

## 돼지 정액의 동결시 Taurine과 $\alpha$ -Tocopherol 첨가가 동결·융해 정자의 성상과 기능에 미치는 영향

신현아<sup>1</sup> · 김창근<sup>1,2</sup> · 정영채<sup>1</sup> · 방명걸<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 산업과학대학 동물자원과학과

### 초 록

본 연구는 돼지 정자 동결시 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 첨가가 융해후 정자 성상과 정자 기능, 활성산소계(reactive oxygen species; ROS)의 발생 정도 및 지질 산화(lipid peroxidation, LPO)에 미치는 영향을 구명하기 위하여 시행하였다. 1차 및 2차 희석액내 taurine과  $\alpha$ -tocopherol이 첨가된 돼지 동결정액의 융해 후 정자 운동성 양상, 정자 생존성, 정자 막의 온전성 및 침체 반응을 측정하였으며, ROS의 발생 양상 분석과 LPO 정도의 분석을 위한 malondialdehyde의 측정 기법을 적용하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Taurine(25mM, 50mM),  $\alpha$ -tocopherol(500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M) 단일처리군 그리고 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군(25mM~500  $\mu$ M, 50mM~1,000  $\mu$ M)은 동결·융해 후 대조군과 비해 정자 운동성과 생존성은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군 50mM~1,000  $\mu$ M에서 HOST, 침체 반응이 대조군과 비교하여 유의차는 인정되지 않았으나 다소 증가하였다. 동결·융해 정자의 ROS 발생 억제를 위한 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 모든 처리군은 대조군과 비교하여  $\cdot O_2^-$  발생을 유의적으로 완화시키지 못하였다. 그러나 taurine 단일처리군(25mM),  $\alpha$ -tocopherol 단일처리군(500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M)과 혼합처리군(25mM~50mM, 50mM~1,000  $\mu$ M)은  $H_2O_2$ 의 발생을 대조군과 비교하여 유의적으로 완화시켰다( $P<0.05$ ). 동결·융해 정자의 malondialdehyde의 생산은 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 모든 처리군에서 대조군과 비교하여 유의적인 감소를 보였다( $P<0.05$ ).

이상의 결과를 종합해 보면 돼지 정액의 동결보존시 taurine와  $\alpha$ -tocopherol 같은 항산화제의 처리는 ROS 발생과 LPO를 효과적으로 완화시킴에 따라 돼지 정액의 동결보존 효율을 증진시킬 수 있는 유용한 방법이라 사료된다.

(주제어 : Sperm, Freezing, ROS, Taurine,  $\alpha$ -tocopherol)

### 서 론

지난 수년간 돼지 액상 정액(liquid semen)의 보급율은 크게 향상되어 왔으며 양돈산업과 돈육 생산의 상업적, 경제적인 가치가 증가하면서 인공수정시 사용되는 돼지 정액의 동결보존에 대한 필요성이 점차 중요해지고 있다. 동결 정액은 경제 형질이 우수한 계통의 개량과 보존에 이용될 수 있으며 정액의 수송이 간편하고, 보존성이 짧은 액상 정액의 문제점을 보완할 수 있는 장점을 지니고 있다. 그러나 현재 동결 정액을 이용한 인공수정은 액상 정액과 비교하여 수태율과 산자수에 있어서 만족할 수준에 못 미치고 있다(Gilmore 등, 1996).

포유동물에 있어서 정자 원형질막(plasma membrane)의 온전성(integrity)은 수정시 정자의 수정 능력뿐만 아니라 정자의 대사 작용에도 중요한 역할을 한다(Jeyendran 등, 1984). 정자가 난자 안으로 들어가기 위해서는 정상적이고 기능적인 정자막이 요구된다. 그러나 동결보존과 융해는 정자막의 손상 및 정자의 운동성과 기능을 손상시킨다(Hammersted 등, 1990).

돼지 정액의 동결과 융해 과정에서 정자의 전해질 대사

에 심각한 변화와 손상을 일으키며 정자 두부막의 변화를 초래한다. 또한 동결 과정 중 저온 충격(cold shock)은 돼지 정자의 침체막(acrosomal membrane)과 원형질막의 지질(lipids), 특히 인지질(phospholipids)을 방출시킨다. 정자막의 파괴는 양이온(cation)의 흡수나 방출에 장애를 받게 되며, 침체 내용물(acrosomal content) 및 대사활성에 중요한 침체내 proteinase의 손실을 초래한다(Bwanga, 1991; Woelders, 1997). 따라서 돼지의 정자 막은 동결·융해 후 정자의 활력과 생존성, 수정 능력 및 대사 기능에 중요한 역할을 한다(Bwanga, 1991).

