

Monothiolglycerol이 동결 용해 후 미니돼지 정자의 활성산소 억제, 미토콘드리아 활성 그리고 DNA Integrity에 미치는 영향

박수정, 김대영*

가천대학교 바이오테크놀로지 생명과학과

Effect of Monothiolglycerol on ROS Inhibition, Mitochondrial Activity, and DNA Integrity in Frozen-thawed Miniature Pig Sperm

Soo-Jung Park, Dae-Young Kim*

Department of Biological Science, Bio-Nano Technology, Gachon University, Incheon 406-799, Republic of Korea

Abstract

Cryopreservation and *in vitro* fertilization (IVF) protocols are important in genetic studies and applications to transgenic animals. Various studies about boar sperm cryopreservation have been studied for a long time. Those were about the use of extenders, the choice of sugars, the cooling and warming rates.

The factors that influence the boar sperm are the dramatic changes in temperatures, osmotic and toxic stresses, and reactive oxygen species (ROS) generation. Among these factors, ROS generation is the main damage to DNA which is a principal genetic material and the most important for the practical applications. So we wondered whether ROS generation could be reduced. In previous study, monothiolglycerol (MTG) was essential for the culture of embryo stem cells. Therefore we added MTG in the freezing extender based on lactose-egg yolk (LEY) with trehalose.

For the assessment of the frozen-thawed sperm, we focused on motility, membrane integrity and DNA damage. First, we used a computer-aided sperm analysis system for overall conditions of sperm such as motility and viability. Then we performed the sperm chromatin structure assay for DNA integrity and hypo-osmotic swelling test for membrane integrity. And our result showed the existence of MTG in the freezing extender caused less damage to DNA and higher motility in frozen-thawed boar sperm. Also we checked a relative antioxidant activity of MTG in modified Modena B extender.

We concluded that this reagent can activate sperm mitochondria at MTG 0.2 μ M, contribute to sperm motility and DNA integrity but there was no significant difference on membrane integrity. Also antioxidant activity of MTG in modified Modena B extender was proved.

(Key words : monothiolglycerol, cryopreservation, boar sperm, ROS, sperm motility)

서 론

국내 축산업의 사육규모가 커지면서 대량 번식을 기대하여 인공 수정의 시도가 증가하면서 그 효율에 대한 연구가 활발히 진행 중이다(Jha 등, 2013). 앞선 연구들에 의하면 수정의 효율을 높이기 위해 사정 직후의 정액을 사용하기도 하지만, 정액을 냉각 혹은 동결 보존하게 될 시 용해 후 정자의 수정 능력을 향상시키기 위한 연구 또한 진행 중이다(Jha 등, 2013). 정액의 동결 보존은 멸종위기의 동물 보존에 기여하며, 또한

불임 남성의 문제를 극복할 수 있게 하였다(Watson, 2000). 최근에는 쥐, 소, 돼지, 개 등 여러 동물의 정액을 동결 보존하여 그 생산에 도약이 이루어지고 있다. 그러나 동결 보존은 저온 충격과 삼투압 균형의 변화, 용해와 같은 스트레스 때문에 세포막의 손상과 효소 활성의 이상, 그리고 DNA의 손상을 초래한다(Hammerstedt 등, 1990; Cormier 등, 1997; Critser and Mobraaten, 2000; Chatterjee and Gagnon, 2001; Kaneko 등, 2006; Rosato and Iaffaldano, 2013). 또한 정자에서 ROS의 생성은 산화 스트레스를 야기하여 DNA의 손상, 단백질 adduc-

* This work was supported by grant (2012-0001770) from Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) founded by the Ministry of Education, Science and Technology.

* Correspondence : E-mail : davekim@gachon.ac.kr

tion 등 정자 기능에 이상을 초래한다(Aitken 등, 2012). 동결 보존의 효율성을 높이기 위해 주로 사용하는 동결 보존제로서 glycerol은 삼투 활성이 있어 세포 내 물의 비율을 조절하지만, glycerol kinase (GK)를 활성화시켜 methylglyoxal이라는 독성 대사물질을 축적하게 되면서 세포에 돌이킬 수 없는 손상을 주게 된다(Gutierrez-Perez 등, 2009). 본 연구에서 사용한 monothioglycerol(MTG)은 GK를 저해하며, 환원제로서 reactive oxygen species(ROS)에 의한 손상을 줄이는 기능을 하기 때문에(Gray 등, 2013), 쥐 정자의 동결 보존액에 첨가되어 융해 후 IVF의 효율을 증가시키고, ES-cell 배양 조건에 이용된 바 있다(Ostermeier 등, 2008; Takahashi and Liu, 2010). 따라서 본 연구에서는 glycerol이 포함된 동결 보존액에 MTG를 농도별로 처리하여 miniature pig 정자의 운동성과 미토콘드리아의 기능, 세포막과 DNA의 정상성을 확인하였다.

