

T-형 Ca^{2+} 채널 길항제인 Mibefradil을 첨가한 인간 정자의 첨체반응 관찰

¹미래와희망 산부인과, ²비뇨기과 분당제생병원 대진의료재단, ³서강대학교 이과대학 생명과학과
이재호¹ · 손원영³ · 이정하³ · 이인선¹ · 김영찬² · 한징택³

Observation of the Incidence of Acrosome Reaction in Human Spermatozoa Treated with Mibefradil as a T-type Ca^{2+} Channels Inhibitor

Jae-Ho Lee¹, Weon-Young Son³, Jung-Ha Lee³, In Sun Lee¹,
Young Chan Kim², Ching-Tack Han³

¹Mirae & Heemang Obstetrics & Gynecology Clinic, ²Department of Urology,
Pundang Je-Saeng General Hospital, Dae-Jin Medical Center,
³Department of Life Science, Sogang University

Objective: The sperm acrosome reaction is a Ca^{2+} -dependent exocytotic event that is triggered by adhesion to the mammalian egg's zona pellucida. Previous studies suggested a role of Ca^{2+} channels in acrosome reactions. This study was conducted to investigate the T-type calcium channel is operated in acrosome reaction of human spermatozoa.

Method: Human semen samples were obtained from healthy donors with normal criteria. The spermatozoa were divided into five groups: Group 1 were non-treated as a control; Group 2 where spermatozoa were exposed to 5 μ M Ca^{2+} A23187 (Ca^{2+} i); Groups 3 where spermatozoa were exposed 5 μ M Ca^{2+} i and mibefradil; Group 4 where spermatozoa were exposed 5 μ M Ca^{2+} i and nifedipine, and Group 5 where spermatozoa were treated with 5 μ M Ca^{2+} i and both of mibefradil and nifedipine. Spermatozoa in all groups were retrieved after incubation for 15 and 30 minutes at 37°C. After staining with PSA-FITC, fluorescence was observed under a fluorescence microscope, and AR was evaluated on a total >100 spermatozoa/slide.

Result and Conclusion: We observed on acrosome reaction inhibition rate in human spermatozoa the various of concentration of mibefradil, nifedipine. Maximum response was noted with 1.0 μ M mibefradil and the decrease of acrosome reaction inhibition rate 45%. Nifedipine in acrosome reaction inhibition rate was only about 25%. The Ca^{2+} i-induced AR of spermatozoa was significantly suppressed by mibefradil. Incidence of the suppression was depending on concentration of mibefradil. Results from the present study suggest that the human spermatozoa possess T-type channel. The observation that reversible inhibitor of T channels in male germ cells provides a new mechanism of contraceptive action.

Key Words: Human spermatozoa, Acrosome reaction, T-type Ca^{2+} channel inhibitor, Contraceptive action

포유동물의 수정 시 필수적인 첨체반응은 Ca^{2+}
에 의존하여 이루어진다. 이때 정자의 두부에 존

재하는 Ca^{2+} 채널에 의해 Ca^{2+} 이온이 유입되어
첨체막 내부의 pH가 증가되어 protein kinase C

(PKC), protein kinase A (PKA)의 효소가 활성화되고, 연달아 지질분해 효소인 Phospholipases A2 (PLA2), Phospholipases C (PLC) 등이 활성화되어 첨체반응이 일어난다 (Benoff 1998; Baldi et al., 1996; Roldan ERS, 1998; Ou MC, 1994).

현재까지 포유동물의 정자의 첨체반응에 관여하는 Ca^{2+} 채널은 전압의존성 Ca^{2+} 채널 (voltage-dependent calcium channels; VDCC)이며, VDCC 형태는 활성화되는 전압에 따라 고전압에서 활성화되는 형 (L-형 VDCC)과 낮은 전압에 활성화되는 형 (T-형 VDCC)으로 나누어진다 (Benoff 1998, 1999). 지금까지 VDCC에 대한 생물학적 활성 여부는 전기 생리학적인 분석을 통하여 특징지어지는데 L-형 VDCC의 경우 활성이 빨리 되어 오랫동안 유지되는 형의 채널이고, T-형 VDCC는 천천히 활성화되어 빨리 활성이 없어지는 형이다 (Benoff 1998; Goodwin et al., 1999; Publicover et al., 1999).