최근에는 동결 보존으로 인한 정자막의 지질 산화(lipid peroxidation, LPO)가 정자의 운동성, 구조적 온전성(structural integrity) 및 생존성을 급격히 감소시키는 것으로 보고되어 있다(Alvarez와 Storey, 1992). 이와 같은 LPO는 대사 과정 중에 발생하는 활성산소계(reactive oxygen species, ROS)의 영향으로 나타난다(Aitken 등, 1989). 포유동물의 정자는 다중 불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid)을 많이 가지고 있지만, 상대적으로 적은 항산화제(antioxidant)를 가지고 있기 때문에 ROS의 유해한 영향에 매우 민감하게 반응한다(Lenzi 등, 1996). 따라서

\* 이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

<sup>2</sup> 중앙대학교 생명환경연구원(BET Research Institute, Chung-Ang University, Ansung, Korea).

<sup>†</sup> Corresponding author : Dr. M. G. Pang, Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung, 456-756, Korea., TEL: +82-31-670-4841, FAX: +82-31-675-9001, E-mail: mgpang@cau.ac.kr

산소 대사과정을 통해 발생된 ROS은 정자막을 손상시켜 LPO를 유발한다(Jeulin 등, 1989). 최근에는 ROS로 인해 발생하는 LPO의 악영향을 완화시킬 수 있는 다양한 생물학적, 화학적 항산화제들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Griveau와 Lannou, 1997; Cerolini 등, 2001; Roca 등, 2004; Pena 등, 2004, Breininger 등, 2005).

정자와 정장 내에 존재하는 복합 항산화제 계통(complex antioxidant system)은 정상적인 상태 하에서 발생하는 ROS을 완화할 수 있는 기능이 있다(Cerolini 등, 2000). 그러나 어떤 이상으로 인하여 항산화제가 부족하거나 과도한 ROS가 발생될 경우 정자는 심각한 손상을 받게 된다. 정자막에 악영향을 미치는 산화 작용이 강력한 ROS의 종류로는 superoxide anions( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peroxy radical ( $\text{ROO}\cdot$ ) hydroxyl radicals( $\cdot\text{OH}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 불안정 산화 지방 등이 알려져 있다(De Lami-rande와 Gagnon, 1995). 이와 같은 ROS의 악영향을 완화시키는 가장 대표적인 효소계 항산화제로서는 superoxide dismutase(SOD)와 catalase가 있다(Sikka 등, 1995).

비효소계 항산화제로는 albumin, glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid, taurine, hypotaurine 및 mercapturic acids 등이 알려져 있다(Lenzi 등, 1996). 이들 중  $\alpha$ -tocopherol(Vitamin E)은 가장 대표적인 비효소계 항산화제로서 주로 세포막에 존재하고 있다(Palamanda와 Kehrer, 1993).  $\alpha$ -tocopherol은 chain-breaking 항산화제의 기능을 가지고 있어 lipid peroxy( $\text{ROO}\cdot$ )과 alkoxyl radicals( $\text{RO}\cdot$ )를 제거하여 LPO의 연쇄반응을 억제하고, 또한 다른 scavenger antioxidant enzyme 생성에 도움을 준다(Ernmster 등, 1992). 다양한 세포에서 발견되는  $\alpha$ -tocopherol은 세포 내에서의 그 기능이 잘 알려져 있는데 반하여 포유동물 정자에서의 기능은 잘 알려져 있지 않다(Therond 등, 1996).

정자를 보호하는 것으로 알려진 또 다른 성분은 sulfonic amino acids인 taurine, hypotaurine이 있다. Taurine과 hypotaurine은 포유동물의 융성 및 자성 생식기내 조직과 체액에서 높은 농도로 발견되며, LPO로부터 정자를 보호하는 역할을 한다(Casslen, 1987). 특히 taurine은 포유동물의 정자에서 항산화제의 역할뿐만 아니라 정자의 삼투압과 이온을 조절하는 중요한 기능이 있다고 보고되었다(Sturman와 Hayes, 1980). 그리고 hypotaurine은 세포내  $\cdot\text{O}_2^-$ 와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 제거하므로써 이들 ROS에 의한 LPO로부터 정자를 보호하는 역할을 한다(Huxtable, 1992).

본 연구는 돼지정액의 동결효율을 높이기 위하여 시도 되었으며 동결 보존액에 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 첨가가 융해후 정자의 생존성, 저장액내 정자막의 온전성, ionophore에 반응하여 야기된 침체반응을, 정자 내·외의 ROS 발생 정도와 LPO에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시정액

본 실험에 공여된 돼지 정액은 축산기술연구소 종축개

량부에서 사육중인 Yorkshire 종 종모돈 5개체로부터 제조된 0.5mL straw의 동결정액을 공시하였다.

### 돼지 동결정액의 제조

#### 1) 1차 및 2차 희석액의 제조

1차 희석액인 20% egg york lactose 용액은 당일 생산된 계란의 난각 표면을 70% 알콜로 소독한 후 난백을 제거한 난황과 미리 제조된 11% lactose (Sigma, USA) 용액을 1 : 4로 혼합하여 제조하였다. 그 후 4,000 $\times$ g에서 20분간 원심분리 후 상층액을 Miracloth filter에 여과시켰다. 2차 희석액인 7.5% glycerol 및 1.3% OEP 용액 제조(DFD)는 1차 희석액을 비이커에 넣은 후 glycerol(Sigma, USA) 용액을 첨가하였다. 여기에 OEP(Equex STM, NOVA CHEMICAL, USA) 용액을 첨가하였다. 그 후 실온에서 교반을 실시하여 최소 1시간 동안 희석 후 플라스틱 용기에 넣어 사용 전까지 냉동 보관하였다.