재료 및 방법

1. Chemical Agents

모든 시약들은 Equex STM(Nova Chemical Sales, Inc. Scituate, MA, USA)을 제외하고, Sigma-Aldrich Chemical company (St. Louis, MO, USA)에서 구매되었다.

2. 정자 채취

정액은 강원대학교에서 gloved hand 방법으로 8세의 miniature pig에서 채취되어 17℃로 유지된 채 인친의 실험실로 운송되었다. 운동성 > 85%와 전진성 운동 > 65%의 정액 샘플을 사용하였다. 정액은 modified Modena B 희석제(mMB, 6 g glucose, 0.45 g EDTA, 1.38 g sodium citrate, 0.2 g sodium bicarbonate, 1 g Tris base, 0.5 g citric acid, 0.01 g cysteine, 0.8 g BSA, and 0.06 g kanamycin sulfate; pH 7.0)로 희석하였다.

3. 돼지 정자 동결 보존

모아 진정액은 mMB 용액으로 희석되었고(정액 : 희석제 비율 = 1 : 3), 400 × g, 17℃에서 10분 동안 원심분리 되었다. 분석하기 위해서 정액 표본은 mMB 희석액으로 3번 세척하였다. 상층액은 버리고, 표본들은 적절한 농도로 조정되어 냉각 용액인 lactose-egg yolk solution(LEY extender : 80% v/v lactose solution[310 mM] and 20% v/v egg yolk with 100 µg/ml kanamycin sulfate)에 1×10^9 정자/ml 희석되었다. 정자 부유액은 얼음물에서 5분마다 1℃씩 점차 냉각시켰다. 냉각 중인 정자 부유액이 4℃에 도달했을 때 동결액(LEYGO 용액 : 89.5% v/v LEY 희석제 9% v/v glycerol, 1.5% v/v Orvus ESP astes[OEP], 100 mM trehalose, 0, 100, 200, 400, 800 µM/ml MTG)을 첨가한다. 처리된 정자 부유액은 0.25 ml 스트로우에 넣어 액체 질소로부터 4 cm 위의 공기에서 1분간 동결한 후

액체 질소에 보관한다.

4. 융해 후 정자 활성 측정

정자 운동성은 computer-assisted sperm analysis(CASA) 체계(Hamilton Thorne Inc.)로 측정되었다. 동결 보존된 정자 표본은 50℃ 항온 수조에서 15초 동안 융해된 후, 15 ml tube로 옮겨 37℃로 미리 데워진 10 ml mMB로 희석하였다. 희석 후, 정자 세포는 300 × g에서 10분 동안 상온에서 원심분리 하였다. 이후 정자는 mMB를 이용해 5×10^7 정자/ml 농도로 희석하였다. 분석을 위해, 3 µl의 정자 표본을 counting chamber (20 µMm 깊이)에 넣어 현미경으로 관찰하였다. CASA 분석을 통해 motility, progressive motility, path velocity(VAP), straight-line velocity(VSL), curvilinear velocity(VCL), 정자 머리의 lateral amplitude(ALH), 정자 머리의 beat cross frequency(BCF), straightness(STR), 그리고linearity(LIN)를 관찰하였다.

5. 미토콘드리아의 활성 측정

정자 표본들을 Rhodamine 123(Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK)을 첨가하여 최종 농도 10 µg/ml로 맞추고, 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 mMB로 세척한 후 형광현미경(Axiovert 200, Zeiss, Germany)하에서 300마리 이상의 정자를 관찰하였다.

