수정능획득정자를 유인하였다.
2. BSA (4mg/ml)가 함유된 bMSS에서 5mM caffeine은 정자의 운동을 자극하고 수정능획득정자를 유인하였다.
3. BSA (4mg/ml)와 caffeine (5mM)이 함유된 bMSS에서 20 μ g/ml heparin은 정자의 운동을 자극하고 수정능획득정자의 비율을 증가시켰다.
4. BSA (4mg/ml), caffeine (5mM) 및 heparin (20 μ g/ml)이 함유된 bMSS에서 50 μ g/ml progesterone은 수정능획득정자를 유인하였다.
5. BSA (4mg/ml), caffeine (5mM), heparin (20 μ g/ml) 및 progesterone (50 μ g/ml)이 함유된 bMSS는 수정능획득정자의 유인효과가 10% 난포액 함유 bMSS의 효과와 차이가 없었다.

결론적으로 BSA, caffeine, heparin 및 progesterone을 함유한 bMSS는 sucrose 층으로부터 수정능획득정자의 swim-up 분리에 적절하였다.

참고문헌

- Barboni B, Mattioli M and Seren E. 1995. Influence of progesterone on boar sperm capacitation. J. Endocrinol., 144:13-18.

- 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(24): 11039-43.
- Diaz JW, Gonzalez MA, Avedo F, Mallea L, and Rodriguez N. 1992. Use of an ATP-supplemented medium for the conservation of human semen and the effect of caffeine on the motility of preserved sperm. Results in artificial insemination. *Andrologia.*, 24:131-133.
- Eisenbach M, and Ralt D. 1992. Precontact mammalian sperm-egg communication and role in fertilization. *Am. J. Physiol.*, 262: C1095-101.
- First NL and Parrish JJ. 1987. *In vitro* fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 34:151-165.
- Galantino-Homer HL, Visconti PE, and Kopf GS. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.*, 56:707-719.
- Hamamah S, Wittemer C, Barthelemy C, Richet C, Zerimech F, Royere D, and Degand P. 1996. Identification of hyaluronic acid and chondroitin sulfates in human follicular fluid and their effects on human sperm motility and the outcome of *in vitro* fertilization. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36:43-52.
- Harrison RA, Dott HM, and Foster GC. 1982. Bovine serum albumin, sperm motility, and the dilution effect. *J. Exp. Zool.*, 222:81-88.
- Homonnai ZT, Paz G, Sofer A, Kraicer PF, and Harell A. 1976. Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, 21:162-170.
- Kann ML and Serres V. 1980. Development and initiation of sperm motility in the hamster epididymis. *Reprod. Nutr. Develop.*, 20:1739-1749.
- Kay VJ, Coutts JR, and Robertson L. 1994. Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum. Reprod.*, 9:2318-2323.
- Lee WI and Blandau RJ. 1979. Laser light-scattering study of the effect of progesterone on sperm motility. *Fertil. Steril.*, 32:320-323.
- Levin RM, Greenberg SH, and Wein AJ. 1981. Quantitative analysis of the effects of caffeine on sperm motility and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (AMP) phosphodiesterase. *Fertil. Steril.*, 36:798-802.
- Mbizvo MT, Thomas S, Fulgham DL, and Alexander NJ. 1990. Serum hormone levels affect sperm function. *Fertil. Steril.*, 54:113-120.
- Moussa MM. 1983. Caffeine and sperm motility. *Fertil. Steril.*, 39:845-848.
- Oliphant G, Reynolds AB, and Thomas TS. 1985. Sperm surface components involved in the control of acrosome reaction. *Am. J. Anat.*, 174:269-283.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, and Meizel S. 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160:828-833.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, and First NL. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, 51:1099-1108.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, and First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38:1171-1180.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, and First NL. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol.*

Reprod., 40:1020-1025.

Sliwa LT. 1995. Chemotaction of mouse spermatozoa induced by certain hormones. Arch. Androl., 35(2):105-10.

Thomas P and Meizel S. 1989. Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. Biochem. J., 264:539-546.

Uguz C, Vredenburgh WL, and Parrish JJ. 1994. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate. Biol. Reprod., 51:1031-1039.

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: 127-130.

Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez J, Bermejo-Martinez L. and Vadillo-Ortega F. 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. Fertil. Steril., 64(6): 1183-1188.

박영식. 1996. Progesterone과 BSA를 이용한 동결 정액내 정자의 선별. 한국수정란이식학회지. 11:309-316.

(접수일 : 1999. 1. 6 / 채택일자 : 1999. 2. 27)