#### 2) Taurine과 $\alpha$ -Tocopherol의 제조 및 희석액내 첨가

돼지 정액 동결 시 1차 및 2차 희석액에 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 첨가가 융해된 돼지 정자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 taurine,  $\alpha$ -tocopherol의 농도별 단일처리 그리고 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 농도별 혼합 처리를 실시하였다. Taurine(Sigma, USA)은 1차 및 2차 희석액에 최종 농도가 25mM, 50mM이 되도록 첨가하였다.  $\alpha$ -tocopherol(Sigma, USA)은 ethanol에 용해하여 stock solution 100mM을 제조한 후 1차 및 2차 희석액에 최종 농도가 500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M이 되도록 첨가하였다. 이때 희석액에 들어가는 ethanol의 농도는 1%를 초과하지 않았다. Taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 농도별 혼합처리는 25 mM~500  $\mu$ M, 50mM~1,000  $\mu$ M로 실시하였다.

#### 3) 동결정액의 제조

돼지 정액은 수압법을 이용하여 채취하였다. 채취된 정액은 정액량과 정자 농도를 측정한 후 원정액에 미리 제조된 1차 희석액을 점진적으로 희석한 후 500 $\times$ g에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 제거하고 총활력 정자수를 계산하였다. 35 $^{\circ}$ C의 따뜻한 물이 담긴 200mL 비이커 내에 1차 희석된 정액 시험관을 넣은 후 냉장 보관하여 약 2시간 동안 4~7 $^{\circ}$ C로 냉각하였다. 냉각된 희석정액에 2차 희석액(4 $^{\circ}$ C 상태)을 서서히 혼합 희석하였다. Straw 내부 중간에 공기층이 남아 있도록 최종 희석된 정액을 0.5mL straw 내에 포장한 후 포장된 straw 내의 정자가 glycerol과 충분히 접촉하도록 1시간 동안 평형시켰다. Straw를 액체질소 표면 15cm 위에 20분간 정치시켜 예비동결을 시킨 후 액체질소(-196 $^{\circ}$ C) 내에 침적시켰다.

### 정액 성상 및 정자 기능 검사 방법

#### 1) 기본 배양액

본 연구에서는 20mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethane sulphonic acid(HEPES; Sigma, USA), 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ (Sigma, USA)와 0.1% polyvinyl alcohol

(PVA; Sigma, USA)이 첨가된 Biggers Witten Whittingham(BWW) 배양액(Biggers 등, 1971)을 전체 연구의 기본 배양액으로 사용하였다.

**2) 정액 처리**

본 연구 전반에 걸친 기본적인 정액 처리 방법은 다음과 같다. 돼지 동결정액의 용해는 37°C 수조에서 20초간 실시하였으며, 용해 후 5mL를 기본 배양액으로 희석하여 원심분리(500×g, 5 min)를 실시하였다. 상층액을 제거하고 정자괴를 잘 풀어준 후 2mL의 기본 배양액으로 희석하여 2차 원심분리(300×g, 5 min)를 실시하였다. 이후 기본 배양액으로 각각의 실험에 맞는 적절한 정자농도로 희석하여 추후 실험을 진행하였다.

**3) 컴퓨터를 이용한 정자 운동성 분석(Computer-Aided Sperm Analysis: CASA)**

CASA는 전처리된 정액 10μL를 미리 37°C로 가열된 makler counting chamber(Sefi medical instrument, Israel) 위에 떨어뜨린 후 TI-23A CCD 카메라(NEC, Japan)가 부착된 위상차 현미경(Olympus, Japan)에 연결된 CTS-60/200 system(Motion Analysis, USA)을 이용하여 시행하였다.

**정자의 저장액 처리(Hypo-Osmotic Swelling Test; HOST)**

HOST는 Jeyendran 등(1984)의 방법에 준하여 시행하였다. 개체당 전처리된 정액을 최종 삼투압 150 mOsm/kg으로 제조된 저장성 용액과 혼합한 후 37°C의 수조 내에서 30분간 배양하였다. 이후 500×g에서 5분간 원심분리하였으며, 상층액을 제거한 후 정자괴를 잘 풀어준 후 10μL를 취하여 깨끗한 슬라이드에 도말하고 실온에서 건조시켰다.

**정자의 침체반응 분석**

**1) Stock Solution의 제조**

Calcium ionophore A23187(A23187; Sigma, USA)을 최종 농도 5mM/l stock solution을 제조한 후 Eppendorf tube에 20μL씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 사용 당일 분주된 20μL의 stock solution에 4.98mL의 기본 배양액을 첨가하여 최종 농도 20μM/L의 A23187 용액과 대조군으로는 4.98mL의 기본 배양액에 DMSO 20μL를 첨가한 용액을 제조하여 사용하였다. Hoechst 33258(H33258; Sigma, USA)을 기본 배양액으로 1mg/mL의 농도로 조정된 후 분주하여 -20°C에 보관하였다. 사용 당일 분주된 stock solution을 기본 배양액으로 희석하여 최종농도 1 μg/mL로 조정된 후 사용하였다.