6. 정자 DNA Integrity 평가

정자 표본으로 슬라이드를 만들고, Carnoy's 고정액(methanol : acetic acid = 1 : 3)으로 2시간 동안 슬라이드를 고정한다. 고정이 완료된 슬라이드를 5분 동안 acridine orange(AO) 용액으로(0.1% acridine orange, 0.1 M citric acid, 0.3 M sodium phosphate dibasic) 염색한 후 물로 세척한다. 형광현미경 하에서 300마리 이상의 정자를 관찰하였다.

7. Hypo-osmotic Swelling Test(HOST)를 통한 세포막의 Integrity 판별

동결 해동된 정자를 100 mOsM의 저삼투성 용액에 넣고, 1시간 후에 변화를 관찰하였다. 부풀거나 꼬리가 감긴 정자의 비율을 측정하여 부풀거나 꼬리가 감긴 경우를 정상으로 판단하였다. 현미경 하에서 300마리 이상의 정자를 관찰하였다.

8. MTG의 활성산소 억제 능력 평가

에탄올에 최종 농도 0.5 mM로 맞추어 DPPH 용액을 만든다. mMB에 MTG를 농도 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µM으로 맞추어 희석하여 mMB-MTG 용액을 준비하고, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 용액과 섞어준다(mMB-MTG 용액 : DPPH 용액 = 1 : 3). 암실에서 20분 동안 반응시킨 후 13.5 rpm으로 3분간 원심 분리하여 탁도를 낮춘다. 혼합 용액을 96

well에 150 μ l씩 넣어 639 nm의 파장으로 ELISA(Awareness technology stat fax 4200)로 흡광도를 측정한다.

결 과

정자의 운동성은 CASA system으로 측정되었고, 대조군($41.3 \pm 4.9\%$)과 비교하였을 때, MTG 농도 200 μ M($56.7 \pm 2.9\%$)과 400 μ M($54.7 \pm 2.3\%$)에서 높은 운동성의 유의차를 보였다($P < 0.01$). 또한 200 μ M($56.7 \pm 2.9\%$)와 100 μ M($41.7 \pm 2.5\%$), 400 μ M($54.7 \pm 2.3\%$)와 100 μ M($41.7 \pm 2.5\%$) 사이에서도 차이를 나타냈다($P < 0.01$). 운동성의 경우 대조군과 MTG 처리군의 실험값을 상자 그림으로 나타내었다(Fig. 1). 속도 분포의 지표들 중 BCF에서 200 μ M($56.7 \pm 2.9\%$)과 100 μ M 사이에서 $P < 0.01$ 의 차이를 보이며, 400 μ M($54.7 \pm 2.3\%$)과 100 μ M($41.7 \pm 2.5\%$) 사이에서는 $P < 0.05$ 로 100 μ M의 경우가 낮게 나타났다. 또한 LIN에서 400 μ M($54.7 \pm 2.3\%$)과 100 μ M($41.7 \pm 2.5\%$)을 비교하였을 때, $P < 0.05$ 로 차이를 보였다. 그 외의 지표들은 MTG 처리군과 대조군 사이의 차이를 보이지 않았다(Table 1).

MTG를 첨가하여 동결 보존한 정자 표본을 용해 후 hypo-osmotic swelling test(HOST)를 통해 세포막의 정상성을 확인하였다. 한 번의 관찰 당 300마리 이상의 정자를 관찰하여 2,021마리(0 μ M), 2,048마리(100 μ M), 1,914마리(200 μ M), 1,644마리(400 μ M), 2,227마리(800 μ M)를 확인한 결과, 100 μ M, 200 μ M, 800 μ M에서는 각각 $71.4 \pm 2.8\%$, $75.6 \pm 4.4\%$, $77.8 \pm 2.6\%$ 로 0 μ M($69.2 \pm 4.7\%$)보다 높았지만, 400 μ M($69.7 \pm 8.2\%$)에서 낮은 비율을 나타내면서 유의차를 보이지 않았다