포유동물 정자에 관여하는 VDCC 형태를 확인하기 위한 연구는 길항제를 사용한 약리학적인 연구와 patch clamp를 사용한 전기 생리학적 연구를 통하여 이루어져 왔다. 포유동물 정자에 L-형 VDCC 길항제인 1,4-dihydropyridines 계열의 약을 사용한 연구를 통하여 정자의 첨체반응에 L-형 VDCC가 관여함을 보고하고 있다 (Benoff, 1998). 그러나 지금까지 연구들의 난점은 이러한 L-형 길항제들이 고농도에서 일반적으로 T-형 Ca^{2+} 채널도 저해한다는 것이다 (Benoff 1999). 또한 전기 생리학적인 분석을 통하여 정자의 첨체반응에 T-형 VDCC가 형태가 주로 관찰된다 (Amoult, 1996; Lievano 1996). 따라서 포유동물 정자의 T-형 Ca^{2+} 채널이 작용할 것이라고 많은 연구자들이 제안은 하여 왔으나 작용기작을 밝히는 특이성이 좋은 약품의 미개발과 T-형 VDCC의 분자 생물학적인 동정이 이루어지지 않아 이 분야로 많은 연구가 집중되어 왔다 (Goodwin et al., 1999; Publicover et al., 1999). 그러나 최근에 T-형 VDCC가 인간과 rat의 신경세포에서 동정, 클로닝과 그 특성이 밝혀졌으며, 이러한 T-형 VDCC를 특이적으로 억제하는 mibefradil 이라는 약이 개발되었다 (Perez-Reyes et al., 1998, Talley et al., 1999).

이에 우리는 T-형 VDCC에 특이적으로 작용하는 mibefradil을 인간 정자의 첨체반응에 적용하여 첨체반응에 T-형 VDCC가 관여하는지 연구하여 보고, 기존에 알려진 L-형 VDCC 저해제인 nife-

dipine과 그 저해 효과를 비교 분석하였다.

연구 대상 및 방법

1. 정액 준비

본원에 방문한 불임부부 중에서 남성불임의 요소가 전혀 없는 정상적인 정액 소견을 보이는 정자를 회수하여 실험에 공시하였다 (n=10). 완전히 액화된 정액을 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS 용액 (Gibco-BRL, USA)으로 2회 세척한 뒤에 운동성이 90%인 정자를 회수하여 $2 \sim 5 \times 10^6/ml$ 이상의 정자 농도로 실험에 공시하였다.

2. 정자의 첨체반응의 유도 측정 방법

1) Ca^{2+} A23187을 이용한 정자의 첨체반응 유도
 Ca^{2+} A23187 (Sigma Chemical Co.)을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 5 mM의 농축된 용액을 만들고, 최종적으로 0.5 ml의 정자 부유액에 5 μM , 10 μM Ca^{2+} 농도로 첨가하여 정자의 첨체반응을 유도하였다. 비교 군에도 5~10 μl 의 DMSO를 첨가하여 같은 조건으로 반응을 유도하였다. 비교 군과 실험 군은 37°C 5% CO_2 의 조건에서 배양하였다.

2) Ca^{2+} 채널 길항제

T-형 VDCC을 특이적으로 저해하는 길항제인 mibefradil (Roche co.)과 L-형 VDCC 특이적으로 저해하는 길항제인 1,4-dihydropyridine계의 시약인 nifedipine을 사용하였다. Ca^{2+} 채널 길항제와 Ca^{2+} A23187를 같이 첨가하고 37°C, 5%, CO_2 의 조건으로 배양하면서 15분, 30분 간격으로 시료를 채취하였다.

3) 정자의 생존 여부 확인 (Hypo-osmotic 검사)

첨체 유도반응 동안에 정자의 생존율을 파악하기 위해 정자 부유액에 hypo-osmotic solution (7.35 g sodium citrate, 13.51 g fructose/L DDW)을 첨가하여 1시간 동안 37°C 배양 후 원심분리로 상등액을 제거하고 0.9% NaCl 용액으로 다시 세척한 뒤에 slide에 도말하였다 (Liu et al., 1996).