**2) 침체반응**

침체반응 분석은 Cummins 등(1991)의 방법에 준하여 시행하였다. 전처리된 정자 부유액을 반분하여 각각을 동량의 20μM/L A23187 용액(최종 농도 10μM/L)과 DMSO 용액으로 희석하여 30분간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 배양하였다.

**3) 정자염색 및 침체반응 분석**

배양 후 정자 부유액에 동량의 H33258 용액을 첨가하여 상온에서 어두운 상태를 유지하면서 7분간 염색하였다. 이후 정자 부유액을 PBS로 희석된 2% polyvinyl pyrrolidone(Sigma, USA) column 위에 올려 놓고 500×g로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 정자괴를 잘 풀어준 후 20μL를 취하여 슬라이드 위에 도말, 건조시킨 후 95% ethanol에서 5분간 고정하였다. 고정, 건조된 슬라이드 위에 FIAT-PSA(100 μg/mL) 100μL를 떨어뜨린 후 4°C moist chamber에서 15분간 정치시켰다. 증류수로 염색액을 세척하고 건조시킨 후 정자에 염색된 형광이 사라지는 것을 방지하기 위하여 propyl gallate mountant로 봉입하였다. 슬라이드의 관찰은 mercury burner와 epi-illumination module이 장착된 형광 현미경(Olympus, Japan) 하에서 H33258 염색에 의한 정자 생사 여부 관찰하였다.

**4) ROS의 발생 측정**

ROS의 발생은 chemiluminescence 방법으로 측정하였다(Aitken 등, 1992). Chemiluminescence signal은 LB950 luminometer(Berthold, German)를 이용하여 3초간의 integration mode로 기록하였다. ROS 측정을 위한 probe는 luminol(5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione; Sigma, USA)과 lucigenin(10,10'-dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate; Sigma, USA)을 사용하였다. 이들 두 probe의 stock solution은 DMSO로 희석하여 25mM로 제조하였다. Luminol을 이용한 정자에서 발생된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 측정은 전처리된 400μL의 정자 부유액(10×10<sup>6</sup> spermatozoa/mL)에 luminol stock solution 4μL(최종 농도 250μM)와 세포 외에 존재하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 분석도를 높이기 위하여 PBS로 희석된 8μL의 horseradish peroxidase(최종 농도 12.4U; Sigma, USA)를 첨가한 후 luminometer에서 10분간 signal을 측정하였다. Signal이 안정화 되면, ROS의 발생을 증진시키기 위하여 DMSO에 녹아 있는 4μL(최종 농도 100nM)의 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma, USA)를 첨가하여 10분간 signal을 재측정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생 양상 분석은 PMA 첨가 후 10분간 측정된 chemiluminescence counts에서 최고(peak)값과 최고값을 포함하는 5분간의 합계값으로 하였다. Lucigenin을 이용한 ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 측정은 전처리된 400μL의 정자 부유액에 lucigenin stock solution 4μL(최종 농도 250μM)를 첨가한 후 luminometer에서 10분간 signal을 측정하였다. Signal이 안정화 되면, 4μL의 PMA를 첨가하여 10분간 signal을 재측정 하였다. ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 발생 양상 분석은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 분석 방법과 동일하게 하였다.

**정자막 지방의 산화(Lipid Peroxidation, LPO)**

LPO는 최종 산물인 malondialdehyde를 측정하는 thio-babutaric acid (TBA) 반응법으로 분석하였다(Aitken 등, 1993b). 전 처리된 정액을 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>이 제거된 Hank's balance salt solution으로 희석하여 정자 농도가 20×10<sup>6</sup>/mL이 되게 조정하였다. Lipid peroxide의 malondialdehyde로의 전환을 증진시키기 위하여 희석된 1mM ferrous sulfate(Sigma, USA)와 5mM sodium ascorbate (Sigma, USA)를 각각 10μL씩 상기 정자 부유액 1mL에

첨가하고 37°C에서 1시간 배양하였다. 250  $\mu$ L의 40% tri-chloroacetic acid(Sigma, USA)를 첨가하고 0°C에서 10분간 정치하여 LPO를 중지시킨 후 2,500 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 이후 상층 1mL을 회수하여 250  $\mu$ L의 1% TBA와 혼합하여 끓는 물에서 10분간 중탕하였고 상온에서 냉각시켰다. Malondialdehyde의 농도는 spectrophotometer(Kontron instruments, Switzerland)를 이용하여 532 nm 파장에서 반응액의 흡광도(optical density)를 측정하여 분석하였다. 생성된 malondialdehyde의 몰농도는 몰흡광계수( $1.49 \times 10^5 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )를 기준으로 환산하였다.

