

제주흑우 동결정액 제조 시 Low Density Lipoprotein (LDL)의 첨가가 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향

오신애¹, 최선호¹, 고민희¹, 강태영¹, 오영미², 정영호³, 조원모^{1,*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²국립제주대학교 수의과대학, ³중부대학교 애완동물자원학과

Effect of Low Density Lipoprotein (LDL) on Motility, Viability, Membrane Integrity and Acrosome Integrity of Frozen-thawed Sperm in Korean Jeju Black Bull

Shin-Ae Oh¹, Sun-Ho Choi¹, Min-Hee Ko¹, Tae-Young Kang¹, Young-mi Oh², Young-Ho Chung³ and Won-Mo Cho^{1,*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, JeJu 690-150, Korea

²Department of Veterinary Medicine, Jeju National University, JeJu 690-756, Korea

³Department of Companion Animal and Animal Resources Science, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

ABSTRACT

This study was designed to determine whether low-density lipoproteins (LDL) extracted from egg yolk in extender improve the function of Korean Jeju Black Bull semen. The semen was cryopreserved with 5% ethylene glycol (EG) or 7% glycerol (G) extenders containing 10% egg yolk (EY), 4% LDL and 5% EY or 8% LDL. Frozen-thawed sperm were evaluated sperm motility, viability, membrane integrity and acrosome integrity. Post-thawed sperm motility has been significantly higher ($p < 0.05$) in 4% LDL + 5% EY (69.00% ± 4.18; EG and 63.00% ± 9.75; 7% G) than 8% LDL (57.00% ± 5.70; EG and 52.00% ± 4.47; G). Treatment of 4% LDL + 5% EY-EG (66.85% ± 5.06) has been significantly improved sperm viability compared to other treatments except 10% EY - EG. Moreover, in membrane integrity, swollen sperm ratio has been only significantly increased ($p < 0.05$) in 4% LDL + 5% EY - EG (64.65% ± 6.10) among all treatments. In assess to detect acrosome integrity, especially, AR pattern ratio has been significantly decreased ($p < 0.05$) in 4% LDL + 5% EY - EG among all treatments. In sperm viability as time passes, between 4% LDL + 5% EY and 10% EY, there was no significant difference, but 8% LDL was significantly decreased sperm viability in EG (1 and 2 hrs) and G (30 min, 1, 2, 5 and 12 hrs) extender. However, there were no significant differences among all treatments except 8% LDL-G in sperm membrane integrity. 8% LDL-G has been significantly decreased swollen sperm ratio at 5 hrs after thawed. It is concluded from these results that 4% LDL + 5% EY to the freezing extender showed more positive effect on the frozen-thawed spermatozoa in Korean Jeju Black bull.

(Key words : Korean Jeju Black Bull, cryopreservation, semen, low density lipoprotein, LDL)

서 론

제주흑우는 유엔식량농업기구(Food and Agriculture Organization: FAO)에 등록되어 있는 한우 중 하나로 쇠소 등과 함께 멸실위험에 처한 희소한우로 분류되어 있다. 제주흑우는 희소 품종으로 분류되어 있기에 현재 산업적 이용에 있어 활발한 유통은 어렵지만, 국내 가축유전자원의 다양성 확보에 있어 매우 중요한 국가적 자원이다. 따라서, 국내 가축유전자원의 다양성 확보 및 국가 중요 유전자원으로서의 안정적인 보존이

필요하다. 이러한 중요 유전자원을 보존하고 이용하는 방안으로는 정액을 이용한 번식과 수정란을 이용한 번식으로 증식이 가능하다. 정액을 이용한 보존은 수정란을 이용한 보존에 비하여 취급이 용이하고 안정적이므로 수정란에 비해 손쉽게 보존이 가능하다. 따라서 이러한 일련의 목적을 위하여 제주흑우의 증식을 위한 수단으로 정액의 생산과 보급이 지속적으로 이루어져야 한다. 그러나 현재 제주흑우의 정액의 채취와 동결 보존에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이며, 최적의 조건을 확립하는 것은 매우 까다로운 일이다. 따라서 멸실

* 본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

* Correspondence : E-mail : cwmo3451@rda.go.kr

위험에 처해있는 제주흑우의 유전자 보존 및 증식을 위해 제주흑우의 정액을 안정적으로 제조, 보존하는 것은 매우 시급한 일이며, 반드시 이루어져야 할 과제이다.

일반적으로, 달걀의 난황은 정자의 동결 시 저온 충격으로부터 정자를 보호하고 액체질소(Phillips와 Lardy, 1940; Dunn 등, 1950; Shannon 등, 1983; Barak 등, 1992) 또는 냉각된 상태(Lasley와 Mayer, 1944; Foot과 Bartton, 1949; Watson, 1976; De Leeuw 등, 1993)로부터 정자의 수정능력을 유지시켜 주는 데 큰 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 다양한 포유동물의 정자를 동결하는데 있어 지난 60년간 난황이 널리 이용되어 왔다. 뿐만 아니라 난황의 보호 역할은 low density lipoprotein(LDL)에서 기인한다고 보고되고 있다(Watson과 Martin, 1975; Quinn과 Chow, 1980; Graham과 Foote, 1987; Babiak 등, 1999; Moussa 등, 2002, Bergeron과 Manjunath, 2006).