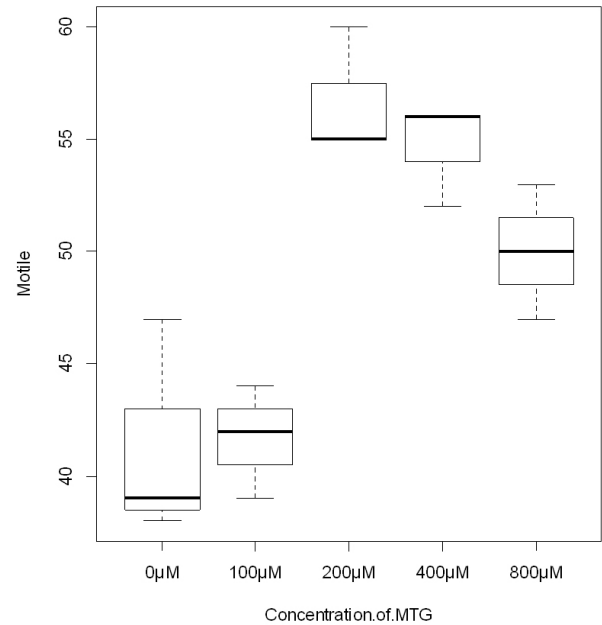


Fig. 1. Effect of MTG on the sperm motility. The column represents mean \pm SE, $n=3$.

다(Fig. 2).

용해 후 정자 DNA integrity에 대한 MTG의 영향을 확인하기 위해 AOT를 진행하였다. 초록색 형광은 정상 DNA, 붉은색 형광은 변성된 DNA를 나타내므로 각각의 형광을 띠는 정자를 각각 584마리(0 μ M), 617마리(100 μ M), 586마리(200 μ M), 570마리(400 μ M), 595마리(800 μ M)씩 세어 정상인 정자를 판단한 결과, 0 μ M($61.0 \pm 9.6\%$)과 비교하여 100 μ M

Table 1. The mean values of control and MTG treated post-thaw boar sperm (mean \pm SE, $n=3$).

Parameter	Control	Monothiolglycerol			
		100 μ M	200 μ M	400 μ M	800 μ M
Motility(%)	41.3 ± 4.9^a	41.7 ± 2.5^a	56.7 ± 2.9^b	54.7 ± 2.3^b	50.0 ± 3.0^{ab}
Progressive(%)	16.3 ± 5.8	25.0 ± 1.0	26.0 ± 6.6	26.0 ± 7.9	24.3 ± 3.2
VAP(μ m/s)	28.9 ± 5.4^{ab}	23.9 ± 1.6^a	34.2 ± 4.6^b	28.5 ± 3.1^{ab}	30.6 ± 2.9^{ab}
VSL(μ m/s)	22.0 ± 5.2	19.5 ± 2.2	26.6 ± 6.4	25.2 ± 5.1	25.2 ± 1.9
VCL(μ m/s)	56.3 ± 6.4	50.8 ± 3.5	61.6 ± 6.0	44.4 ± 16.8	57.9 ± 9.9
ALH(μ m/s)	2.8 ± 0.2^{ab}	2.5 ± 0.3^a	3.1 ± 0.2^b	3.0 ± 0.3^{ab}	3.0 ± 0.1^{ab}
BCF(Hz)	14.9 ± 0.9^{ab}	12.6 ± 0.2^a	16.5 ± 1.2^b	15.8 ± 0.9^b	14.4 ± 1.3^{ab}
STR(%)	22.0 ± 1.0^{ab}	18.3 ± 1.2^a	23.7 ± 1.5^b	24.3 ± 2.1^b	22.7 ± 1.2^b
LIN(%)	18.7 ± 3.2^{ab}	12.7 ± 1.5^a	17.7 ± 3.8^{ab}	24.3 ± 3.8^b	17.7 ± 3.8^{ab}

* Different letters(a, b) indicate a significant difference(motility : $P < 0.001$, BCF : $P < 0.01$, STR : $P < 0.01$, LIN : $P < 0.05$, however VAP and ALH have a little significant difference.).

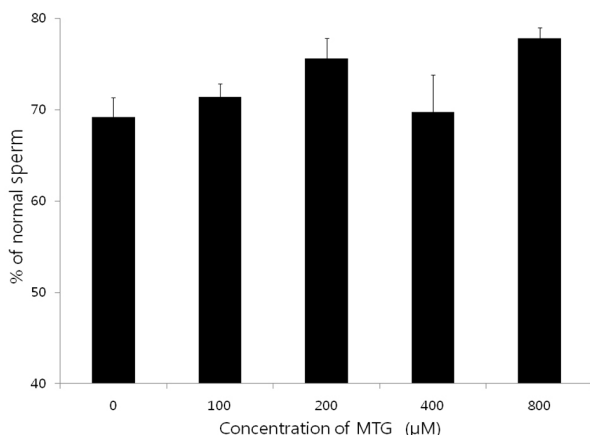


Fig. 2. Effect of MTG on the membrane integrity of post-thaw sperm. y axis was expressed as a mean values with the percentage of normal sperm counts. The column represents mean \pm SE, n=4.