### 통계분석

실험에서 얻어진 결과에 대한 통계학적 분석은 SAS의 GLM(General Linear Model)의 procedure를 이용하여 분석을 하였고, 처리 평균간의 비교에는 Duncan's Multiple

Range Test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

Taurine,  $\alpha$ -tocopherol 각각의 단일처리군과 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군의 처리 농도별 운동성에 미치는 영향을 알아 본 결과는 Table 1과 같다. 처리에 따른 농도별 운동성 양상은 대조군의 운동성과 비교하여 통계학적인 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 VCL에 있어서는 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군인 25mM~500  $\mu$ M(31.3  $\mu$ m/s)과 50mM~1,000  $\mu$ M (43.7  $\mu$ m/s)에서 대조군(31.3  $\mu$ m/s)보다 다소 높은 경향을 보였으며, VSL 또한 동일한 혼합처리군인 25mM~500  $\mu$ M(107.0  $\mu$ m/s)과 50mM~1,000  $\mu$ M (114.7  $\mu$ m/s)에서도 대조군(88.7  $\mu$ m/s)보다 다소 높은 경향을 나타내었다.

Table 1. Effect of antioxidants on movement characteristics of spermatozoa following freezing in diluent containing taurin and  $\alpha$ -tocopherol

Movement characteristics	Treatments <sup>1</sup>							SEM <sup>2</sup>
	A	B	C	D	E	F	G	
Motility (%)	40.7	37.3	36.7	35.0	39.0	35.3	38.0	2.3
VSL <sup>3</sup> ( $\mu$ m/s)	31.3	37.0	38.3	37.7	39.7	49.3	43.7	4.1
VCL <sup>4</sup> ( $\mu$ m/s)	88.7	107.0	93.0	93.7	95.3	107.0	114.7	5.3
LIN <sup>5</sup> (%)	38.3	34.3	42.7	43.3	42.3	45.3	42.0	2.6
ALH <sup>6</sup> ( $\mu$ m)	5.7	5.6	5.4	5.2	5.2	5.2	5.9	0.3
Hyperactivation (%)	5.8	3.0	3.9	3.0	3.6	5.3	5.4	0.8

<sup>1</sup> A; control, B; taurine 25mM, C; taurine 50mM, D;  $\alpha$ -tocopherol 500  $\mu$ M, E;  $\alpha$ -tocopherol 1,000  $\mu$ M, F; taurine+ $\alpha$ -tocopherol 25mM+500  $\mu$ M, G; taurine+ $\alpha$ -tocopherol 50mM+1,000  $\mu$ M. <sup>2</sup> Standard error of mean. <sup>3</sup> VSL: straight line velocity. <sup>4</sup> VCL: curvilinear velocity. <sup>5</sup> LIN: linearity; <sup>6</sup> ALH: lateral head displacement.

Table 2. Effect of antioxidants on viability of spermatozoa following freezing in diluent containing taurin and  $\alpha$ -tocopherol

Viability (%)	Treatments <sup>1</sup>							SEM <sup>2</sup>
	A	B	C	D	E	F	G	
Viability (%)	74.4	69.1	69.4	71.3	72.5	68.9	69.9	3.8

<sup>1</sup> See Table 1 footnote for description of treatments. <sup>2</sup> Standard error of mean.

Table 3. Effect of antioxidants on sperm function of spermatozoa following freezing in diluent containing taurin and  $\alpha$ -tocopherol

HOST <sup>3</sup> (%)	Treatments <sup>1</sup>							SEM <sup>2</sup>
	A	B	C	D	E	F	G	
HOST <sup>3</sup> (%)	26.8	29.0	27.3	23.4	29.3	23.9	31.3	4.1
Acrosome reaction <sup>4</sup> (%)	60.4	57.3	54.9	40.9	43.6	55.9	60.8	5.5

<sup>1</sup> See Table 1 footnote for description of treatments. <sup>2</sup> Standard error of mean. <sup>3</sup> HOST expressed as the swelling of spermatozoa under hypo-osmotic condition. <sup>4</sup> True acrosome reaction expressed as the difference between spontaneous and ionophore induced acrosome reaction.

Taurine,  $\alpha$ -tocopherol의 단일처리군과 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군의 농도별 생존성에 미치는 영향을 알아 본 결과는 Table 2와 같다. 처리군에 따른 농도별 생존성의 양상은 대조군의 생존성과 비교하여 통계학적인 유의차는 인정되지 않았다.

소 정자에 있어서 동결 희석액내 taurine의 첨가는 인공수정 후 자성 생식기 내에서 생존성을 증가시켰다(Footte 등, 1993). Upreti 등(1997)은 양 정자의 동결 희석액에  $\alpha$ -tocopherol의 첨가가 정자의 운동성을 증가시켰다고 보고하였으며 Suleiman 등(1996)도  $\alpha$ -tocopherol이 인간 정자에서 운동성을 증가시켰다고 보고하였다. 그러나 말정자와 양 정자의 동결시 동결보존액에  $\alpha$ -tocopherol 첨가는 운동성에 영향을 미치지 못하는 상반된 결과도 있다(Rich 등, 1984; Srivastava 등, 1987). 이 결과는 본 연구 결과와 동일한 경향이었다. 이와 같은 연구 결과의 차이는 정확한 원인은 알 수 없었지만, 종간의 차이에 기인되는 것으로 사료된다.