LDL은 약 87%의 지질과 12%의 단백질로 구성되어 있으며, 단백질과 인지질의 띠로 둘러싸인 중성지방 core에 기인한(Cook과 Martin, 1969) 지름 약 35 nm의 구형체로 존재한다(Anton 등, 2003). 정자의 동결 과정에서 정자는 온도 shock, 정자막과 침체막에 손상을 입게 되는데, LDL은 정자의 동결-용해 과정에서 정자 막의 인지질과 콜레스테롤을 융합하는 것을 촉진시키고(Bergeron 등, 2004), seminal plasma protein과 결합체를 형성하여 세포막의 손상을 최소화 시킨다고 보고된 바 있다(Manjunath 등, 2002; Bergeron 등, 2004). 또한 많은 연구자들은 LDL이 포유류 정자의 동결-용해 과정에서 정자의 보호작용을 하는 것으로 보고하고 있다(Watson과 Martin, 1975; Quinn과 Chow, 1980; Graham과 Foot, 1987; Trimeche 등, 1996; Moussa 등, 2002; Lamia 등, 2004; Bergeron과 Manjunath, 2006; Hu 등, 2006, 2008; Jiang 등, 2007; Bencharif 등, 2008). 그럼에도 불구하고 LDL이 정자의 이동성이나 semen quality parameter와의 관련성에 대하여 알려진 바는 많지 않다.

따라서 본 연구에서는 보다 안정적인 동결정액의 제조를 위하여, 제주흑우의 동결정액 제조에 있어 LDL의 첨가가 동결-용해 후 정자의 성상에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 제주흑우 정액 채취

정액 채취에 이용된 흑우는 3세 이상의 수컷 6두를 선발하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 월 4회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질(Model 66000-D, Nasco, FHK, 일본)을 사용하여 채정하였다. 정액 채취를 위하여 암컷을 안전하게 정액 채취할 보정틀에 고정시킨 후, 제주흑우 수컷을 2~3회 암컷의 주위를 맴돌게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 음경을 인공질에 삽입하여 정

액을 채취하였다. 인공질의 온도는 38℃를 유지하였으며, 인공질에는 penis의 삽입을 원활하게 하기 위하여 젤을 도포하였다. 인공질 끝 부분에 15 ml tube를 채취 전에 장착하여 사출된 정액을 회수하였다. 회수된 정액은 37℃ 온장고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다.

2. 정액의 처리 및 제조

본 실험에 이용된 보존액의 조성은 Table 1과 같으며, 동결 보호제로 7%의 glycerol과 5%의 ethylene glycol을 이용하였으며, 10%의 난황, 5%의 난황과 4%의 LDL 그리고 8%의 LDL을 첨가한 실험구를 비교하였다. LDL은 Moussa 등(2002)의 방법에 의해 제조하였다. 채취된 정액은 즉시 실험실로 운반하고, 원정액을 Tris-Egg yolk extender과 1:1로 희석하여 냉각을 시작하여 5단계를 거쳐 총 2시간 동안 냉각시켰다. 마지막 희석 후, 동결보호제가 첨가된 희석액을 첨가하여 2시간 동안 평형을 유도하였으며, 평형이 완료된 정자는 50×10^6 /ml로 농도를 조절하여 0.5 ml straw에 충전 봉합하였다. 충전된 straw는 액체질소 표면에서 5 cm 높이에서 10분간 노출시켜 예비 동결을 실시한 후에 액체질소에 침지하여 동결을 완료하였다. 동결된 정액은 LN₂ tank에서 보관하였으며, 필요 시 용해하여 사용하였다. 동결정액의 용해는 공기 중에서 약 10초간 용해한 후 37℃ 온수에 20초간 침지시켜 용해한 후 정자의 생존율 및 정자 양상을 조사하였다.

3. 정자의 운동성 평가

정액의 운동성 평가는 MicroLux 현미경($\times 70$, Olympus, Japan)하에서 정자의 활력을 평가하였다. 혈구계산관에 5 μ l의 정액을 넣고 cover glass로 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하였다. 혈구계산관의 격자 2군데를 반복적으로 관찰하여 거의 모든 정자들이 소용돌이치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들을 격자 별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80개 이상일 때 80%, 70개 이상일 때 70%로 판단하고, 움직이는 정도가 전진 운동 또는 느리게 전진 운동하는 수준일 때 50%, 느리게 전진 운동

Table 1. Composition of Tris-egg yolk extender

Component	Concentration
Tris	121.1 mM
Fructose	180.2 mM
Citric acid	294.1 mM
Egg yolk	10% / 4% / 0%
Glycerol/ ethylene glycol	7% / 5%
Streptomycin sulfate	10 mg/ml

하거나 진자 운동 혹은 미동하는 수준일 때 30%로 평가하였다.

