

배양액중의 calcium 이온 농도 및 caffeine과 Ca-ionophore A23187 처리가 소정자의 수정능획득에 미치는 영향

김계성 · 조충호 · 황우석
서울대학교 수의과대학
(1990. 10. 12 접수)

The effect of calcium ion concentrations in the medium and the treatment of caffeine and Ca-ionophore A23187 on *in vitro* capacitation of bull spermatozoa

Kye-Seong Kim, Choong-Ho Jo, Woo-Seok Hwang
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Oct 12, 1990)

Abstract: The present study was performed to investigate the effect of Ca ion concentration on sperm viability and acrosome reaction rate and to evaluate the effect of treatments using caffeine and Ca-ionophore A23187 on acrosome reaction rate in frozen-thawed bull spermatozoa.

Viabilities of *in vitro* capacitated bull spermatozoa at 0, 2.25 and 4.5 mM Ca ion concentrations were 21.00, 26.00 and 22.59%, respectively and significantly higher in Ca ion 2.25mM added group than Ca ion free group ($p < 0.05$) and acrosome reaction rates of *in vitro* capacitated bull spermatozoa were 17.09, 52.15 and 47.92%, respectively and significantly high in Ca ion added groups ($p < 0.05$).

Viabilities *in vitro* capacitation by caffeine and Ca-ionophore A23187 in control, caffeine treated group, Ca-ionophore A23187 treated group and caffeine+Ca-ionophore A23187 treated group were 37.91, 27.67, 22.33 and 25.59%, respectively and significantly higher in control than treated groups ($p < 0.05$), there were no significant differences among the treated groups, and acrosome reaction rates were 10.33, 37.92, 48.09 and 57.17%, respectively and there were significant differences among the groups ($p < 0.05$), especially higher in caffeine+Ca-ionophore A23187 treated group than others.

Key words: Bull spermatozoa, acrosome reaction, calcium, Ca-ionophore A23187, caffeine.

서 론

포유동물의 정자가 수정능력을 가지려면 일차적으로 정소상체내에서 성숙이 이루어져야 하고 이차적으로는 자성의 생식도관내에서 일정시간 머물러 있어야 한다는 사실을 1951년 Chang¹이 보고하였으며, 이런 현상을 수정능획득이라 하였다.

Yanagimachi와 Usui²는 기니피 정자에서는 세포질

내 Ca이온이 침체반응을 개시하는데 필수적이라는 사실을 확인하였으며 그 이후 Ca이온은 포유류와 무척추동물의 정자에 모두 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 Ca이온은 정소상체미로 부터 얻어진 램스터의 정자^{3,4}와 랫드의 정자⁵의 운동성을 자극한다고 보고되었다. 그러나 Bredderman과 Foote⁶는 소정자에서 그리고 McGrady et al⁷은 소와 켈펜지 정자에서 각각 상대적으로 높은 세포질외의 Ca이온은 정자의 운동성

을 감소시킨다고 보고하였다.

Yanagimachi와 Usui²는 독특한 꼬리의 운동성(hyperactivation)이 수정능획득 후의 정자에서 나타난다고 하였으며 세포질내 Ca이온은 햄스터와 기니픽에서 정자의 이런 변화에 필요하다고 보고하였다. 또한 Babcock et al⁸은 세포질외의 Ca이온과 함께 Ca-ionophore A23187에 의해서 몹시 심한 꼬리의 운동성이 유도된다고 보고하였다.

Ca 이온 외에도 온도 및 pH⁹, K이온¹⁰, Mg이온¹², glucose나 pyruvate 같은 에너지원^{13,14}, albumin과 같은 거대분자^{12,13,15} 등이 정자의 수정능획득과 침체반응에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

Kopf et al¹⁶은 정자의 침체반응을 유도하는 독립된 요인은 cAMP뿐이라고 하였고, cAMP의 효과는 세포질외의 Ca 이온에 의존하는 것 같으며 Ca 이온의 정자내 유입과 cAMP 수준의 증가는 서로 밀접한 관계가 있다고 하였다. Caffeine, thyroxine과 triiodothyronine 등이 원숭이 정자¹⁷, 햄스터 정자¹⁸ 및 마우스 정자¹⁹의 cAMP 수준을 증가시켜 정자의 운동성을 자극한다고 보고하였다.

