

반응성 산소종이 사람 정자의 운동성에 미치는 영향

울지외과대학, 울지병원 의과학연구소¹, 생리학교실², 울지대학병원 산부인과³,
한양대학교 생명과학과⁴

강희규¹ · 김동훈¹ · 한성원¹ · 김묘경¹ · 권혁찬³ · 이호준^{1,2} · 김문규⁴

Effects of Reactive Oxygen Species on Motility in Human Spermatozoa

Hee Gyo Kang¹, Dong Hoon Kim¹, Sung Won Han¹, Myo Kyung Kim¹,
Hyuck Chan Kwon³, Ho Joon Lee^{1,2}, Moon Kyoo Kim⁴

*Euji Medical Science Institute, Euji Medical Center, Seoul 139-711¹, Department of Physiology²
and OB/GYN, School of Medicine, Euji University, Taejon 301-726³, 한양대학교 Department of
Life Science, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791⁴*

Objective: To investigate the effects of ROS on kinematic parameters in human spermatozoa. To verify the changes in above parameters, human spermatozoa were incubated with xanthine-xanthine oxidase (X-XO), H₂O₂, sodium nitroprusside (SNP) or lymphocyte. Otherwise, spermatozoa were incubated under low O₂ (5%) condition.

Methods: CASA was employed to analyze sperm motion parameters.

Results: Under H₂O₂ treatment, all kinematic parameters of spermatozoa were dramatically increased during 30 min, but gradually decreased thereafter. Under the low concentration of H₂O₂ (125 μM and 250 μM), the movement velocity (VAP, VCL, VSL) decreased, but forward movement increased. Under the 1 mM H₂O₂, sperm showed reduced kinematic parameters except during first 30 min of incubation. In the cases of X-XO and SNP treatment, the movement velocity increased but the forward movement reduced. After incubation for 3 hr treatment, the kinematic parameters gradually decreased in high concentration of X-XO. However these parameters maintained or increased in low concentration of X-XO. There was no obvious changes in the above parameters in the high concentration of SNP. In the presence of high concentration of lymphocytes, all parameters decreased. Under the 5% O₂ condition, the parameters of the movement velocity and movement pattern increased, but forward movement decreased. Taken together, it suggested that ROS increased the movement velocity but decreased the forward movement and lateral head replacement. H₂O₂, X-XO, SNP and lymphocyte treatment significantly increased capacitated spermatozoa within 1 h of incubation. There was no significant difference in capacitation between low- and high O₂ group.

Conclusion: The early onset of capacitation in the presence of ROS suggest that ROS might be a positive regulator of sperm capacitation and hyperactivation. These results demonstrate that low concentration ROS facilitates the movement velocity but high concentration ROS was inhibitory.

Key Words: Reactive oxygen species, CASA, Motility, Sperm

포유류에서 사정 직후의 정자는 왕성한 운동성을 나타내지만 난자와의 수정은 불가능하다. 수정 과정이 완성되기 위해서는 정자는 사정 후 반드시

여성 생식수관내에서 일정 시간 동안 머물면서 생리화학적, 기능적인 변화를 겪어야만 한다.^{5,8} 이러한 정자의 변화를 수정능력획득 (capacitation)이라

한다. 수정능력획득과정에서 가장 명확한 현상은 hyperactivation이라 불리는 정자의 매우 극렬한 운동양상이다.²² Hyperactivation은 Yanagimachi²²에 의해서 햄스터 정자에서 밝혀졌다. 활성화 되어졌지만 hyperactivated 되지 못한 정자와 hyperactivated된 정자의 차이는 high-amplitude flagellar waveform에서 찾을 수 있다.^{21,23} 이러한 운동양상은 정자가 난구 세포층과 난자를 뚫고 들어갈 수 있는 적절한 힘을 만들어 주는 것으로 보고되고 있다.^{19,23}

정자의 hyperactivation이 수정능력획득과정에 수반되어지는 현상이지만, 두 사건은 동시에 진행되어지지 않는다. 배양액내 낮은 농도의 bicarbonate를 첨가하여 수정능력획득을 유기시키지만 hyperactivation은 나타나지 않는 것으로 보고되었다.^{6,20} 이는 역설적으로 hyperactivation은 정자가 수정하기 위해 준비하는 과정 중의 하나이며, 독립적으로 진행되어짐을 시사하는 것이라 사료된다.

반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 불완전한 전자쌍을 공유하는 활성화된 free radical의 일종이다. 정자의 막은 많은 양의 불포화 지방산을 함유하고 있어 ROS와 같은 free radical에 의해 지질과산화 (lipid peroxidation) 되어짐으로써 민감하게 반응한다.^{1,2,16} 실제로 생성되는 ROS의 농도에 따라 정자 세포막의 유동성을 떨어뜨림으로써 정자의 운동성이나 침체반응 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{7,9,13,14}

일반적으로 정액의 검사는 정액자동분석기 (CASA)를 이용하여 검사하게 되며, 운동성에 관한 parameter들은 크게 운동속도 (VCL, VAP, VSL), 두부운동 (BCF, ALH), 직진성 (STR, LIN) 등 세가지로 구분되어진다. 정자가 hyperactivation 되어지면 운동속도와 두부운동은 증가되며, 직진성은 감소하는 것으로 알려져 있다.^{7,9} 이러한 운동성의 변화는 부고환을 거치면서 정자의 생리화학적 변화에 의해 억제되어져 있다가 여성 생식수관내에서 활성요소 즉, FPP와 같은 capacitation factor들에 의해 야기되어지는 것인데, 보조생식술을 시행하는 데 있어 정자의 준비과정에서 이러한 요소들이 원심분리와 같은 방법적인 과정으로 인해 줄어들거나 배제되어지게 된다.¹⁷ 이로 인해 정상적인 운동양태를 획득하지 못하는 것으로 사료된다.