4. 정자의 생존을 평가

정자의 생존성은 eosin-Y 염색법을 이용하여 생존율을 평가하였다. 0.9% NaCl 용액에 0.5% eosin-Y를 용해한 후 10 μl의 정액을 slide glass 위에 올린 다음 동량의 염색액을 섞어 도말한 다음 cover glass를 덮고 MicroLux 현미경(×70, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다. 100배율에서 염색 상태를 관찰하여 표본 1개당 200개의 정자를 확인하여 붉게 염색된 죽은 정자의 비율을 계산하였으며, 개체 당 2개의 표본을 만들어 총 400개의 정자를 확인하여 생존율을 평가하였다.

5. 정자막 온전성 평가

정자막 온전성을 측정하기 위하여 Jeyendran 등(1984)의 방법을 변형하여 저삼투압 용액을 이용한 정자 미부의 팽창 형태를 분석하였다(hypo-osmotic swelling test: HOST). 37°C의 저장액(150 mOsm/kg, 0.45% NaCl 용액) 1 ml에 정자 샘플 100 μl를 혼합하여 37°C에서 5분간 정지시킨 후 slide glass에 도말하여 개체당 2개의 slide 표본을 만들어 표본당 200개의 정자를 확인하여 정자막의 온전성을 평가하였다.

6. 첨체막 변화 양상의 측정

첨체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 chlortetracyclin (CTC) 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 첨체막 변화 양상을 조사하였다. 정액을 400 ×g에서 2분간 원심분리하여 세척한 다음 500 μl의 CTC 용액(750 μM CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cysteine, 20 mM Tris buffer; pH 7.8)을 혼합하여 20초간 암실에서 상온배양하였다. CTC 반응을 고정시키기 위하여 10 μl의 12.5% glutaraldehyde를 혼합하여 4°C에서 보관하였다. 염색 후 24시간 이내에 형광현미경 하에 관독하였다(IX 71, Olympus, Japan), 정자 첨체막 양상의 관독 기준은 Fraser (1995)의 분류를 따라 정자 두부가 전체적으로 형광 발광을 할 경우 수정능력획득이 일어나지 않은 F pattern으로, 적도면 부분에 띠가 형성되어 첨체 아랫부분에서 형광 발광을 할 경우 수정능력획득이 일어난 B pattern으로 구분하였으며, 마지막으로 정자 두부가 형광 발광을 하지 않거나, 얼룩덜룩한 발광을 할 경우 첨체반응이 일어난 AR pattern으로 구분하였다.

7. 통계 분석

통계 분석은 통계 분석 프로그램(SPSS version 18.0)을 이용하였으며, LDL의 첨가수준에 따른 동결 용해 후 정자의 활력 및 생존율과 첨체 및 정자막 온전성에 미치는 영향에 대한 결과는 ANOVA를 이용하여 분석하였으며, 최소유의차(LSD) 방법을 이용하여 각 처리구간의 유의성 (p<0.05)을 검증하였다.

결 과

1. LDL의 첨가가 정자의 운동성 및 생존율에 미치는 영향
 제주흑우의 정자의 사출 정액의 성상 및 7%의 glycerol과 5%의 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하여 10% 난황, 4%의 LDL과 5%의 난황 그리고 8%의 LDL을 첨가하여 동결 용해하였을 때 정자의 운동성 및 생존성에 대한 결과는 Table 2와 같다. 4%의 LDL과 5%의 난황을 처리한 실험구에서 8% LDL을 첨가한 실험구보다 glycerol과 ethylene glycol 모두 유의적으로 높은 운동성과 생존율을 보였다 (p<0.05). 그러나 10%의 난황을 처리한 실험구와의 비교에서는 다소 높은 운동성과 생존율을 나타냈으나, 유의적인 차는 보이지 않았다.

2. LDL의 첨가가 정자막 온전성에 미치는 영향

Table 3은 사출 직후 및 LDL과 난황을 처리하여 동결 용해 후 저장액 정자 꼬리막 팽창 실험을 통하여 정자막의 온전성을 검사한 결과이다. 본 실험의 결과, 5%의 ethylene glycol을 동결보호제로 하여 4% LDL과 5%의 난황을 처리한 실험구에서 정자의 꼬리 팽창 비율이 유의적으로 가장 높게 나타났으며 (p<0.05), 8%의 LDL을 처리한 실험구에서는 ethylene glycol과 glycerol 모두 유의적으로 낮은 꼬리 팽창율의 결과를 나타냈다(p<0.05).

3. LDL의 첨가가 정자의 첨체막 양상의 변화에 미치는 영향

제주흑우 정자의 동결 용해 후 LDL의 첨가에 따른 정자의 첨체막 양상 변화에 대한 결과는 Fig. 1과 같다. 수정능력획득이 일어나지 않은 F pattern의 비율은 10%의 난황을 처리한 glycerol에서 유의적으로 높게 나타났으며(p<0.05), 8%의 LDL을

Table 2. Effect of LDL and egg yolk on post-thawed sperm motility and viability in Korean Jeju Black Bull

	Motility (%)	Viability (%)
Ejaculated sperm	86.00 ± 9.62	82.15 ± 7.35
10% EY-EG	67.00 ± 8.37 ^a	63.35 ± 5.58 ^{ab}
10% EY-G	64.00 ± 9.62 ^a	58.25 ± 6.63 ^b
4% LDL+5% EY-EG	69.00 ± 4.18 ^a	66.85 ± 5.06 ^a
4% LDL+5% EY-G	63.00 ± 9.75 ^a	57.25 ± 9.75 ^b
8% LDL-EG	57.00 ± 5.70 ^b	47.95 ± 3.95 ^c
8% LDL-G	52.00 ± 4.47 ^b	48.55 ± 4.25 ^c

^{a-c} Values with different superscripts within same column without ejaculated sperm are significantly different by ANOVA (p<0.05).