4) *Pisum. sativum* agglutinin FITC (PSA-FITC, sigma) 염색을 이용한 첨체반응 결정

Slide에 도포된 정자표본을 95% ethanol 용액으로 고정하였다. 완전히 공기 중에서 건조시킨 후, PBS에 50 $\mu g/ml$ 의 농도에 *P. sativum* agglutinin FITC 용액을 약 60 μl 씩 적하하여 암습 환경에서 약 1시간 동안 정체해 두었다 (Tesarik et al., 1993;

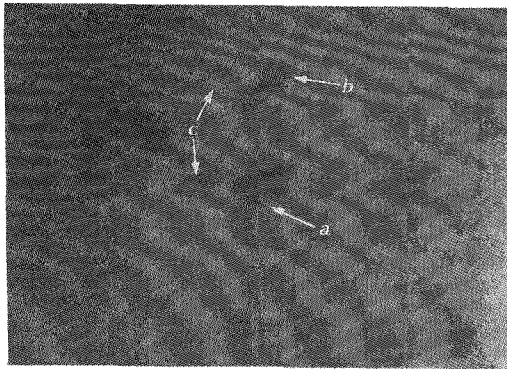


Figure 1. The human spermatozoa stained with PSA-FITC. a. acrosome non-reacted spermatozoa, b. acrosome reacted spermatozoa, c. coiled form: survived sperm

Jaiswal 1999). 염색이 끝난 표본은 증류수로 30초 정도 세척, 건조 후 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였다. 각 표본은 기본적으로 한 정자표본에서 100개 이상의 정자를 계산하였고 이때 정자의 꼬리가 꼬여있는 것만을 살아있는 것으로 간주하여 본 실험의 분석에 포함시켰다 (Benoff et al, 1994; Liu et al., 1996).

결 과

1. PSA-FITC 염색에 의한 인간 정자의 첨체반응 확인

정자의 첨체반응을 확인하기 위한 처리가 끝난 표본에 PSA-FITC 염색을 실시하였다. 이 염색은 첨체반응이 일어나지 않은 정자만 PSA-FITC에 의해 염색이 일어나고 첨체반응이 일어난 것은 염색이 되지 않는다 (Figure 1). 죽은 정자에 대한 첨체반응은 의미가 없기 때문에 살아있는 정자를 구분하기 hypo-osmotic solution 처리로 정자는 꼬리가 꼬인 것만을 분석하였다.

2. Ca^{2+} A23187에 의한 정자의 첨체반응 유도

인간 정자의 첨체반응 유도를 위한 Ca^{2+} A23187의 적정 농도를 결정하기 위하여 1 μ M에서 10 μ M의 Ca^{2+} A23187를 적용하여 첨체반응을 시험하였다. 5 μ M Ca^{2+} A23187 농도에서 정자의 첨체반응이 시간별로 일정하게 증가되고 첨체반응에 유의한 영향을 나타내어 그 이후의 실험은 5 μ M의 Ca^{2+} A23187의 농도로 정자의 첨체반응을 유도하

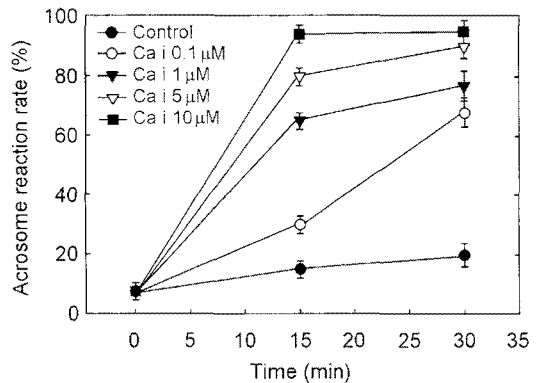


Figure 2. The dose of Ca^{2+} i ionophore concentration for acrosome reaction

였다 (Figure 2).