정자는 자체적으로 매우 정교하게 조절되어지는 반응성 산소종을 발생하며, 발생되어진 반응성 산소종은 정자의 hyperactivation에 관여하는 것으로

알려져 있다.^{4,11} 그러나 아직까지 어느 정도의 반응성 산소종들이 정상적인 hyperactivation 과정에 관여하는지, 반응성 산소종의 종류와 노출 시간에 따른 영향은 검증되지 않은 상태이다.

본 연구에서는 반응성 산소종이 사람 정자 운동성의 변화에 미치는 영향을 알아보고자 대표적인 ROS 발생물질인 H₂O₂, xanthine-xanthine oxidase와 nitro oxide 발생인자인 sodium nitro prusside, leukocyte와 같은 ROS 발생인자들을 처리하였고, ROS 발생이 자연적으로 감소하리라 예측되어지는 저 산소농도 (5% O₂) 상태에서 정자에서의 운동양태 (kinematic parameters)들을 조사하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상

정액은 비뇨기과로 불임을 주소로 내원한 환자에게서 동의서를 받고 정액검사 후 남은 정액을 냉동보관하여 보관한 뒤 해빙하여 실험에 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 시약 및 배양액

실험에 사용된 배양액은 Ham's F-10에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. H₂O₂, xanthine-xanthine oxidase, sodium nitroprusside 등은 Sigma (St Louis, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다.

2) 반응성 산소종의 처리

반응성 산소종이 수정능력획득, 침체반응 및 DNA에 미치는 영향을 알아보기 위해서 반응성 산소종으로 superoxide anion은 xanthine (X) -xanthine oxidase (XO) system을 X (100 μM), XO (50 mIU ~ 400 mIU) 처리하였고, hydroperoxide는 H₂O₂를 125 μM ~ 1 mM까지 처리하였으며, nitric oxide는 NO donor인 sodium nitroprusside를 0.1 μM ~ 100 μM 처리하였다. 또한 남성불임요인의 하나로 알려진 leukocytospermia에 대한 영향을 알아보기 위해 lymphocyte를 농도별로 1 x 10⁶/ml ~ 4 x 10⁶/ml까지 처리하였다. 일반적인 배양기내 산소농도인 20% O₂ 농도를 생체내 농도와 유사한 5% O₂ 농도로 낮추어서 배양한 후 결과를 분석하였다.

정액은 비뇨기과로 불임을 주소로 내원한 환자에게서 동의서를 받고 정액검사 후 남은 정액을 냉동보관하여 보관한 뒤 해빙하여 실험에 사용하였다. 해빙 후 정자를 얻기 위해 3개층 (50-90-100%)

으로 구성된 percoll 방법으로 2회 원심분리하여 움직이는 정자를 획득하였다. 원심분리는 1400 rpm에서 20분간 1회, 1200 rpm에서 5분간 1회씩 시행하였다. 각각의 실험군에 5×10^6 개의 정자를 분주하여 실험에 사용하였고, 세척 후 운동성이 90% 이상일 경우에만 실험에 적용하였다. 정자를 각각의 실험군에 분주한 후 5% CO₂, 37°C의 배양기 또는 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 37°C 배양기에 넣어 배양하였다.

3) CASA 장비를 이용한 운동성 분석

각 실험군의 정자의 운동양상을 반응성 산소종을 처리한 후 0, 30분, 1시간, 3시간, 6시간에 computer-aided sperm analyzer (CASA, Hamilton thorne, USA)를 이용하여 분석하였다. 정자의 운동양상은 curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), amplitude of lateral head displacement (ALH), average path velocity (VAP), linearity (LIN), straightness (STR), beat cross frequency (BCF) 그리고 total motility 등을 3회 반복 조사하여 평균값으로 조사하였다.

4) 통계적 분석

통계적 유의성은 Chi-square test를 사용하였으며, 유의수준을 5%로 하여 p값이 0.05 보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다.

결 과

1. 처리농도에 따른 kinematic parameter 분석

H₂O₂를 125 μM ~ 1 mM를 농도별로 처리하여 운

동성과 kinematic parameter를 알아본 결과는 다음과 같다. 운동성은 대조군 (87.5±7.5%)에 비해 1 mM 처리군 (18.3±7.6%)에서 급격한 감소를 나타냈으며 (p<0.01), 모든 처리군에서 VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도에 관한 parameter들의 감소되었다. 1 mM 처리군을 제외한 나머지 처리군간에는 모든 parameter에서 유의한 차이가 없었으나, BCF (beat frequency)는 1 mM 군을 제외한 모든 군에서 유의하게 증가하였다. 처리농도간의 차이는 1 mM 처리군에서의 STR과 LIN을 제외한 parameter들에서 급격한 감소가 나타났으며 (Table 1, p<0.01), 처리농도에 상관없이 초기 수치를 유지 또는 증가하는 양상을 보여주고 있다 (Figure 1, p<0.01).

Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO)를 처리농도에 따라 운동성과 kinematic parameter를 알아본 결과는 다음과 같다. 처리농도간의 각기 parameter간의 차이는 없었다. BCF (beat frequency)는 대조군을 제외한 모든 군에서 유의하게 증가하였으나, 저농도 처리군에서 증가 폭이 크게 나타났다 (Figure 2, p<0.01).

NO 처리군에서 처리농도에 따라 운동성과 kinematic parameter에 미치는 영향을 알아본 결과는 다음과 같다. 처리농도간의 각기 parameter간의 차이는 없었다. BCF (beat frequency)는 대조군을 제외한 모든 군에서 유의하게 증가하였으나, 저농도 처리군에서 증가 폭이 크게 나타났다 (Figure 3, p<0.01).