Data are presented as mean ± SD.

Table 3. Effect of LDL and egg yolk on sperm membrane integrity in Korean Jeju Black Bull

	Swollen sperm (%)
Ejaculated sperm	67.70 ± 13.62
10% EY-EG	53.65 ± 9.72 ^b
10% EY-G	51.90 ± 9.99 ^b
4% LDL+5% EY-EG	64.65 ± 6.10 ^a
4% LDL+5% EY-G	50.50 ± 9.89 ^b
8% LDL-EG	39.75 ± 6.57 ^c
8% LDL-G	33.65 ± 3.90 ^c

^{a-c} Values with different superscripts within same column without ejaculated sperm are significantly different by ANOVA ($p < 0.05$).

Data are presented as mean ± SD.

처리한 ethylene glycol에서 유의적으로 낮은 비율의 F pattern을 나타냈다($p < 0.05$). 수정능력획득이 일어난 B pattern의 비율은 LDL을 처리한 실험구에서 난황만을 사용한 실험구보다 높은 비율을 나타냈으며, 4% LDL과 5%의 난황을 처리한 ethylene glycol과 8%의 LDL을 처리한 ethylene glycol 실험구에서 유의적으로 높은 수준의 수정능 획득 비율을 나타냈다 ($p < 0.05$). 그러나 첨체 반응이 일어난 AR pattern의 비율에 있어서는 4%의 LDL과 5%의 난황을 처리한 실험구에서 낮은 수준의 AR pattern의 비율을 나타냈으나, 오직 4%의 LDL과 5%의 난황을 처리한 ethylene glycol 실험구에서만 유의적 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

4. 동결 용해 후 시간에 따라 LDL이 정자의 생존율에 미치는 영향

Fig. 2는 동결 용해 후 시간에 따라 감소되는 정자의 생존율의 비율에 미치는 LDL의 영향에 관한 결과이다. Ethylene glycol을 동결보호제로 사용한 실험구에서 (A) LDL을 첨가하였을 때 정자의 생존율은 유의적 차이를 보이지 않고 감소하였다. 그러나 10% 난황만을 사용하여 동결 용해한 정자는 1시간과 2시간에 생존율이 유의적으로 감소하였음을 나타냈다 ($p < 0.05$). Glycerol을 동결보호제로 사용한 경우 (B), ethylene glycol과 마찬가지로 10% 난황만을 첨가한 실험구에서 30분, 1시간, 2시간, 5시간 그리고 12시간에 모두 LDL을 첨가한 실험구에 비하여 유의적으로 감소하였음을 나타냈다 ($p < 0.05$).