(82.8 \pm 1.8%), 200 μ M(89.8 \pm 1.1%), 400 μ M(84.2 \pm 4.4%), 800 μ M(81.5 \pm 2.3%)의 모든 MTG 처리군에서 $P<0.05$ 의 유의차를 확인할 수 있었다. 실험군에서 수치로는 MTG 농도가 0.2 mM일 때 89.8 \pm 1.13으로 가장 높았으나, 실험군 사이의 유의차는 없었다(Fig. 3).

MTG를 첨가한 동결액에 의한 정자의 미토콘드리아의 활성을 확인하기 위해 Rhodamine 123으로 형광 염색하여 확인하였다. 확인한 정자의 수는 각각 1,550마리(control), 1,637마리(0.1 mM), 1,416마리(0.2 mM), 1,373마리(0.4 mM), 1,407마리(0.8 mM)이며, 정자의 중편에서 초록색 형광을 나타내는 것을 미토콘드리아의 정상 활성으로 판단하였다. 그 결과, MTG

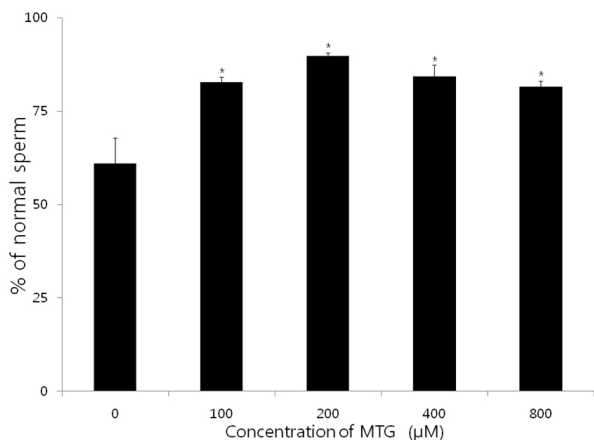


Fig. 3. Effect of MTG on the DNA integrity. y axis was expressed as a mean values with the percentage of normal sperm counts difference between control. * $P<0.05$, The column represents mean \pm SE, n=4.

를 첨가한 실험군과 control을 비교했을 때 유의차가 있었으며($P<0.001$), 실험군 내에서 농도에 따른 차이도 나타났다. 수치상으로 0.2 mM의 MTG를 첨가하였을 때 72.93 \pm 0.5%로 가장 높은 미토콘드리아 활성을 나타냈다(Fig. 4).

mMB에 대한 MTG의 항산화 활성을 알아보기 위하여 DPPH 반응 실험을 진행한 결과, 양성 대조군으로 사용된 ascorbic acid (A.A)의 항산화 활성보다 MTG의 항산화 활성이 저농도에서 더 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

정자 동결 보존제의 첨가 물질로는 glycerol을 주로 사용하고 있다. Gutierrez-Perez(2009) 등은 난황과 glucose 또는 trehalose를 섞은 용액에 0.5~4%의 glycerol을 첨가하여 실험한 결과, glucose를 넣은 4% glycerol 용액이 가장 높은 돼지 정자의 운동성을 확인하였다(Gutierrez-Perez 등, 2009; Hu 등, 2009). 이 실험 결과는 최근에 동결 보존제의 첨가제로 glycerol을 주로 사용하는 이유를 뒷받침한다. 그러나 또 다른 연구에서는 blue pigeon의 정액에 4~8% glycerol 또는 4~8% DMSO와 TALP를 함께 첨가하여 동결 보존하였다(Sontakke 등, 2004). 그리고 용해 후 정자의 운동성을 확인한 결과, 8% DMSO를 첨가하였을 때 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 서론에서 제시한 glycerol의 독성 때문으로 사료되며, 본 연구에서는 glycerol의 긍정적인 영향을 얻되, 악영향은 억제하기 위하여 MTG를 첨가하였는데, MTG의 GK활성 억제 효과를 기대한 것처럼 적절한 농도의 MTG 첨가에서 동결 용해 후에 더 좋은 생존 능력을 확인하였다(Watson, 2000).