Table 1. Comparison of kinematic parameters of human sperm suspension under low (5%) versus ambient (20%) oxygen tension incubated for 0.5, 1, 3 and 6 hr

Parameter	Treatment							
	0.5 hr		1 hr		3 hr		6 hr	
	20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂	5% O ₂
Motility (%)	87.5±7.5	90.0±7.5	80.0±1.9	86.5±3.5	77.5±8.5	86.5±2.5	66.0±2.0	83.0±2.3
VAP (μm/s)	56.6±7.3	74.4±29.3	64.1±19.1	57.3±25.4	91.6±27.1	63.1±32.8	79.0±35.3	80.5±10.9
VSL (μm/s)	43.4±4.7	55.1±28.6	56.0±10.4	35.9±17.5	66.0±32.4	47.3±19.7	40.1±25.1	65.2±11.8
VCL (μm/s)	84.2±2.9	107.3±31.6*	86.3±39.0	102.5±41.1*	129.0±37.4	101.1±28.4	111.7±48.3	107.0±20.3
VLH (μm)	2.9±2.0	3.0±0.9	2.7±0.8	4.4±0.5*	2.7±0.8	3.1±1.3	3.0±1.0	4.9±1.1
BCF (Hz)	0.0±0.0	6.1±1.5*	13.3±4.7	12.5±2.8	10.0±5.0	16.5±4.3	13.4±8.3	17.1±4.1
STR (%)	78.0±15.0	75.0±21.0	90.0±8.0	65.0±16.0*	70.0±17.0	77.0±15.0	56.0±20.0	81.0±8.0*
LIN (%)	55.0±15.5	85.0±7.2*	67.0±18.8	68.0±12.5	51.0±22.0	73.0±15.1*	36.0±19.8	61.0±3.0*

Data are presented as means ± SEM (n=5). *p<0.01, Chi-square test; compared with untreated control suspension.

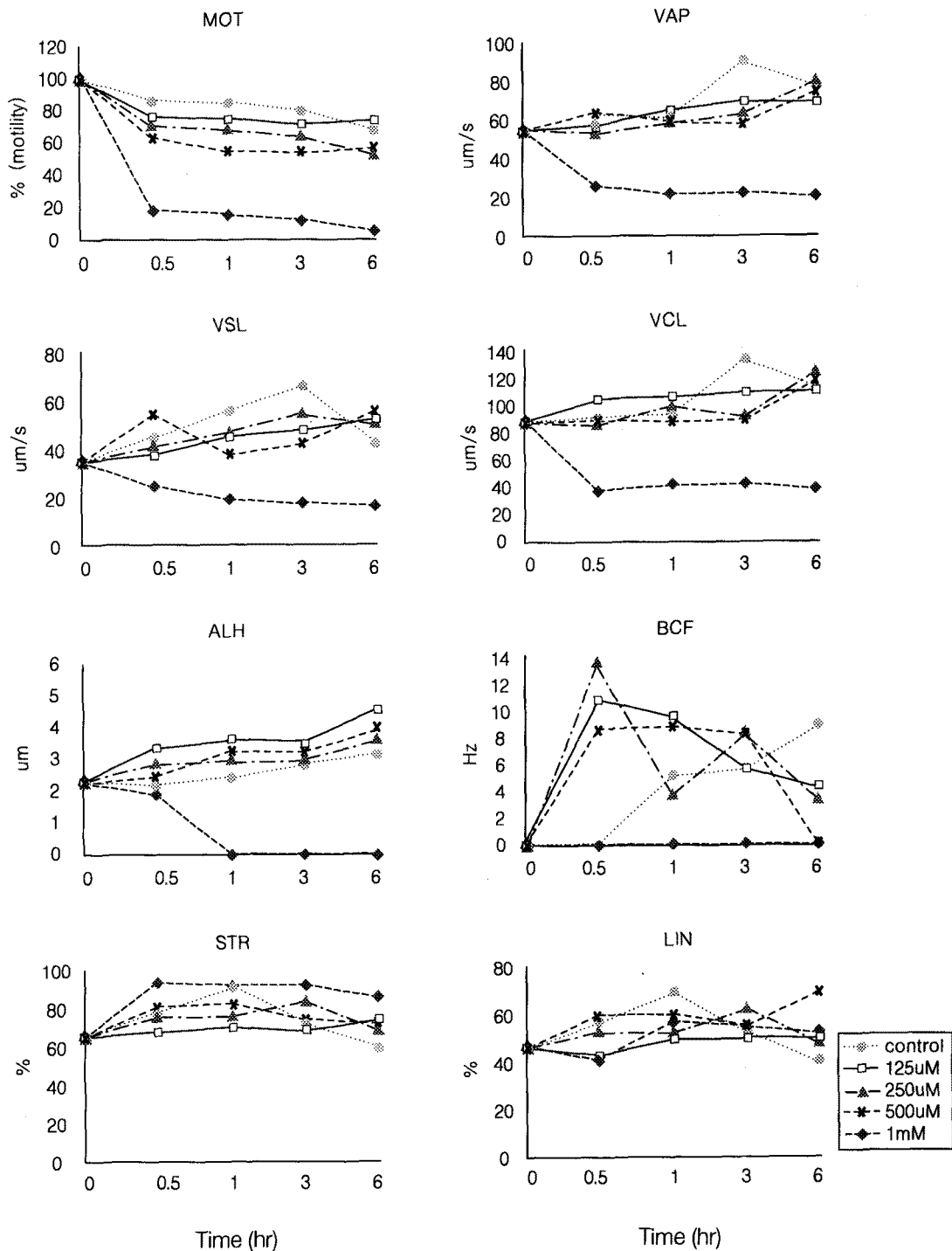


Figure 1. Changes in the kinematic parameters of human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3 and 6 hr in the presence of H_2O_2 (125 μM ~ 1 mM). Each abbreviated word means as MOT, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; ALH, Amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity. Data are presented as means \pm SEM (n=5).