동결정액 제조시 taurine과  $\alpha$ -tocopherol 첨가가 용해된 정자의 기능에 미치는 영향을 알아 본 결과는 Table 3과 같다. 정자의 기능 평가 항목으로서 용해 정자의 저장액내 팽창 검사(HOST) 시행 후 미부가 팽창된 정자 비율과 ionophore에 반응하여 야기된 침체 반응 정도를 나타내는 침체 반응율을 분석하였다. 두 항목 모두에서 taurine,  $\alpha$ -tocopherol의 단일처리군과 taurine과  $\alpha$ -tocophe-

rol의 혼합처리군은 대조군과 비교하여 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 그러나, taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군인 50mM~1,000  $\mu$ M에서 HOST 실시 후 미부가 팽창된 정자 비율이 다소 증가되었으며, 또한 ionophore에 반응하여 야기된 침체반응율도 다소 증가되었다.

Taurine,  $\alpha$ -tocopherol의 단일처리군과 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군의 처리농도별로 ROS의 발생양상을 측정된 결과는 Table 4에 요약된 것과 같다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생 양상은 taurine의 단일처리군인 25mM,  $\alpha$ -tocopherol의 단일처리군인 500  $\mu$ M과 1,000  $\mu$ M에서 대조군과 비교하여 유의하게 감소되었다( $P < 0.05$ ). 또한 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군인 25mM~500  $\mu$ M과 50 mM~1,000  $\mu$ M에서도 대조군과 비교하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생 양상이 유의하게 감소되었다( $P < 0.05$ ). 반면  $\cdot O_2^-$ 의 발생양상은 대조군과 비교하여 처리군 모두에서 효과적으로 감소되지 않았다.

LPO의 최종산물인 malondialdehyde의 생산 양상은 Table 5와 같다.  $\alpha$ -tocopherol의 단일처리군인 500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M, taurine의 단일처리군인 500  $\mu$ M, 1,000  $\mu$ M에서 대조군과 비교하여 유의적으로 malondialdehyde의 생산이 감소되었다( $P < 0.05$ ). 또한 taurine과  $\alpha$ -tocopherol의 혼합처리군인 25mM~500  $\mu$ M 및 50mM~1,000  $\mu$ M에서도 대조군과 비교하여 malondialdehyde의 생산이 유의하게 감소되었다( $P < 0.05$ ).

Table 4. Effect of antioxidants on generation of reactive oxygen species in spermatozoa following freezing in diluent containing taurine and  $\alpha$ -tocopherol

	Treatments <sup>1</sup>							SEM <sup>2</sup>
	A	B	C	D	E	F	G	
Luminol Chemiluminescence <sup>3</sup> (counts $\times 10^6$ )	49.5 <sup>a</sup>	40.6 <sup>ab</sup>	51.0 <sup>a</sup>	32.3 <sup>ab</sup>	22.6 <sup>b</sup>	21.8 <sup>b</sup>	17.6 <sup>b</sup>	0.6
Lucigenin Chemiluminescence <sup>4</sup> (counts $\times 10^3$ )	50.8	62.9	46.9	47.9	48.7	38.7	48.7	0.7

<sup>1</sup> See Table 1 footnote for description of treatments. <sup>2</sup> Standard error of mean.

<sup>3</sup> Luminol-dependent chemiluminescence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation.

<sup>4</sup> Lucigenin-dependent chemiluminescence of  $\cdot O_2^-$  generation.

<sup>a~b</sup> Means in a row with no common superscript differ significantly( $p < 0.05$ ).

Table 5. Effect of antioxidants on induction of lipid peroxidation in spermatozoa following freezing in diluent containing taurine and  $\alpha$ -tocopherol

	Treatments <sup>1</sup>							SEM <sup>2</sup>
	A	B	C	D	E	F	G	
Malondialdehyde <sup>3</sup> (nmol/L $\times 10^6$ )	25.6 <sup>a</sup>	21.1 <sup>ab</sup>	18.4 <sup>bc</sup>	16.7 <sup>bc</sup>	14.5 <sup>bc</sup>	13.6 <sup>bc</sup>	13.5 <sup>b</sup>	1.7

<sup>1</sup> See Table 1 footnote for description of treatments. <sup>2</sup> Standard error of mean.

<sup>3</sup> Lipid peroxidation expressed as nmol malondialdehyde generated by  $1 \times 10^6$  spermatozoa.

<sup>a~b</sup> Means in a row with no common superscript differ significantly( $p < 0.05$ ).