5. 동결 용해 후 시간에 따라 LDL이 정자막 온전성에 미치는 영향

동결 용해 후 시간에 따라 저장액에서 정자의 꼬리 팽창 비

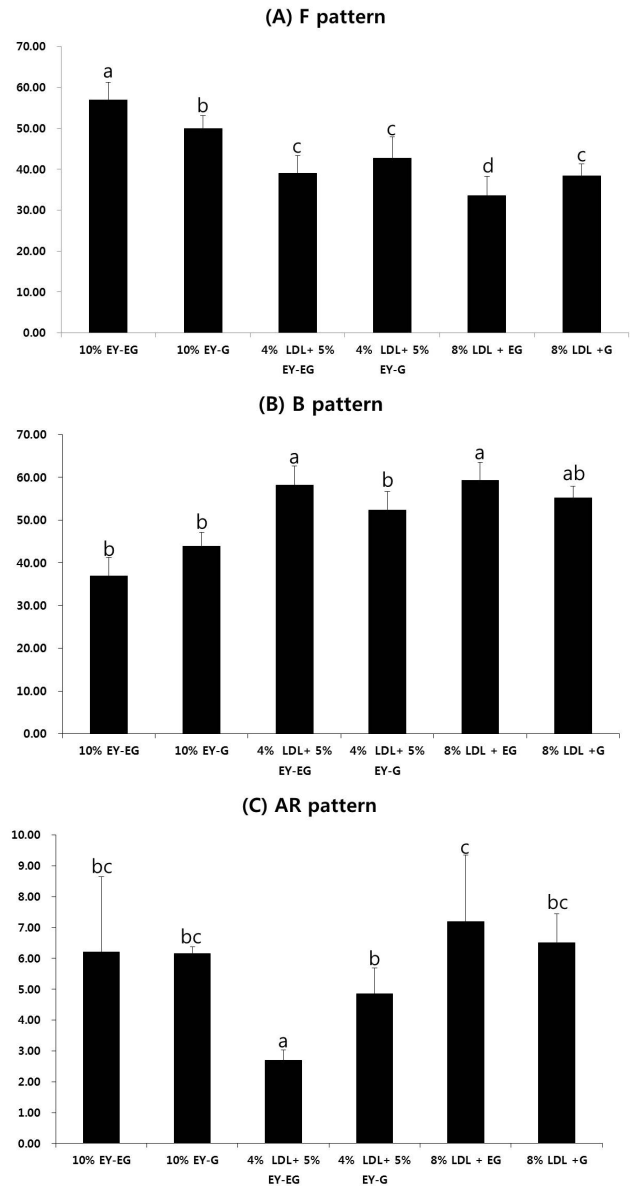


Fig. 1. Change of sperm capacitation status according to different treatment. ^{a-c} Values with different superscripts among treatments are significantly different by ANOVA ($p < 0.05$).

율의 감소를 나타낸 결과 (Fig. 3), ethylene glycol을 동결보호제로 사용한 실험구에서는 난황과 LDL 모두 유의적 차이를 나타내지 않았다. 그러나 glycerol 실험구에서는 (B) 5시간에서 10% 난황만을 처리한 실험구가 다른 실험구에 비하여 정자의 꼬리 팽창 비율이 유의적으로 감소되는 결과를 보였다 ($p < 0.05$).

고찰

본 연구에서 4%의 LDL과 5%의 난황을 첨가하여 동결하였

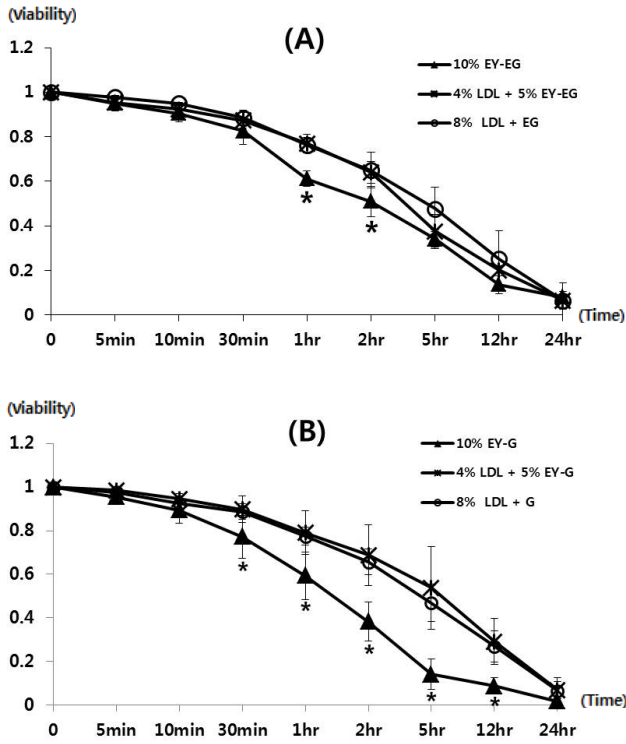


Fig. 2. Effect of LDL on ratio of reduced sperm viability in ethylene glycol (A) and glycerol (B) cryoprotectant as change over the time at 37°C. * Significantly different among treatment in same time zone ($p < 0.05$).

을 때 8%의 LDL만을 사용한 경우보다 정자의 운동성 및 생존율이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 또한 비록 유의적 차이는 볼 수 없었지만, 10%의 난황만을 사용한 실험구에 비하여도 정자의 운동성과 생존율이 높은 경향을 보였다. 일반적으로 난황은 소의 정액을 동결 보존하는데 있어 널리 사용되고 있다. 그것은 난황안에 LDL이 존재하여 동결 용해되는 과정동안 정자의 손상을 감소시키기 때문이다(Akhter 등, 2011). Quinn과 Chow (1980)는 동결과정에서 LDL이 터지면서 LDL의 인지질이 정자 막 표면에 보호막을 형성한다고 제시한 바 있다. 뿐만 아니라 LDL에서 기인된 인지질은 정자의 동결 과정에서 정자 막의 인지질을 대치한다고 보고된 바 있다 (Graham과 Foot, 1987). 즉 LDL이 동결 용해에서 기인되는 손상으로부터 정자를 보호하는 기작은 정자막의 인지질을 LDL로 대체함으로써 정자막을 안정시켜 동결과정동안 정자막의 단백질의 손상을 최소화하는 것이라 할 수 있다(Akhter 등, 2011).