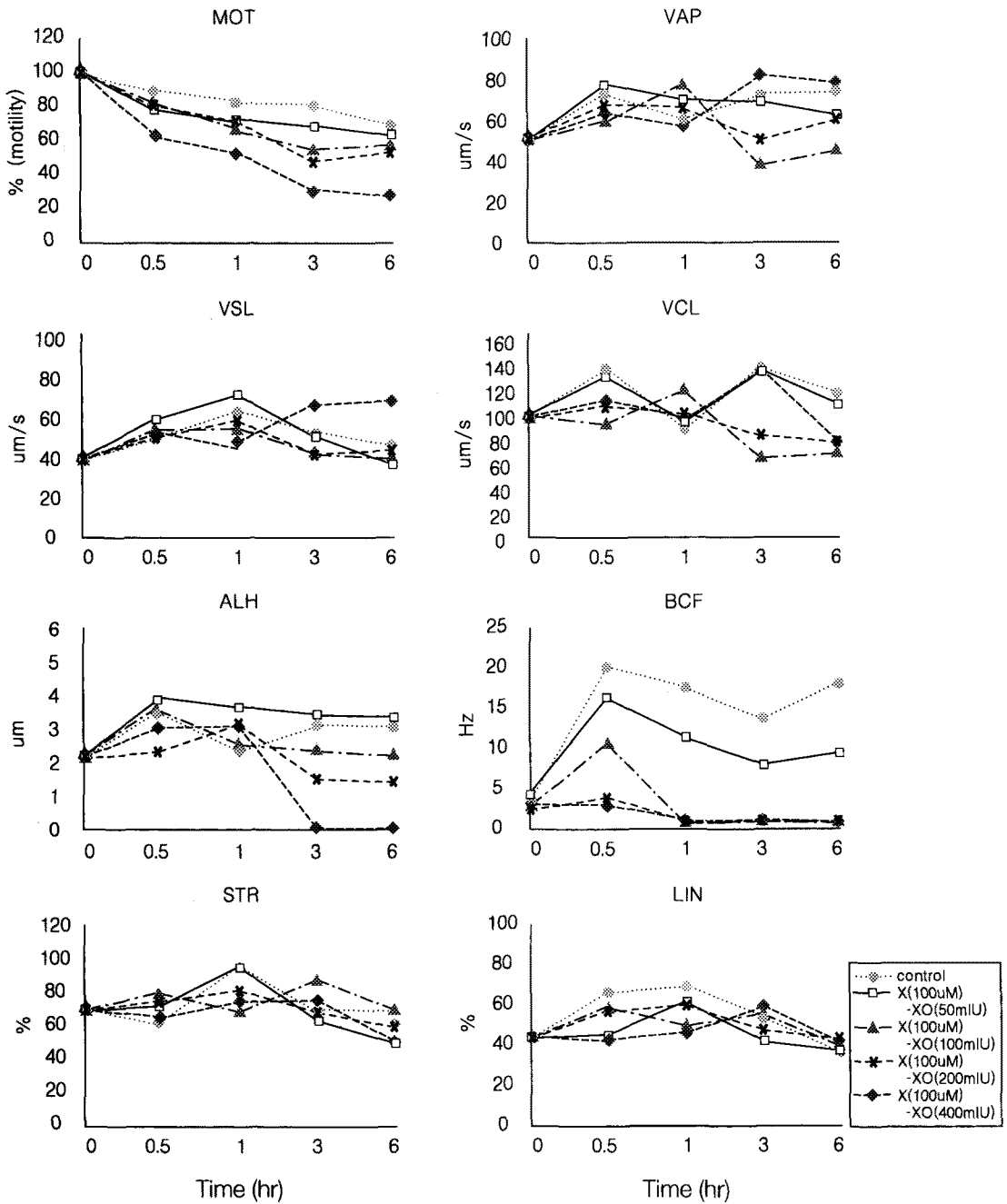


Figure 2. Changes in the kinematic parameters of human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3 and 6 hr in the presence of xanthine (100 μ M) ~ xanthine oxidase (50 ~ 400 mIU). An abbreviated word means as MOT, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; ALH, Amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity. Data are presented as means \pm SEM (n=5).