돼지 정자막의 주요한 불포화지방산은 22:6n-3(Docosaeonic acid)으로(Paulos 등, 1973) 막의 유동성과 기능에 중요한 역할을 한다(Salem 등, 1986). 22:6n-3(Docosaeonic acid)과 20:4n-6(Arachidonic acid)은 포유동물의 정자에서 산화과정 중 손실이 가장 잘 일어나는 불포화지방산이다(Jones와 Mann, 1976). Cerolini 등(2000)은  $\alpha$ -tocopherol은 정자의 보존기간 동안 정자막의 LPO를 억제한다고 보고하였다. 따라서  $\alpha$ -tocopherol이 풍부할 경우 LPO가 억제되므로 정자 막의 22:6n-3과 같은 불포화지방산의 손실을 막을 수 있다. 그러나 저장기간 동안 정자 자체 내의  $\alpha$ -tocopherol의 수준으로는 LPO를 억제할 수 없기 때문에 저장 기간이 연장되면 결국 정자막의 22:6n-3이 손실된다(Cerolini 등, 2000).

포유동물의 정자에서 LPO의 지표로 이용되는 malonaldehyde 생산은 LPO에 의한 정자 손상을 측정하는데 유용하게 이용되고 있다(Mann, 1980). Cerolini 등(2000)은 돼지 액상정액에 있어  $\alpha$ -tocopherol의 첨가가 LPO를 감소시킨다고 보고하였으며, Aitken 등(1989)은 인간정자에서  $\alpha$ -tocopherol 첨가시 malonaldehyde 생산이 감소되었음을 보고하였다. Sukcharoen 등(1996)은 인간의 체외수정시 배양액 내에  $\alpha$ -tocopherol을 첨가하였을 때 ROS의 발생을 억제시켜 수정율이 증진되었음을 보고하였다. Alvarez와 Storey (1983a,b)은 taurine이 토끼 정자에서 LPO를 억제하였다고 보고하였으며 이와 같은 결과는 본 실험에서도 유사하였다.

ROS은 정상적인 세포 대사 과정에서 발생하는데(Halliwell, 1994), 정자의 대사 과정에도 발생하여 정자의 기능에 악영향을 미친다(Hammerstedt, 1993). 본 연구에서 taurine,  $\alpha$ -tocopherol의 처리군에서 LPO에 대한 완화 효과와 ROS의 발생양상에 있어서  $H_2O_2$ 의 발생이 효과적으로 완화되었던 결과를 고려해 보면, 돼지 정자의 동결시 미치는 유해성에 있어서  $\cdot O_2^-$ 보다는  $H_2O_2$ 의 영향이 더 주요한 것으로 생각된다. Aitken 등(1993a)은 인간정자에 있어서  $H_2O_2$ 는 정자의 운동성과 침체반응 그리고 난자와 결합하는데 있어서 직접적인 억제 효과를 나타낸다고 하였다. Griveau 등(1995)도 인간 정자에서  $H_2O_2$ 는 세포의 기능을 억제하여 정자의 운동성과 침체반응을 억제한다고 하였다. De Lamirande와 Gagnon(1992)은 인간 정자의 연구에서 직접적인  $H_2O_2$ 의 처리에 따른 정자의 변화에서 ATP의 농도 저하가 나타났고 이에 따라 정자의 에너지 대사가 원활치 않아 운동성 저하의 현상을 보고하였으며, 주 원인으로서 해당 작용의 주요한 효소인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 불활성화를 원인으로 보고하였다. 본 실험에서는 돼지 정액의 동결시 taurine,  $\alpha$ -tocopherol의 첨가가 동결·융해 동안 ROS 특히  $H_2O_2$ 의 발생을 효과적으로 완화시켰으며, LPO의 최종산물인 malonaldehyde의 생산을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 돼지 정액의 동결보존시 taurine와  $\alpha$ -tocopherol과 같은 항산화제의 처리는 ROS 발생과 LPO를 효과적으로 완화시킴에 따라 돼지 정액의 동결보존 효율을 증진시킬 수 있는 유용한 방법이라 사료된다.

#### Effects of Taurine and $\alpha$ -Tocopherol Treatment during Freezing on Sperm Characteristics and Function in Frozen-Thawed Porcine Semen

H. A. Shin, C. K. Kim, Y. C. Chung and M. G. Pang  
Department of Animal Science & Technology and BET  
Research Institute, Chung-Ang University, Ansung,  
Gyungki-Do 456-756, Korea

#### ABSTRACT

The present study evaluated whether an exogenous antioxidants, taurine and  $\alpha$ -tocopherol, could, when added to the freezing extender, improve the post-thaw sperm characteristics, function, the level of reactive oxygen species (ROS) generation, and the level of lipid peroxidation (LPO) in frozen-thawed porcine semen. CASA (computer-aided sperm analysis), HOST (hypoosmotic swelling test), chemiluminescence using luminol and lucigenin, and the detection of malondialdehyde for LPO was performed in frozen-thawed porcine spermatozoa. The results obtained in these studies are as follows. While no beneficial effects of taurine and  $\alpha$ -tocopherol supplementation were visible in motility, viability, acrosome reaction, tail swelling patterns, and the generation of  $O_2^-$  of frozen-thawed porcine spermatozoa,  $H_2O_2$  was decreased by all treatments except taurine 50mM treatment. In conclusion, the taurine and  $\alpha$ -tocopherol treatments during freezing reduced generation of reactive oxygen species and production of malondialdehyde in frozen-thawed porcine semen, and the ROS scavengers may minimize various damages of spermatozoa during freezing.