3. Ca^{2+} 채널 길항제별 정자의 첨체반응의 저해

첨체반응 저해를 위해 L-형 VDCC 길항제는 nifedipine를 T-형 VDCC 길항제로서 mibefradil를 0.1 ~ 1.0 μ M까지 첨가하였다. 첨체반응을 유발하기 위해 5 μ M Ca^{2+} A23187를 첨가하였다. T-형 VDCC인 mibefradil의 경우 첨가한 양에 따라 첨체반응이 감소하였고 1.0 μ M을 첨가한 군에서 최고 $45 \pm 5\%$ 까지 첨체반응이 낮게 일어났다 (Figure 3A). L-형 VDCC 길항제인 nifedipine 첨가 군에서 첨가한 양에 따라서 인간 정자의 첨체반응을 저해하였지만 1.0 μ M을 첨가한 군에서 그 첨체반응 저해율이 $25 \pm 5\%$ 이상이 되지 못하였다 (Figure 3B). 위와 같이 첨체반응을 저해하는데 L-형과 T-형 VDCC 길항제를 동량으로 첨가한 상태에서 T-형 VDCC 길항제가 L-형 VDCC 길항제보다 약 25% 정도 높은 저해율을 보였다 (Figure 3C).

4. L-형과 T-형 VDCC 저해제를 같이 첨가한 경우의 첨체반응의 저해율

L-형 VDCC 길항제인 nifedipine과 T-형 VDCC인 mibefradil를 같이 첨가하였을 때의 저해 효과를 관찰하였다 (Figure 4). 두 시약을 같이 사용하였을 때 인간 정자의 첨체반응에 대한 상승 효과는 없었다. 오히려 T-형 VDCC 억제제를 단독으로 처리한 것보다도 약하게 나타났고 L-형 VDCC 저해제와 비슷한 저해 수준이 나타났다.

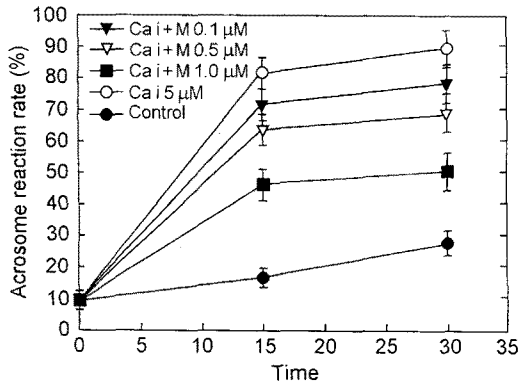


Figure 3A. Dose dependency of mibefradil (T-type VDCC inhibitor) on the acrosome reaction inhibition (Ca i: calcium ionophore, M: Mibefradil)

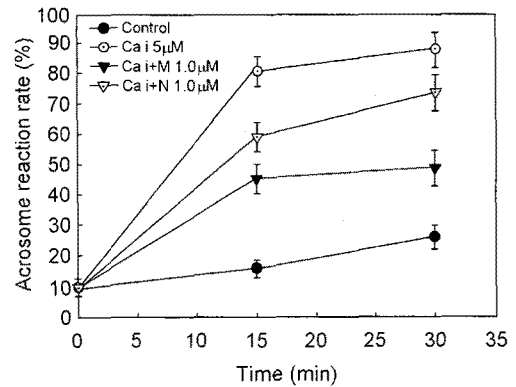


Figure 3C. The compare of acrosome reaction inhibition: T-type VDCC vs L-type VDCC (Ca i: calcium ionophore, M: mibefradil, N: nifedipine)

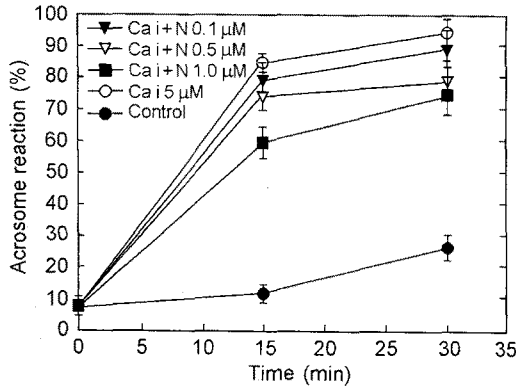


Figure 3B. Dose dependency of nifedipine (L-type VDCC inhibitor) on the acrosome reaction inhibition (Ca i: calcium ionophore, N: nifedipine)