저농도 처리군에서는 운동속도 (VAP, VCL, VSL) 및 두부운동 (BCF, ALH) 등에서는 대조군보다 증

가하는 양상을 보인 반면, 운동방향 (STR, LIN)에서는 감소하는 것으로 나타났으며, 고농도 처리군

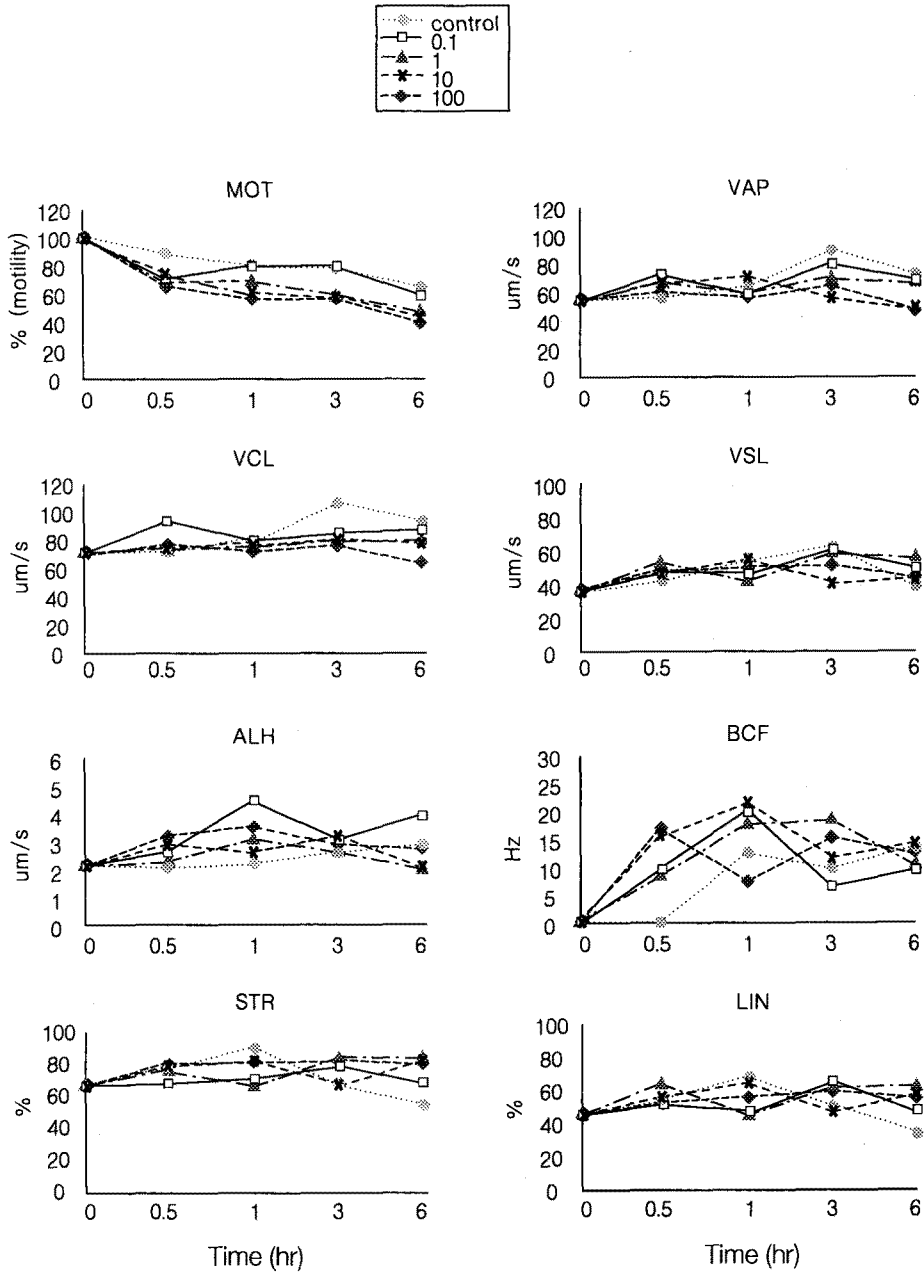


Figure 3. Changes in the kinematic parameters of human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3 and 6 hr in the presence of 0.1 ~ 100 μ M sodium nitroprusside. Each abbreviated word means as MOT, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; ALH, Amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity. Data are presented as means \pm SEM (n=5).

에서 대조군과 차이가 없었다 (Figure 3, $p < 0.01$).

Lymphocyte를 $1 \times 10^6/\text{ml} \sim 4 \times 10^6/\text{ml}$ 까지 처리한

군에서의 처리농도에 따른 운동성과 kinematic parameter의 결과는 다음과 같다. 처리농도간의

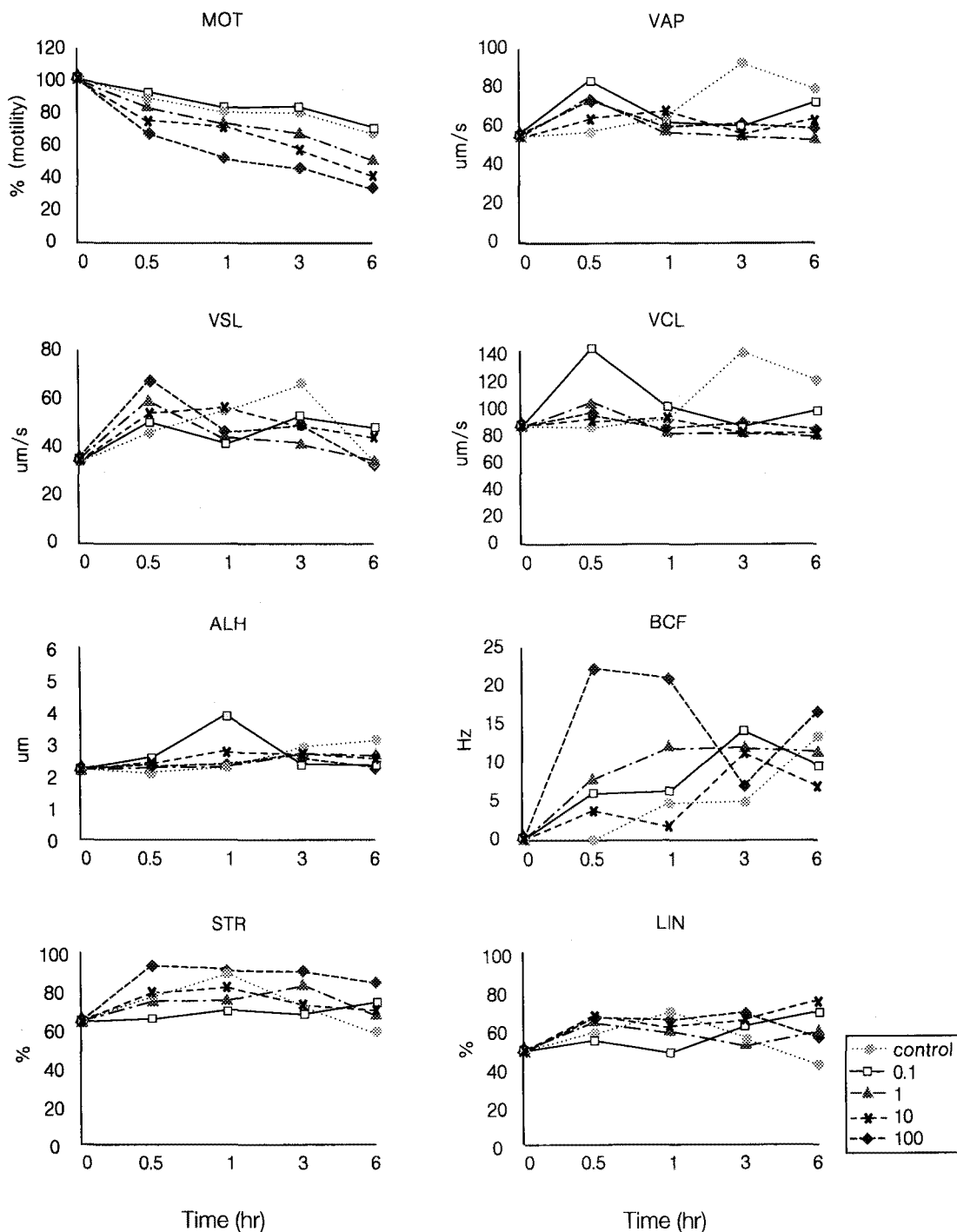


Figure 4. Changes in the kinematic parameters of human sperm suspension incubated for 0.5, 1, 3 and 6 hr in the presence of $1 \sim 4 \times 10^6$ /ml lymphocytes. Each abbreviated word means as MOT, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; ALH, Amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR, straightness; LIN, linearity. Data are presented as means \pm SEM (n=5).