소 정자의 체외에서의 수정능획득과 침체반응을 유도하기 위하여 heparin,²⁰⁻²² Ca-ionophore,²³⁻²⁵ bovine serum albumin,^{23,24,26,27} caffeine,^{21,22,24,25} high ionic strength medium,²⁸ modified-Krebs Ringer bicarbonate solution,²⁹ chondroitin sulfate³⁰ 및 소난포액³¹ 등에 의한 연구가 이루어졌다.

한편, 체외수정의 편의성과 반복성을 도모하기 위하여 동결정액을 이용하는 방법이 시행되었다.³² 그러나 동결융해한 정자는 체외에서의 생존시간이 짧기 때문에 체외에서 수정능획득을 유도하기 위한 배양을 실시함에 있어서 정자의 활력에 영향을 미치지 않는 신속하고 효과적인 방법을 요구하게 되었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 정자의 수정능획득에 영향을 미치는 요인과 체외에서의 수정능획득 방법에 관하여 많은 연구가 실시되었으나 수정능증진 및 수정방법의 편의성 제고를 위해 아직 미해결의 문제가 잔존하고 있는 실정이다. 이에 저자는 동결융해한 소정자를 이용하여 정자의 수정능획득과정에서의 Ca이온의 영향과 체외수정능획득시 caffeine과 Ca-ionophore의 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료 : 본 실험에 사용한 정자는 국립 축산시험장으로 부터 제공받은 0.5ml straw당 5×10^7 정자가 들어 있는 소 동결정액을 사용하였다.

Table 1. Components of a brackett & orliphant medium

	Components	mg/100ml	mM
A solution	NaCl	655.0	112.00
	KCl	30.0	4.02
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	33.0	2.25
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	11.3	0.52
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.6	0.83
B solution	NaHCO ₃	310.4	38.00

배양액 및 체외배양 조건 : 정액의 희석과 정자의 체외배양을 위한 배양액으로 Brackett과 Orliphant 배양액(이하 'BO 배양액'으로 약함)을 기본 배양액으로 사용하였다(Table 1).

A액에는 각각의 시약을 순서대로 넣어 완전히 녹인 후 pH 지시약으로 1% phenol red를 0.2ml 첨가하였다. B액에는 1% phenol red를 0.08ml 첨가한 후 CO₂ gas로 30분간 bubbling을 실시하였다.

배양액 사용시에는 A액 380ml에 glucose 1.25g, pyruvate 0.06875g과 항생제로 penicillin 37.5mg과 streptomycin 25mg을 첨가한 후 120ml의 B액을 섞어서 0.2 μ m의 millipore를 사용하여 멸균한 후 사용하였다.

Caffeine(Fluka chemika, Switzerland) 처리군에서는 BO배양액에 10mM 농도로 caffeine을 첨가한 후 동일한 방법으로 멸균하여 사용하였다(이하 'BO-caffeine'으로 약함).

Caffeine 처리군, Ca-ionophore A23187(Sigma Chemical Co, USA; 이하 'Ca-ionophore'로 약함)처리군 및 caffeine, Ca-ionophore 복합 처리군에서는 BO 배양액에 bovine serum albumin(BSA)을 2% 농도로 첨가한 배양액을 동일한 방법으로 멸균하여 사용하였다(이하 'BO-BSA'로 약함).

정자의 체외배양은 정자부유액을 플라스틱 시험관에 넣고 37°C, 5% CO₂, 95% 공기 및 습도가 포화인 CO₂ 배양기내에서 실시하였다.

정자의 준비 : 동결정액을 온탕융해법으로 37°C 수조에서 30초간 담그어 융해한 후 플라스틱 시험관에 넣어 37°C 수조내에서 보관하였다.

동결보호제를 제거하기 위하여 5ml의 BO배양액(또는 BO-caffeine)을 융해한 정액에 천천히 가한 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이 과정을 2회 반복 실시하여 동결보호제를 완전히 제거한 후 정자수가 5×10^7 /ml가 되도록 BO배양액(또는 BO-

caffeine)으로 재부유시켰다.

그 후 실험군에 따라 정자를 처리하였다.

정자의 처리

Ca 이온이 정자의 생존성과 침체반응에 미치는 효과 : Ca 이온 농도가 각각 0, 2.25 및 4.5mM인 BO 배양액으로 정자를 준비하였다. 각군에 0.1 μ M 농도의 Ca-ionophore를 30초간 반응시킨 후 BO-BSA 배양액을 정자를 재부유시킨 때의 BO 배양액과 동량으로 첨가하여 CO₂ 배양기내에서 2시간동안 배양을 실시하였다.