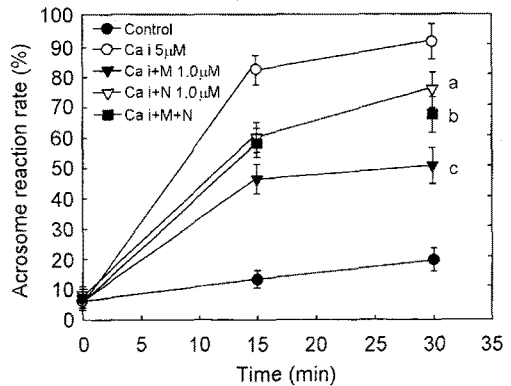


Figure 4. The combination treatment of T-type, L-type VDCC inhibitor (Ca i: calcium ionophore, M: mibefradil, N: nifedipine, M+N: mibefradil+nifedipine) (a:b = $p < 0.16$, b:c = $p < 0.0001$)

고찰

본 연구는 T형 VDCC에 대한 길항제인 mibefradil을 사용하여 인간 정자의 침체반응에 T형 VDCC가 작용하고 그 작용의 정도가 L형 VDCC보다 강한 저해 효과를 나타내어 T형 VDCC가 인간 정자의 침체반응에 주로 작용하는 것임을 증명하였다.

정자두부에 존재하는 VDCC는 기본적으로 4개의 단위(알파-1, 알파-2, 베타, 델타)로 구성되어 있다 (Benoff 1998). 특히 알파-1 단위는 알파-1 A, B, C, D, E, F, G, H, I 등의 단위가 있는데 이것의 조합에 의해 VDCC형이 결정된다 (Benoff 1998;

Publicover et al., 1999). 알파-1은 salt bridge 형태를 만들어 이온 채널 개방을 조절하는데 대부분의 Ca^{2+} 채널 길항제들은 이 부분에 결합하여 이온의 유입을 차단하고 VDCC의 알파-1 단위의 형질에 따라 Ca^{2+} 채널 길항제들이 저해 특이성이 결정이 된다 (Benoff 1998; Baldi et al., 1996).

본 연구에 사용된 mibefradil은 기존의 약품에 비해 T-형에 특이적으로 작용하는 것으로, 인간 정자의 침체반응에서 mibefradil 처리 시 현저하게 침체반응이 저해되었고, L-형 VDCC를 저해하는 nifedipine에 대한 정자 침체반응 저해율과 비교하여도 mibefradil이 약 25% 이상 높게 저해되는 것으로 관찰되어 인간 정자의 침체반응에 주로 T-형

VDCC가 작용하는 것으로 생각된다.

같은 양의 nifedipine과 mibefradil를 혼합하여 첨가한 실험에서 첨체반응의 저해율이 낮게 나타난 것에 대해서는 약물의 특성 때문인지 아니면 첨체반응에 관여된 Ca^{2+} 채널에 대한 약물의 친화도 차이 때문인지 대한 원인 분석은 현재로서 확인하기 힘들고 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 실험에선 Ca^{2+} A23187을 이용한 인위적인 정자 첨체반응 유도에 의한 실험이었다. 하지만 앞으로 Ca^{2+} 채널 길항제인 mibefradil과 같은 약물들은 실제적인 피임제로 사용하기 위해서는 자궁이나 난관에 조건에 존재하는 progesterone과 난자의 투명대 ZP3 성분을 이용한 첨체반응 유도에서 어떻게 얼마만큼의 첨체반응 저해를 보이는데에 대한 분석이 진행되어야 할 것이다 (Liu et al., 1996). 체내에선 정자가 난자를 만나 최초의 정자 첨체반응을 자극하는 것이 투명대의 ZP3에 의해 자극이 되고 정자의 progesterone 수용체에 대한 progesterone 반응으로 Ca^{2+} 채널이 활성화되어 이온 유입이 증가한다. 이러한 조건을 체외에 재현한 상태로 정자 첨체반응을 유도하여 Ca^{2+} 채널 길항제인 mibefradil의 효과를 분석함으로써 보다 실질적인 피임제로서의 사용 여부를 검증할 수 있을 것이다 (Garcia et al., 1999; Jaiswal et al., 1999).