각기 parameter간의 차이는 없었다. BCF (beat frequency)는 대조군을 제외한 모든 군에서 유의하게 증가하였으나, 고농도 처리군 (4×10^6 /ml)에서 증가폭이 크게 나타났다 (Figure 4, $p < 0.01$).

2. 처리시간에 따른 kinematic parameter 분석

1) H_2O_2 처리군

H_2O_2 를 $125 \mu M \sim 1 mM$ 를 30분에서 6시간까지 처리하여 운동성과 kinematic parameter를 알아본 결과는 다음과 같다. 30분 처리군에서 운동성은 대조군 ($87.5 \pm 7.5\%$)에 비해 $1 mM$ 처리군 ($18.3 \pm 7.6\%$)에서 급격한 감소를 나타냈으며 ($p < 0.01$), VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도에 관한 parameter들의 감소되었다. $1 mM$ 처리군을 제외한 나머지 처리군에서는 모든 parameter에서 유의한 차이가 없었으나, BCF (beat frequency)는 $1 mM$ 군을 제외한 모든 군에서 유의하게 증가하였다. 1시간 처리군에서 운동성은 $500 mM$ 처리군 ($49.7 \pm 4.0\%$)과 $1 mM$ 처리군 ($11.7 \pm 3.5\%$)에서 대조군 ($80.0 \pm 1.9\%$)에 비해 유의한 감소가 있었다 ($p < 0.01$). 1시간 처리군에서는 모든 처리군이 대조군에 비해 모든 parameter에 있어 감소하는 양상을 보여 주었다 3시간 처리군과 6시간 처리군에서의 결과도 1시간 처리군의 결과와 유사하게 나타났다. 모든 처리군에서 대조군보다 kinematic parameter들의 감소가 나타났으며, $1 mM$ 처리군에서는 유의한 차이가 있었다. 운동성 및 kinematic parameter 별 변화를 살펴보면, VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도와 관련된 parameter에서는 대조군은 처리시간에 따라 증가하는 모양인 반면에 H_2O_2 처리군에서는 전반적으로 증가폭이 크지 않았다. 또한 대조군 및 H_2O_2 처리 모든군에서 처리 후 3시간까지 증가하다가 감소하는 양상을 보여 주고 있다. BCF는 H_2O_2 처리군에서 처리 후 30분에 급격한 상승을 보인 후 급격하게 감소하는 양상을 보인 반면, 대조군에서 시간이 경과함에 따라 증가하는 양상을 나타냈다. STR과 LIN은 대조군에서는 점차 감소하는 양상을 보였다 (Figure 1, $p < 0.01$).

2) Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO) 처리군

Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO)를 처리시간에 따라 운동성과 kinematic parameter를 알아본 결과는 다음과 같다. 30분 처리군에서 운동성은 대조군 ($87.5 \pm 7.5\%$)에 비해 모든 처리군에서 차이가 없게 나타났다. VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도에 관한 parameter들은 X-XO 처리군에서 대조군에 비해 증

가하는 양상을 보여주고 있다. 1시간 처리군에서 운동성은 고농도 처리군 ($400 mIU, 48.3 \pm 2.9\%$)에서만이 대조군 ($80.0 \pm 1.9\%$)에 비해 유의한 차이가 있었을 뿐 다른 처리군에서는 차이가 없었다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서의 결과도 1시간 처리군의 결과와 유사하게 나타났다. 즉, 저농도 처리군에서는 운동속도 (VAP, VCL, VSL) 및 두부운동 (BCF, ALH) 등에서는 대조군보다 증가하는 양상을 보인 반면, 운동방향 (STR, LIN)에서는 감소하는 것으로 나타났다. 운동성 및 kinematic parameter 별 변화를 살펴보면 운동성 (motility)은 처리시간이 증가함에 따라 대조군을 포함한 모든 군에서 점차적인 감소가 있었으며, 고농도 처리군 (XO: 200, 400 mIU)에서는 보다 급격한 감소가 나타났다. 저농도 처리군 (XO: 50, 100 mIU)에서는 VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도와 관련된 parameter에서는 대조군과 같이 처리시간에 따라 증가하는 모양인 반면에 고농도 처리군에서는 전반적으로 증가폭이 크지 않았다. BCF는 X-XO 처리군에서도 처리 후 30분경에 급격한 상승을 보였으나, 50 mIU 처리군에서는 대조군과 유사하게 나타난 반면, 나머지 군에서는 감소하는 양상을 나타냈다. STR과 LIN은 대조군에서는 점차 감소하는 양상을 보였다 (Figure 2, $p < 0.01$).