Caffeine과 Ca-ionophore가 정자의 생존성과 침체반응에 미치는 효과 : 대조군과 Ca-ionophore 처리군은 BO 배양액으로 정자를 준비하였으며, caffeine 처리군과 caffeine, Ca-ionophore 복합처리군에서는 BO-caffeine으로 동일한 과정을 실시하여 정자를 준비하였다.

Ca-ionophore 처리군에는 각각 0.1 μ M 농도의 Ca-ionophore를 30초간 반응시킨 후 BO-BSA 배양액을 정자를 재부유시킬 때의 BO 배양액과 동량으로 첨가한 후 CO₂ 배양기내에서 2시간동안 배양을 실시하였다.

Caffeine 처리군은 준비된 정자부유액에 동량의 BO-BSA를 첨가한 후 4시간동안 CO₂ 배양기내에서 배양을 실시하였다.

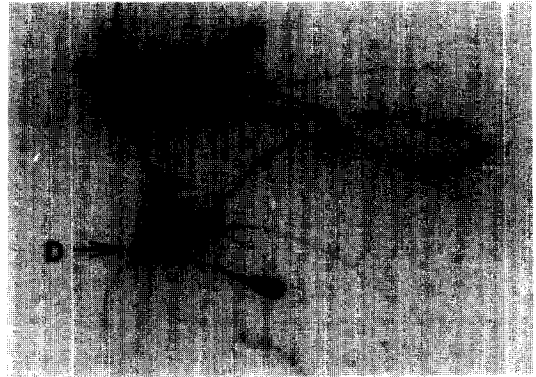


Fig 1. Photomicrograph of bovine sperm using light microscopy. Sperm were stained for viability by Eosin-Nigrosin stain. Sperm that are lived(L) are apparent as lighter uptake of stain as compared to dead(D). $\times 400$.

정자의 염색

정자의 생사염색 : 정자의 용해 후, 처리 후 및 배양 후의 생존성을 검사하기 위하여 Eosin-Nigrosin염색법으로 염색한 후 광학현미경($\times 400$)하에서 표본 당 200 개씩의 정자를 세어 생존률을 확인하였다.

생사판별은 생존정자는 밝은 분홍색, 사멸정자는 Eosin 염색액의 침투로 길게 염색된 것을 기준으로 하였다(Fig 1).

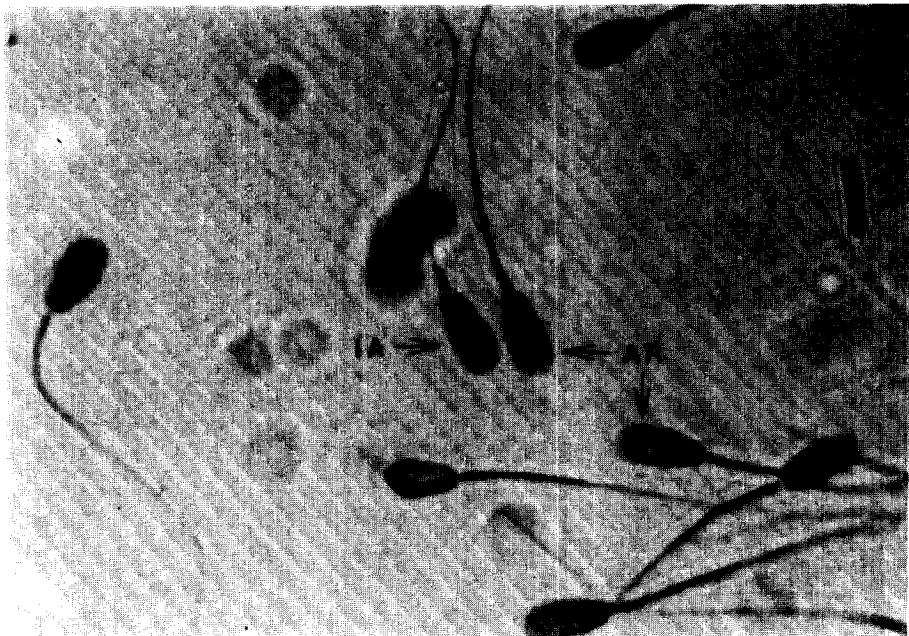


Fig 2. Photomicrograph of bovine sperm using light microscopy. Sperm were stained for acrosome reaction by Bryan & Akruk stain. Sperm that are acrosome reacted(AR) are apparent as lighter uptake of stain as compared to sperm with intact acrosomes(IA). $\times 1000$.