그러나, 이와 같은 LDL의 정자 보호 기능에도 불구하고, 소의 동결 정자에 있어 LDL과 정자의 질을 평가하는 요소들 사이의 관련성은 거의 알려져 있지 않다. 정자 첨체의 온전성과 같은 정액 품질 평가 요인은 정자의 수정능력과 강한 관련성이 있으며(Saacke와 White, 1972), 첨체가 유실된 정자는 난자

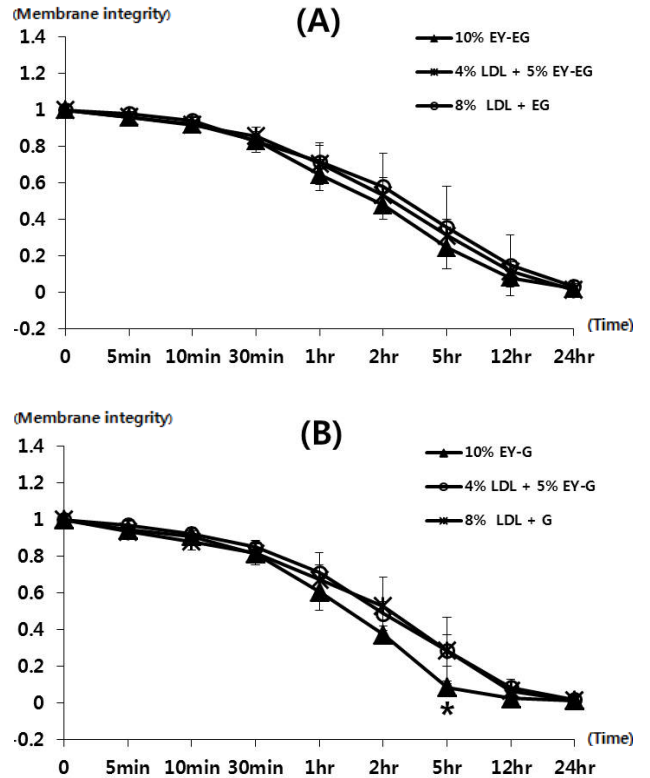


Fig. 3. Effect of LDL on ratio of reduced swollen sperm ratio in ethylene glycol (A) and glycerol (B) cryoprotectant as change over the time at 37°C. * Significantly different among treatment in same time zone ($p < 0.05$).

와 결합하여 수정란을 생산할 가능성이 없다. 또한 정자의 막은 세포 외부와의 상호교환의 조절뿐만 아니라, 수정 과정에도 관련된 매우 역동적인 구조이다(Flesch와 Gadella, 2000). 정자의 동결 과정 동안에 정자막의 지질 구조와 화학적 조성은 손상을 입게 된다(Annand과 Pickett, 1987). LDL은 동결 과정 동안에 대체로 정자 막을 보호하는 역할을 하고 직간접적으로 정자막의 변형을 감소시키는데 그 역할이 있다(Moussa 등, 2002). 그러나, 동결 과정동안 정자를 보호하는데 있어 LDL이 제공하는 도움에 대한 정확한 기작은 분명하지 않다. 본 연구에서 HOST를 통하여 정자막의 온전성을 검사하였으며, HOST는 사람에 있어 정자 막의 기능적 온전성을 검사하는데 널리 쓰이고 있다. 정자 막에 손상이 입었을 때 저장액에서 정자의 꼬리가 부풀거나 말리지 않기 때문에 정자막의 기능성을 검사할 수 있다(Mordel 등, 1993). 특히 Brito 등(2003)은 HOST의 결과와 *in vivo*의 수정능력은 밀접한 관련이 있음을 보고한 바 있다. 본 연구에서 LDL을 첨가하여 동결 용해하였을 때 4% LDL과 5%의 난황을 첨가한 ethylene glycol 기반의 희석제를 사용하였을 때 유의적으로 높은 정자 미부 팽창율을 보였다($p < 0.05$). 그러나 8%의 LDL만을 첨가한 실험구에서는 유의적으

로 낮은 비율의 정자 팽창율을 나타냈다($p < 0.05$). Amirat-Briand 등 (2010)은 8%의 LDL은 20%의 난황을 사용한 실험구보다 낮은 정자 팽창율을 보고한 바 있다. 이러한 결과는 LDL이 난황을 보조하여 정자막에 보다 효과적으로 인지질을 피복하여 정자막을 보호하는 역할을 수행하는 것이나 첨가 농도에 대한 정립이 필요한 것으로 사료된다.