3) Sodium nitroprusside (NO donor) 처리군

NO 처리군들을 처리시간에 따라 운동성과 kinematic parameter를 알아본 결과는 다음과 같다. 30분 처리군에서 운동성은 대조군에 비해 모든 처리군에서 차이가 없게 나타났다. VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도에 관한 parameter들은 NO 처리군에서 대조군에 비해 증가하는 양상을 보여주고 있다. BCF (beat frequency)는 대조군을 제외한 모든 군에서 유의하게 증가하였으나, 저농도 처리군에서 증가폭이 크게 나타났다. 1시간 처리군에서 운동성은 고농도 처리군 ($100 \mu M, 55.0 \pm 5.0\%$)에서만 대조군 ($80.0 \pm 1.9\%$)에 비해 유의한 차이가 있었을 뿐 다른 처리군에서는 차이가 없었다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서의 결과도 1시간 처리군의 결과와 유사하게 나타났다. 즉, 저농도 처리군에서는 운동속도 (VAP, VCL, VSL) 및 두부운동 (BCF, ALH) 등에서는 대조군보다 증가하는 양상을 보인 반면, 운동방향 (STR, LIN)에서는 감소하는 것으로 나타났으며, 고농도 처리군에서 대조군과 차이가 없었다. 운동성 및 kinematic parameter 별 변화를 살펴보면 먼저 운동성은 대조군을 포함한 모든 군

에서 점차적인 감소가 나타났다. 저농도 처리군에서는 VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도와 관련된 parameter에서는 처리시간에 따라 대조군과 유사한 양상을 보인 반면, 고농도 처리군에서는 전반적으로 감소하였으나 통계적인 차이는 없었다. BCF는 NO 처리 후 30분경부터 모든 처리군에서 대조군보다 높은 양상을 보여주고 있다. STR과 LIN은 대조군과 차이가 없었다 (Figure 3, $p < 0.01$).

4) Lymphocyte 처리군

Lymphocyte를 $1 \times 10^6/\text{ml} \sim 4 \times 10^6/\text{ml}$ 까지 처리한 군에서의 처리시간에 따른 운동성과 kinematic parameter의 결과는 다음과 같다. 30분 처리군에서 운동성은 대조군에 비해 모든 처리군에서 차이가 없게 나타났다. 1시간 처리군에서 운동성은 고농도 처리군 ($4 \times 10^6/\text{ml}$, $50.3 \pm 5.5\%$)에서만 대조군 ($80.0 \pm 1.9\%$)에 비해 유의한 차이가 있었을 뿐 다른 처리군에서는 차이가 없었다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서의 결과도 1시간 처리군의 결과와 유사하게 나타났다. 운동속도 (VAP, VCL, VSL), 두부운동 (BCF, ALH) 및 운동방향 (STR, LIN)에서 대조군과 차이가 없으며, 처리농도간의 차이도 없었다. 운동성 및 kinematic parameter 별 변화를 살펴보면 (Figure 1~4), 먼저 운동성은 대조군을 포함한 모든 군에서 점차적인 감소가 나타났다. VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도와 관련된 parameter에서는 처리시간에 따라 대조군과 유사한 양상을 보인 반면, STR과 LIN에서는 시간이 경과함에 따라 모든 처리군에서 증가하였다 (Figure 4, $p < 0.01$).

5) Low (5%) O₂ 처리군

5% O₂ 처리한 군에서의 처리시간에 따른 운동성과 kinematic parameter의 결과는 다음과 같다. 운동성은 대조군 (20% O₂)에 비해 차이가 없게 나타났다. VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도에 관한 parameter들은 대조군에서 대조군에 비해 증가하는 양상을 보여주고 있으며, 특히 VCL과 BCF는 대조군보다 유의한 증가를 나타냈다 (Table 1, $p < 0.05$).

운동성 및 kinematic parameter 별 변화를 살펴보면, 먼저 운동성은 5% O₂ 군이 시간이 경과함에 따라 대조군보다 증가하는 양상을 보여주고 있으나 통계적으로 유의하지는 않았다. VAP, VSL, VCL과 같은 운동속도 (VCL, VAP, VSL)와 관련된 parameter에서는 처리시간에 따라 대조군과 유사한 양상을 보인 반면, 운동방향 (STR, LIN)에서는 시간이 경과함에 따라 감소하였으며, 두부운동 (BCF, ALH)에서는 증가하는 양상을 나타냈다 (Table 1).

설치류, 영장류 등과 같은 포유류에서 정자의 hyperactivation에 대한 생리학적인 연구들이 폭넓게 진행되어져 왔다. 정자의 정상적인 hyperactivation을 야기, 유지시키는데는 Ca²⁺, HCO₃⁻, BSA 등과 같은 물질들이 필수적인 것으로 보고되고 있다.^{19,23}

최근 들어서는 정교하게 조절되는 낮은 농도의 ROS는 signal transduction cascade에 관여한다고 보고되고 있으며 (Bauerle et al., 1996; Suzuki et al., 1997), 이러한 역할이 정자의 수정능 (fertilizability)의 획득에 중요하다고 알려지고 있다.²³ 정자가 수정능력획득 (capacitation)과 hyperactivated 운동성을 갖게 되는 것은 ROS에 의해 조절되는 것으로 생각하고 있다.^{3,4,7,9,14}

De Lamirande에 의하면^{9,10} 사람 정자에서의 운동성에 반응성 산소종의 역할은 저농도에서는 운동parameter를 촉진하고, 고농도에서는 억제하는 것으로 설명하고 있으며, 황산화제를 첨가할 경우에 운동성이 촉진되어지는 것으로 확인되고 있으며, 본 연구에서도 xanthine-xanthine oxidase (X-XO)를 농도별로 첨가한 경우의 결과와도 일치한다 (Figure 2). 또한 kinematic parameter의 분석에서 hyper-activation 되었음을 보여주는 운동속도의 증가, 직진성의 감소 그리고 과도한 두부운동과도 같은 양태들이 superoxide anion을 외부적으로 첨가한 경우 뿐 아니라 처리한 모든 반응성 산소종에서, 특히 낮은 농도의 경우 (Figure 2), 공통적으로 나타나고 있음을 확인하였다. 이러한 hyperactivation 양상은 반응성 산소종으로 처리한 직후인 30분부터 1시간까지 운동속도 (VCL, VSL, VAP) parameter들은 증가되나 이후로는 저농도에서는 유지 또는 약간의 감소를 보이거나, 고농도군에서는 점진적인 감소를 보이고 있다 (Figure 2).

본 연구에서 H₂O₂의 경우 (Figure 1)에는 X-XO과는 달리 고농도 처리시에는 운동성, 두부운동 모두가 급격하게 감소하는 것으로 보아 수정능력획득에 관여하는 시점과 생리학적인 조절 농도는 매우 낮은 것으로 추측된다.