동결 보존된 돼지 정자의 용해 후 DNA의 손상 정도는 gly-

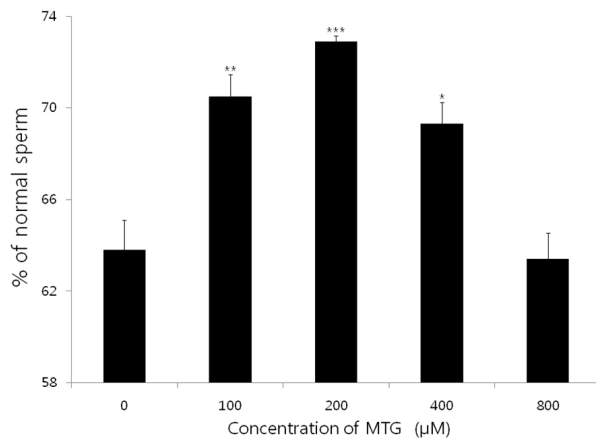


Fig. 4. Effect of MTG on the mitochondrial activity. y axis was expressed as a mean values with the percentage of normal sperm counts. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, The column represents mean \pm SE, n=4.

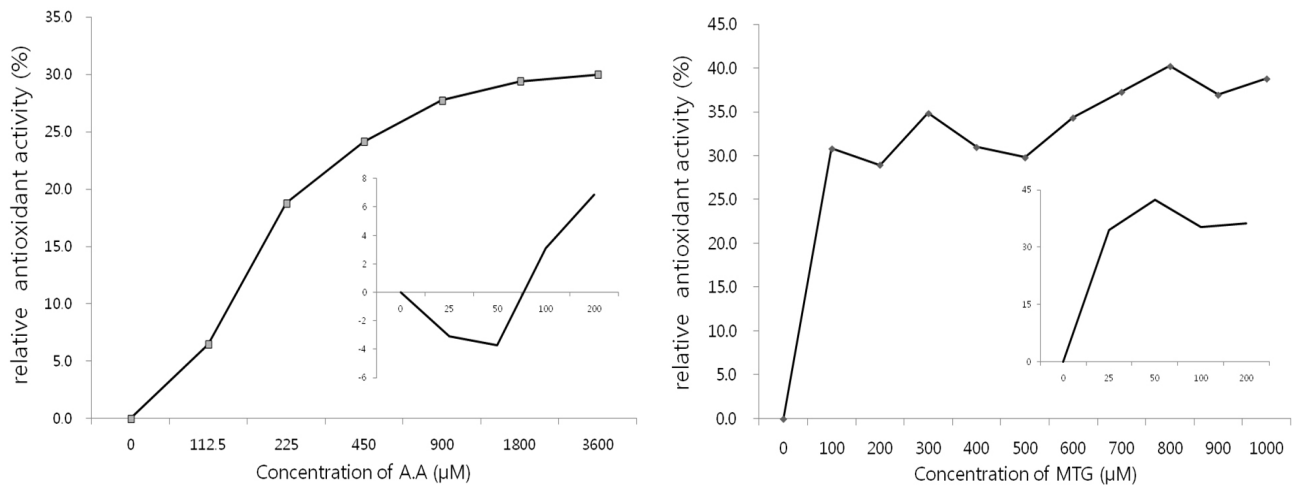


Fig. 5. Effect of MTG on the inhibition of ROS generation. Each small graph indicates relative antioxidant activity at low concentration, The column represents mean \pm SEM, $n=4$.

cerol만 첨가제로 넣어 동결할 때보다 glycerol과 trehalose를 같이 첨가하였을 때 더 적다는 연구기록이 있다(Park 등, 2012). 본 연구에서 glycerol에 MTG를 첨가하여 동결 보존한 결과, AOT를 통해 용해 후 안정한 DNA를 갖는 정자의 비율이 증가한 것을 확인하였다($P<0.05$). MTG는 GK를 억제하여 glycerol의 독성 대사물질 생성을 저해하는 기능을 갖고 있으므로 위와 같이 기대한 결과를 얻을 수 있었다(Seltzer 등, 1986).