정자는 사출 직후부터 침체반응이 일어나기 시작하며, 동결과정동안 정자 침체의 손상으로 인해 정자가 난자의 투명대와 결합하지 못하여 수정능력이 소실될 수 있다(Yanagimachi, 1994). 정자의 동결 용해 후 정상 평가에 있어 운동성, 생존율 및 정자막 온전성뿐만 아니라, 수정능 획득 또는 침체반응 역시 매우 중요하다. 정자의 수정능 획득 또는 침체반응은 정자의 수정능력과 밀접한 관련이 있음이 보고된 바 있다(Kommisrud, 2002). 또한 Oh 등(2010)은 돼지 정자에서 CTC 염색법을 이용한 정자의 수정능 획득 및 침체 반응의 평가는 번식 성적이 불량한 개체를 예측하는데 매우 유용하다고 하였으며, 수정능 획득이 완료된 정자는 투명대에 의해 침체반응이 일어나지만(Yanagimachi, 1994), 투명대와 결합 전 침체반응이 일어난 정자는 투명대와 결합에 필요한 요소를 손실하게 되므로 정상적인 수정에 참여할 수 없다(Adeoya-Oshiguwa와 Fraser, 2004). Witte 등(2009)은 난황의 상대가 침체의 손실을 유의적으로 막아준다고 보고하였으며, Hu 등(2011)은 소의 동결정액 제조에 있어 LDL의 첨가가 침체의 손실을 유의적으로 막아준다고 보고하였다. 본 연구의 결과 LDL이 첨가된 모든 실험구에서 수정능력과 직접적인 관련이 있는 B pattern이 비율이 높게 나타났으며, 특히 ethylene glycol 기반에서 LDL은 유의적으로 B pattern의 비율을 증가시킨 것으로 나타났다($p < 0.05$). 그러나 침체반응이 완료된 AR pattern의 비율은 ethylene glycol 기반에서 4%의 LDL과 5%의 난황을 처리한 실험구에서만 유의적으로 낮은 결과를 나타냈다($p < 0.05$). 이는 동결 조건이 단지 LDL의 한가지 이유가 아닌 동결보호제의 선택과 같은 복잡한 조건이 안정적으로 수립되어야 함을 시사한다.

동결정액 제조의 최종적인 목적은 성공적인 인공수정이다. 동결 용해된 정자가 자성 생식기에 주입된 후 정자가 난관 팽대부에 도착하는데 소요되는 시간은 약 4~6시간이며, 정자의 수정능 획득이 최종적으로 완료되는 데는 정자의 주입 후 5~7시간이 필요하다(Edwards 등, 1969). 따라서 최소한 5시간 전후까지 정자는 수정 가능한 상태를 유지해야 한다. 본 연구에서 37°C에서 시간에 따라 정자의 생존율의 감소 비율을 검사한 결과, ethylene glycol과 glycerol 기반 모두에서 LDL의 첨가가 정자의 수정 가능한 최소 시간까지 정자의 생존율 감소를 유의적으로 막아주는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 그러나 정자막 온전성에 있어서 ethylene glycol 기반에서는 LDL과 난황과의 유의적 차이는 볼 수 없었으나, LDL 첨가시 다소 높

은 정자막 온전성의 비율을 나타냈으며, glycerol 기반에서는 난황만을 첨가하였을 때 5시간째에 온전한 정자막을 가진 정자의 비율이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 침체반응의 완료의 경우와 같이, 비록 LDL이 동결과정의 손상으로부터 정자를 보호하는 역할을 수행하지만, LDL과 같은 한가지 요인만이 아닌 복잡한 동결과정의 조건을 수립해야함을 시사한다.

이러한 결과는 LDL이 동결과정에서 발생하는 손상으로 부터 정자를 성공적으로 보호하고 있음을 시사하며, 희소 한우 품종인 제주흑우의 안정적인 정액 동결방법을 확립하는데 있어 효과적인 자료를 제시할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 희소 한우인 제주흑우의 성공적인 인공수정을 위한 효과적 동결 조건을 수립하기 위하여 제주흑우의 동결정액 제조시 LDL을 첨가하여 동결-용해 후 정자의 운동성, 생존율, 정자막 온전성 및 정자의 침체 양상의 변화 조사를 위하여 수행되었다. 제주흑우의 정액을 동결 용해한 결과, ethylene glycol과 glycerol 기반의 4% LDL과 5% 난황을 첨가한 실험구에서 69.00% ± 4.18과 63.00% ± 9.75로 8% LDL 처리구보다 유의적으로 높았으나($p < 0.05$), 10% 난황 처리구와는 유의적 차이가 나타나지 않았다. 정자의 생존율은 ethylene glycol 기반의 4% LDL과 5% 난황을 첨가한 실험구에서 66.85% ± 5.06으로 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높았으나, 같은 ethylene glycol 기반의 10% 난황 처리구와는 유의적 차이가 없었다. 정자막 온전성 검사에서는 ethylene glycol 기반의 4% LDL과 5% 난황을 첨가한 실험구에서 64.65% ± 6.10으로 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높은 비율을 나타냈다. B pattern의 비율에 있어 ethylene glycol 기반의 4% LDL과 5% 난황 그리고 8% LDL을 첨가한 실험구에서 10% 난황 처리구보다 유의적으로 높은 B pattern 비율을 나타냈다($p < 0.05$). 또한 조기 침체반응에 있어 AR pattern 비율은 ethylene glycol 기반의 4% LDL과 5% 난황을 첨가한 실험구에서 타 실험구에 비하여 유의적으로 낮은 비율의 결과를 보였다($p < 0.05$). 동결 용해 후 시간이 경과함에 있어 1시간과 2시간에서 ethylene glycol의 10% 난황 첨가구에서 유의적인 생존율의 감소를 보였으며($p < 0.05$), glycerol 기반에서는 30분, 1시간, 2시간, 5시간 그리고 12시간 까지 10% 난황의 처리구에서 유의적인 생존율의 감소를 나타냈다($p < 0.05$). 그러나 정자막 온전성에 있어 ethylene glycol 기반에서는 LDL의 첨가가 다소 높은 경향을 보였으나, 유의적 차이는 볼 수 없었다. 그러나 glycerol 기반에서는 5시간째에 10% 난황 처리구에서 급격한 감소를 나타냈다.