Benoff (1994) 등 보고에 의하면 28세의 원인불명의 불임 환자에서 남성의 약물복용 여부를 살펴본 결과 nifedipine를 고혈압 치료제로서 복용하고 있었다 (Benoff et al., 1994; Hershlag et al., 1995). 이 환자의 경우에 15개의 MII 난자가 모두 미 수정되는 결과를 보였다. 이 경우에 정장액 내에서 nifedipine을 측정하지는 못하였지만, 혈액 내의 평균 $0.5 \mu M$ 의 정도가 있는 것을 확인할 수 있었다 (Benoff et al., 1994; Hershlag et al., 1995). 본 실험에서 mibefradil의 인간 정자 첨체반응 저해율이 nifedipine 보다 강하게 저해하는 것으로 나타나 T-형 VDCC에 대한 Ca^{2+} 채널 길항제를 사용한다면 L-형 VDCC을 저해하는 것보다 더 강한 피임제로서의 효과를 볼 수 있다고 생각된다. 그러나 피임제로서 T-형 VDCC에 대한 Ca^{2+} 채널 길항제를 사용하기 위해서는 정자 첨체막의 VDCC에 보다 특이적으로 작용하는 약물의 개발과 약물전달시스템을 개발하여 다른 부분에 작용 없이 정자의 첨체반응만을 저해할 수 있는 방법을 개발해야 할 것이다.

결 론

결론적으로 본 실험은 T-형 VDCC인 mibefradil에 의해 인간 정자의 첨체반응이 강하게 저해되는 결과를 통하여 인간 정자의 첨체반응에서 T-형 VDCC가 정자의 첨체막에 존재하여 첨체반응에 관여함을 알 수 있었다. L-형 VDCC 길항제인 nifedipine과 T-형 VDCC인 mibefradil이 인간 정자의 첨체반응에 미치는 영향에 대한 비교 연구를 통하여 T-형 VDCC가 인간 정자의 첨체반응에 주로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 인간 정자의 첨체막에 T-형 VDCC의 존재와 작용하는 기전을 더욱 이해하기 위해서는 인간 정자에 대한 전기 생리학적, 분자 생물학적인 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, et al. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Pro Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13004-9.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience* 1996; 1: d189-205.
- Benoff S, Rosenfeld DL, Cooper GW, Scholl GM, et al. The effect of Calcium ion channel blockers on sperm fertilization potential. *Fertility and Sterility* vol. 62, no. 3, sep, 1994.
- Benoff S. Voltage dependent Calcium channels in mammalian spermatozoa. *Frontiers in Bioscience* 1998; 3: d1220-40.
- Foresta C, Rossato M. Calcium influx pathway in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 1997; 3: 1-4.
- Garcia MA, Meizel S. Progesterone-Mediated Calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: Pharmacological investigation of T-type Calcium channels. *Biology of Reproduction* 1999; 60: 102-9.
- Gorden Baker HW, Liu DY. A simple method for assessment of the human acrosome reaction of

- spermaotoza bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Human Reproduction* 1996; 11: 551-7.
- Goodwin LO, Leeds NB, Guzowski D, et al. Identification of structural element of the testis-specific voltage dependent calcium channel that potentially regulate its biophysical properties. *Molecular Human Reproduction* 1999; 5: 311-22.
- Hershtlag A, Cooper GW, Benoff S. Pregnancy following discontinuation of a calcium channel blockers in the male partner. *Human Reproduction* 1995; 10: 599-606.
- Jaiswal BS, Eisenbach M, Tur-kaspa I. Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Molecular Human Reproduction* 1999; 5: 214-9.
- Liu DY, Baker HWG. A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermaotoza bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Human Reproduction* 1996; 11: 551-7.
- Meizel S, Garcia MA. Progesterone-mediated Calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type Calcium channels. *Biology of Reproduction* 1999; 60: 102-9.
- Ou MC. Acrosome reaction in the head-attached human sperm. *Andrologia* 1994; 26: 17-20.
- Roldan ERS. Role of phospholipase during sperm axonal exocytosis. *Frontiers in Bioscience* 1998; 3: d1109-19.
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 1998; 391: 896-900.
- Publicover SJ, Barratt CLR. Voltage-operated Ca²⁺ channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do? *Human Reproduction* 1999; 14: 873-9.
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, et al. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *The Journal of Neuroscience* 1999; 19: 1895-1911.
- Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. *Fertility and Sterility* 1993; 2: 424-30.