기존의 실험에 의하면 mouse 정자 운동성에 MTG의 영향은 없다고 설명되어 있지만, 본 실험에 따르면 MTG가 돼지 정자의 운동성에는 좋은 영향을 주는 것으로 나타났다(Ostermeier 등, 2008). 대조군의 운동성은 41.3%를 나타낸 반면 0.2 mM과 0.4 mM에서는 각각 56.5%, 54.6%로서 MTG 첨가군이 유의적으로($P<0.01$) 높은 결과를 보였다. 그러나 progressive motility, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN은 대조군과 MTG 첨가군 사이의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 MTG의 첨가가 운동성을 갖는 정자의 비율을 높여주지만, 정자의 최대 활성이나 속도 분포에는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

환원제로서의 역할을 갖는 MTG는 또 다른 환원제인 Mn^{++} 의 작용과 비교하였을 때, 용해 후 정자의 세포막 손상 정도에 차이를 나타내었다. 망간의 효과를 보고한 연구에서 Mn^{++} 가 4°C로 냉각된 정자와 동결 보존 용해 후 정자의 운동성과 세포막의 손상 정도를 확인하였다. Mn^{++} 농도 150 μM 에서 용해 후 정자 $58.3 \pm 3.6\%$ 로 가장 운동성이 좋았으며, 세포막의 정상성 또한 $30.1 \pm 6.9\%$ 로 가장 높았다. 그러나 58.3%와 30.1%의 차이 비율인 약 28%의 정자는 Mn^{++} 의 영향 하에 운동성은 향상되었으나, 세포막에 손상이 있었다(Cheema 등, 2009). 이 연구에 의하면 사람의 정자에서 Mn^{++} 의 영향은 정자 내 칼슘의 농도를 높여 운동성 증진에 기여하지만, 세포막의 손상을

야기한다고 보고된다. 본 연구에서 첨가한 MTG의 경우, 정자의 운동성을 높였으나 세포막의 정상성에는 기여하지 않는 것으로 나타났다. Mn^{++} 은 금속 이온 상태 물질이기에 thiol 기를 갖고 있는 MTG의 경우와 항산화 방식에서 차이가 있어 위와 같은 결과가 나온 것으로 보인다.

Ginsenoside-Rg1을 동결 보존제에 첨가하여 용해 후 정자의 미토콘드리아의 활성을 확인한 연구에 따르면 대조군과 비교하였을 때 첨가군에서의 미토콘드리아 활성이 높게 나타났다(Hwang과 Kim, 2013). Ginsenoside-Rg1 또한 항산화 물질로서 자유 라디칼을 없애는 역할을 한다고 알려져 있다(Zou 등, 2013). 본 실험에서 사용한 MTG의 경우에도 R 123 형광 염색을 통해 확인한 결과, 같은 항산화 기능으로서 미토콘드리아의 활성이 증가되었다.

이러한 MTG의 항산화 능력을 DPPH 검사를 통해 확인하였을 때, 동결액(LEYGO)에 포함된 정자에 대한 MTG의 직접적인 DPPH 검사 결과를 얻을 수 없었다. 용해 후 정자 부유액에는 여러 물질들과 정자가 섞여 탁도가 매우 높았기 때문에 실험상의 오차를 배제할 수 없어, 본 연구에서 사용한 정자 희석액인 mMB에 대한 MTG의 효과를 측정하게 되었다. 양성 대조군으로 사용한 A.A의 경우(Yamaguchi 등, 1998), 반복 실험을 통해 mMB에 대하여 저농도(3,600 μM)와 고농도(57,600 μM)에서 두 차례 최대 항산화 효과를 나타내는 2차 반응의 양상을 나타내었으나, 추후 더 자세한 연구를 위하여 실험결과는 첨부하지 않았다. MTG의 경우, 상대적으로 저농도(100, 200, 400, 800 μM)에서의 활성 확인이 필요하였기에 Fig. 5에서 0~200 μM 까지의 serial dilution의 결과를 작은 그래프로 첨부하였다. 이를 통해 IC_{50} 의 값이 MTG의 경우가 A.A보다 더 작은 것을 확인할 수 있었다.