이러한 결과는 희소 가축의 생식세포 보존 및 유전자원 확립을 위한 중요한 자료가 될 것이며, 제주흑우 및 희소 가축

의 안정적이고 효율적인 동결 정액 제조 연구에 있어 중요한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Adeoya-Osiguwa SA and Fraser LR. 2004. Environmental estrogens and sperm function. *Hum. Reprod.* 19:216-217.
- Akhter S, Ansari M, Andrabi S, Rakha B, Ullah N and Khalid M. 2011. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 47:815-819.
- Amann RP and Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.* 7:145-173.
- Amirat-Briand L, Bencharif D, Vera-Munoz O, Pineau S, Thorin C, Destrumelle S, Desherces S, Anton M, Jouan M, Shmitt E and Tainturier D. 2010. *In vivo* fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: preliminary results of artificial inseminations. *Anim. Reprod. Sci.* 122:282-287.
- Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beaumal V, David-Briand E and Rabesona H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.* 83: 175-183.
- Babiak I, Glogowski J, Luczynski MJ, Luczynski M and Demianowicz W. 1999. The effect of egg yolk, lowdensity lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology* 52:473-479.
- Barak Y, Amit A, Lessing JB, Paz G, Hommonai ZT and Yogeve L. 1992. Improved fertilization rate in an *in vitro* fertilization program by egg yolk-treated sperm. *Fertil. Steril.* 58:197-198.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Larrat M and Tainturier D. 2008. The advantages of LDL (lowdensity lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70:1478-1488.
- Bergeron A and Manjunath P. 2006. Newinsights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.* 73:1338-1344.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y and Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70:708-717.
- Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goesees S, Panich PL and Kastelic JP. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology* 60:1539-1551.
- Cook WH and Martin WG. 1969. Egg lipoproteins. In: Tria E and Scanu AM (Ed.), *Structural and Functional Aspects of Lipoproteins in Living Systems*, Academic Press, New York, pp. 579-615.
- De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B and Verkleij AJ. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32-44.
- Dunn HO, Bratton RW and Collins WJ. 1950. Fertility and motility of bovine spermatozoa in buffered whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 33:434-437.
- Edwards RG. 1969. The culture of pre-implantation mammalian embryos. *Proc. R. Soc. Med.* 62:143-144.
- Evenson DP, Larson KL and Jost LK. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23:25-43.
- Flesch FM and Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1469:197-235.
- Foote R and Bratton R. 1949. The fertility of bovine semen cooled with and without the addition of citrate-sulfanilamide-yolk extender. *J. Dairy Sci.* 32:856-861.
- Fraser LR, Abeydeera LR and Niwa K. 1995. Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40:233-241.
- Graham JK and Foote RH. 1987. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24:42-52.
- Hu JH, Jiang ZL, Lv RK, Li QW, Zhang SS, Zan LS, Li YK and Li X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* 62:83-87.
- Hu JH, Li QW, Jiang ZL and Li WY. 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 57:257-262.
- Hu JH, Li QW, Li G, Chen XY, Yang H, Zhang SS and Wang LQ. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar

- semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19:486-494.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Carbo BG and Zaneveld LJ. 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.* 70:219-228.
- Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW and Zhang SS. 2007. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 54:301-304.
- Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E and Greule IS. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta. Veterinaria Scandinavia.* 43:49-55.
- Lamia A, Daniel T, Lae titia J, Chantal T, Olivier G, Jean LC, Marc A. 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidy11, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61:895-907.
- Lasley JF and Mayer DT. 1944. Variable physiological factor necessary for the survival of bull spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 3:129-135.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A and Menard M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* 67:1250-258.
- Mordel N, Shemesh A and Dano I. 1993. Novel parameters of human sperm hypo-osmotic swelling test and their correlation to standard spermogram, total motile sperm fraction, and sperm penetration assay. *Fertil. Steril.* 59:1276-1289.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D and Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57:1695-1706.
- Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA and Pang MG. 2010. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related litter size of sows. *Anim. Reprod. Sci.* 121:131-138.
- Phillips P and Lardy AL. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* 23:399-404.
- Quinn PJ and Chow PYW. 1980. Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasmamembrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60:403-407.
- Saacke RG and White JM. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: *Proceedings of the Fourth NAAB Technical Conference on Artificial Insemination in Reproduction*, Madison, WI, pp. 22-27.
- Shannon P and Curson B. 1983. Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *N. Z. J. Agric. Res.* 26:187-189.
- Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G and Tainturier D. 1996. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of *Poitou jackass* sperm. *Cryobiology* 34:385-393.
- Watson PF and Martin CA. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 °C. *Aust. J. Biol. Sci.* 28:145-152.
- Watson PF. 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 58 °C and deep freezing. *J. Therm. Biol.* 1:137-141.
- Witte TS, Schafer-Somi S, Kuchar A, Mostl E, Iben C and Aurich C. 2009. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 110:293-305.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: *Knobil E and Neil JD (Ed.), The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189-317.