(Key word : Sperm, Freezing, ROS, Taurine,  $\alpha$ -tocopherol)

#### 인용문헌

1. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989): Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 40:183-197.
2. Aiken RJ, Buckingham DW, West KM (1992): Reactive oxygen species and human spermatozoa: Analysis of the cellular mechanism involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cellular Physiology* 151:466-477.
3. Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D (1993a): Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 97: 441-450.
4. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW (1993b): Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol Reprod Devel* 35:302-315.
5. Alvarez JG, Storey BT (1983a): Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation

- in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 29:548-555.
6. Alvarez JG, Storey BT (1983b): Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. *Biol Reprod* 28: 1129-1136.
  7. Alvarez JG, Storey BT (1992): Evidence for increased peroxidative damage and loss of super oxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Andro* 13:232-241.
  8. Biggers JS, Whitten WK, Whittingham DG (1971): The culture of mouse embryos *in vitro*. In: *Method in mammalian embryology*, J.C. Daniel(Ed.), Freeman. San Francisco pp 86-116.
  9. Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT (2005): Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63:2126-2135.
  10. Bwanga CO (1991): Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. *Acta Vet Scand* 32:431-453.
  11. Casslen BG (1987): Free amino acids in human uterine fluid: possible role of high taurine concentration. *J Reprod Med* 32:181-184.
  12. Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Nobel R (2000): Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Sci* 58:99-111.
  13. Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM (2001): Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121:395-401.
  14. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL (1991): A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. *J Androl* 12:98-103.
  15. De Lamirande E, Gagnon C (1992): Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axoneme; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 13:368-386.
  16. De Lamirande E, Gagnon C (1995): Impact of reactive oxygen species on spermatozoa; a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10(suppl I):15-21.
  17. Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K (1992): The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biofactors* 3:241-248.
  18. Foote RH, Chen Y, Brockett CC, Kaproth MT (1993): Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine or blood serum. *J Dairy Sci* 76:1908-1913.
  19. Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK (1996): Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod Fertil* 107: 87-95.
  20. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Lannou DL (1995): Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 103:17-26.
  21. Griveau JF, Lannou DL (1997): Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology* 20: 61-69.
  22. Halliwell B (1994): Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52:253-265.
  23. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
  24. Hammerstedt RH (1993): Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* 5:675-690.
  25. Huxtable RJ (1992): Physiological action of taurine. *Physiological Reviews* 72:101-163.
  26. Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R (1989): Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* 24:185-196.
  27. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70:21-228.
  28. Jones R, Mann T (1976): Lipid peroxidation in spermatozoa: formation, role of plasmalogen, and physiological significance. *Proc R Soc London* 193: 317-333.
  29. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Treminali O, Dondero F (1996): Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reprod* 9:2044-2050.
  30. Mann T, Jones R, Sherins R (1980): Oxygen damage, lipid peroxidation, and motility of spermatozoa. In *testicular development, structure and function*(A. Steinberger and E. Steinberger, eds.). Raven Press, NewYork pp 497-501.
  31. Palamanda JR, Kehrer JP (1993): Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione. *Lipids* 28:427-431.
  32. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H (2004): Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote* 12:117-124.

33. Poulos A, Darin-Bennett A, White IG (1973): The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol* 46B:541-549.
  34. Rich GA, McGlothlin DE, Lewis LD, Squires EL, Pickett BW (1984): Effects of vitamin E supplementation on stallion seminal characteristics and sexual behaviour. *Proc 10th Int Cong Anim Prod Artificial Insemination Abstr* II-163.
  35. Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA (2004): Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl* 25:397-405.
  36. Salem Jr N, Kim HY, Yergey JA (1986): Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism. Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafood. *Academic Press* 263-317.
  37. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG (1995): Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl* 16:464-468.
  38. Srivastava RS, Mathur AK, Kalra DB (1987): Effects of alpha-tocopherol on preservability of ram semen. *Indian J Anim Sci* 57:553-554.
  39. Struman JA, Hayes KC (1980): The biology of taurine in nutrition and development. *Adv Food Nutr Res* 3:231-299.
  40. Suleiman SA, Elamin Ali M, Zaki ZMS, El-Malik EMA, Nasr MA (1996): Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 17:530-537.
  41. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ (1996): Prediction of the *in-vitro* fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function test: The effects of the delay between testing and IVF. *Hum Reprod* 11:1030-1034.
  42. Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P (1996):  $\alpha$ -tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: Relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol Hum Reprod* 2:739-744.
  43. Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF (1997): Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 48:269-278.
  44. Woelders H (1997): Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Quart* 19:135-138.
- (접수일자: 2005. 8. 11. / 채택일자: 2005. 9. 1.)