기존의 연구를 통해 MTG의 항산화 활성의 능력은 사람,

취 등에서 보고된 바 있다(Tsuneto 등, 2005 Lee 등, 2010 Gray 등, 2013). 이러한 배경을 토대로 miniature pig의 정자 동결 보존에 MTG의 효능을 적용해 보았고, DNA 안정성과 미토콘드리아의 활성 정도에서는 200 μ M에서 기대한 만큼의 결과를 보여주었으나, 세포막의 안정성에는 큰 기여를 나타내지 않았다. 또한 mMB에 대한 항산화 능력을 확인한 연구는 본 연구에서 처음으로 시도되었으며, 위의 결과를 통해 동결액에만 MTG를 첨가하는 것이 아니라, mMB 희석액에도 MTG를 첨가하여 세척에 사용한다면 보다 좋은 상태의 정자를 동결 보존할 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

연구 과제를 수행할 수 있도록 매주 미니돼지의 정액 샘플을 제공해 주신 강원대학교 박춘근 교수님께 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Aitken RJ, Jones KT and Robertson SA. 2012. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *J. Androl.* 33: 1096-1106.
- Chatterjee S and Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 451-458.
- Cheema RS, Bansal AK and Bilaspuri GS. 2009. Manganese provides antioxidant protection for sperm cryopreservation that may offer new consideration for clinical fertility. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2: 152-159.
- Cormier N, Sirard MA and Bailey JL. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 18: 461-468.
- Critser JK and Mobraaten LE. 2000. Cryopreservation of murine spermatozoa. *Ilar. J.* 41: 197-206.
- Gray JE, Starmer J, Lin VS, Dickinson BC and Magnuson T. 2013. Mitochondrial hydrogen peroxide and defective cholesterol efflux prevent *in vitro* fertilization by cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol. Reprod.* 89: 17.
- Gutierrez-Perez O, Juarez-Mosqueda Mde L, Carvajal SU and Ortega ME. 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58: 287-292.
- Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.
- Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS and Zhao HW. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 571-575.
- Hwang YJ and Kim DY. 2013. Effects of ginsenoside-Rg1 on post-thawed miniature pig sperm motility, mitochondria activity, and membrane integrity. *J. Emb. Trans.* 28: 63-71.
- Jha PK, Paul AK, Rahman MB, Tanjin M, Bari FY and Alam MGS. 2013. Improvement of preservation quality of chilled bull semen using α -tocopherol as an antioxidant. *J. Emb. Trans.* 28: 31-39.
- Kaneko T, Yamamura A, Ide Y, Ogi M, Yanagita T and Nakagata N. 2006. Long-term cryopreservation of mouse sperm. *Theriogenology* 66: 1098-1101.
- Lee SY, Ahn JH, Ko KW, Kim J, Jeong SW, Kim IK and Kim HS. 2010. Prostaglandin A2 activates intrinsic apoptotic pathway by direct interaction with mitochondria in HL-60 cells. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 91: 30-37.
- Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS and Taft RA. 2008. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation. *PLoS One.* 3: e2792.
- Park CH, Kim SW, Hwang YJ and Kim DY. 2012. Cryopreservation with trehalose reduced sperm chromatin damage in miniature pig. *J. Emb. Trans.* 27: 107-111.
- Rosato MP and Iaffaldano N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79: 508-516.
- Seltzer WK, Dhariwal G, McKelvey HA and McCabe ER. 1986. 1-Thioglycerol: inhibitor of glycerol kinase activity *in vitro* and *in situ*. *Life Sci.* 39: 1417-1424.
- Sontakke SD, Umapathy G, Sivaram V, Kholkute SD and Shivaji S. 2004. Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue Rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology* 62: 139-153.
- Takahashi H and Liu C. 2010. Archiving and distributing mouse lines by sperm cryopreservation, IVF, and embryo transfer. *Methods Enzymol.* 476: 53-69.
- Tsuneto M, Yamazaki H, Yoshino M, Yamada T and Hayashi S. 2005. Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 1239-1246.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryo-

- preserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
- Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T and Terao J. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1201-1204.
- Zou Y, Tao TZ, Tian Y, Zhu JL, Cao LJ, Deng XM and Li JB. 2013. Ginsenoside Rg1 improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis by suppressing the inflammatory response and apoptosis of lymphocytes. *J. Surg. Res.* 183: 760-766.
-
- (접수: 2013. 09. 09/ 심사: 2013. 09. 11/ 채택: 2013. 09. 24)