NO의 경우, 본 연구에서 고농도 처리군 (100 μM)을 제외하고 VAP, VSL, ALH, LIN 및 STR과 같은 전반적인 운동parameter에서 대조군에 비해 증가되거나 같은 정도를 유지하고 있는 것으로 확인되었다 (Figure 3). NO가 정자 세포막을 지질과산화

시키는 약 영향보다는 세포막의 c-GMP pathway를 통한 운동성 증진의 역할을 수행하는 것이라는 보고¹⁵와 같은 결과라고 사료된다. 아직까지 NO가 직접적으로 수정능력획득에 관여한다는 증거는 아직까지 확립되어 있지 않다. 다만 NO의 경우 정자와의 반응으로 H₂O₂를 생성해 내는 것으로 알려져 있으며,²⁵ 본 연구에서도 결과 (Figure 3)가 H₂O₂ 처리와 같은 궤적으로 나타내는 것으로 보아 Zini²⁵의 추론에 대한 증거라고 사료된다. 아직까지 superoxide anion과 NO가 정자에게서 직접적으로 생성되어지거나 반응하는 것이라는 증거는 없다. 하지만, 배란시 여성의 생식수관내에 산소농도가 잠시 증가한다거나 (Maas et al., 1976), 난포액내 고농도의 NO가 수정 시점의 정자의 운동성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Leukocyte는 생체내에서 가장 강력한 반응성 산소종의 발생체이다. 남성에 있어서 감염 등에 의해 정액내 leukocyte 수가 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 을 초과하는 경우를 불임의 원인으로 정하고 있다. 본 연구에서는 $1\sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ 의 lymphocyte에서는 capacitation을 저해하는 것으로 나타나 지금까지의 결과들과 같은 결과를 얻었으나 $3\sim 4 \times 10^6/\text{ml}$ 의 경우에 보다 더 높은 억제효과를 얻지는 못하였다. 이러한 결과 (Figure 4)는 lymphocyte에서 발생하는 반응성 산소종이 정자의 기능에 영향을 미치는 것이지만 lymphocyte 중에서 주된 반응성 산소종의 발생체인 polynuclear macrophage (PNM)의 비율이 높으나, 낮으냐가 저해 정도를 결정짓는 요인으로 사료된다.^{12,18,24}

또한 저산소농도에서는 다른 반응성 산소종을 처리한 경우와 같은 급격한 운동양상의 변화는 나타나지 않았지만 대조군보다 빠른 시간에서 hyperactivation이 야기되었던 것은 동일한 양상이었다 (Table 1). 이는 반응성 산소종을 처리한 실험에서의 낮은 농도에서 수정능력획득의 빠른 야기와 같은 결과이며, 정자를 세척하거나 단순히 배양기내에서 배양하는 것과 같은 과정 중에서도 고농도 (20% O₂) 산소에 의한 저해요인이 존재함을 나타내는 증거라고 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면, 반응성 산소종은 그 종류에 관계없이 사람 정자의 hyperactivated 운동성을 저농도에서는 증진시키나, 고농도에서는 저하시키는 것으로 나타났다. 특히, 5% O₂에서 20% O₂ 보다 빠른 두부운동의 변화를 일으키는 것을 확인한 결과는 보조생식술을 시행하는데 있어 정

자를 다루는 방법과 과정에 있어 보다 더 세밀하고 정확한 계산이 필요함을 시사한다고 사료된다. 또한 남성불임요인의 하나로 알려진 leukocytospermia와 같은 경우는 그 숫자보다는 실제 영향을 미칠 수 있는 PNM 세포에 대한 검증작업이 더 중요함을 확인할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Aitken J, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 542-51.
2. Aitken J, 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: 441-50.
3. Aitken RJ, Buckingham D, Carreras A, Irvine DS. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in human sperm function. *J Cell Sci* 1995; 108: 2017-35.
4. Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* 1998; 111: 645-56.
5. Austin CR. The capacitation of mammalian sperm. *Nature* 1952; 170: 326.
6. Boatman DE, Robbins RS. Bicarbonate: carbonyl-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reaction. *Biol Reprod* 1991; 44: 806-13.
7. Brize 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.
8. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-8.
9. De Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16: 21-5.
10. De Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C.

- Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidyl choline, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 1998; 19: 585-94.
11. Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate -dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; 56: 707-19.
 12. Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AM. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* 1992; 57: 1058-65.
 13. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Lannou DL. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense system in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 17-26.
 14. Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 1994; 17: 300-7.
 15. Hellstorm WJG, Bell M, Wang R, Sikka SC. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil Steril* 1994; 61: 1117-22.
 16. Jones R, Mann T, 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: 531-7.
 17. Kang HG, Kim MK, Kim DH, Han SW, Choi DY, Lee HJ, Kim MK. Effect of fertilization promoting peptide on kinematic parameters, capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Kor J Fertil Steril* 2000; 27: 201-9.
 18. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species related by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 1994; 62: 387-93.
 19. Si Y, Okuno M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* 1999; 61: 240-6.
 20. Stauss C, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitated penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 1995; 28: 1043-51.
 21. Suarez SS. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 1996; 17: 331-5.
 22. Yanagimachi R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* 1970; 23: 193-6.
 23. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The physiology of reproduction*. New York; Raven Press Ltd. pp 189-317, 1994.
 24. Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonians F, Comhaire FH. White blood cells cause oxidative damages to fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl* 1998; 21: 154-62.
 25. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation *in vitro*. *J Androl* 1995; 16: 424-31.
 26. Baeuerle PA, Rupec RA, Pahl HL. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 1996; 44: 29-35.
 27. Suzuki K, Yanagimachi R. Beneficial effect of medium with high concentration serum for direct sperm injection into mouse oocytes using a conventional pipette. *Zygote* 1997; 5: 111-6.
 28. Maas DH, Storey BT, Mastroianni L. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* 1976; 27: 1312-7.