정자의 침체염색 : 정자의 침체반응을 확인하기 위한 염색법으로 Bryan과 Akruk 염색법³⁴을 변형하여 사용하였다.

배양 후의 정자 부유액을 슬라이드 글라스에 도말한 후 공기 중에서 충분히 건조시켰다. 도말표본을 1% acetic acid 수용액에 naphthol yellow S (Sigma Chemical Co., USA)를 0.1% 농도로 용해시킨 염색액에 30분간 담그어 염색을 실시한 후 도말표본을 여과지에 눌러 말리고 1% acetic acid 수용액으로 10초간 세척하였다. 이어 0.2% naphthol yellow S 수용액과 0.2% erythrosin B (Sigma Chemical Co. USA) 수용액을 동량으로 섞은 염색액 (pH 4.6~5.0)에서 13분간 담그어 염색을 실시한 후 pH 4.8인 증류수로 세척하고 여과지로 눌러 말린 후 공기중에서 완전히 건조시켰다. 염색된 슬라이드 글라스를 xylene에 담근 후 꺼내어 커비슬립을 덮고 광학현미경 ($\times 1000$)하에서 표본 당 200개씩의 정자를 세어 침체반응을 확인하였다.

침체반응확인용 침체반응이 일어난 정자는 침체부위가 탈색된 듯하게 희미하게 염색된 것으로, 정상침체를 가진 정자는 침체의 막부위가 짙게 염색된 것을 기준으로 하였다(Fig 2).

통계처리 : 실험결과치는 분산분석으로 각 실험군간의 유의성을 검정한 후 LSD를 이용한 다중평균비교를 통하여 비교분석하였다.

결 과

소 정자의 수정능획득과정에서 Ca 이온이 정자의 생존률과 침체반응에 미치는 영향과 caffeine과 Ca-ionophore가 체외수정능획득에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험을 실시한 결과는 다음과 같다.

Ca 이온이 정자의 생존률에 미치는 영향 : BO 배양액중의 Ca 이온 농도 0, 2.25 및 4.5mM에 대한 정자의 생존률은 각각 21.00, 26.00 및 22.59%로 Ca 이온 농도 2.25mM인 군이 Ca 이온이 첨가되지 않은 군보다 생존률이 유의성있게 높았으며 ($p < 0.05$), Ca 이온 첨가기간에는 유의차를 인정할 수 없었으나 2.25mM 농도로 첨가된 군이 4.5mM인 군보다 약간 높게 나타났다(Table 2).

Ca 이온이 정자의 침체반응에 미치는 영향 : BO 배양액중의 Ca 이온 농도 0, 2.25 및 4.5mM에 대한 정자의 침체반응률은 각각 17.09, 52.15 및 47.92%로 Ca 이온이 첨가된 군이 첨가되지 않은 군보다 유의성있게 높았으며 ($p < 0.05$), Ca 이온 농도 2.25mM인 군이 4.5mM인 군보다 약간 높은 수준을 나타내었다 (Table 3).

Table 2. Effect of calcium ion concentration on sperm viabilities

Calcium ion concentration (mM)	*Percent of sperm lived
0	21.00±2.49a
2.25	26.00±5.17b
4.5	22.59±3.84ab

*: Mean±SD.

a, b: Different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

Table 3. Effect of calcium ion concentration on sperm acrosome reaction rates

Calcium ion concentration (mM)	*Percent of sperm acrosome reacted
0	17.09±3.79a
2.25	52.15±4.79b
4.5	47.92±3.53b

*: Mean±SD.

a, b: Different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

Table 4. Effect of caffeine and Ca-ionophore on sperm viabilities

Sperm treatments	Percent of sperm lived*
control	37.91±9.99a
caffeine	27.67±2.54b
Ca-ionophore	22.33±3.31b
caffeine+Ca-ionophore	25.59±2.89b

*: Mean±SD.

a, b: Different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

Table 5. Effect of caffeine and Ca-ionophore on sperm acrosome reaction rates

Sperm treatments	Percent of sperm acrosome reacted*
control	10.33±2.34a
caffeine	37.92±10.70b
Ca-ionophore	48.09±5.06c
caffeine+Ca-ionophore	57.17±2.36d

*: Mean±SD.

a, b, c: Different superscripts denote significant differences ($p < 0.05$).

Caffeine과 Ca-ionophore의 처리가 정자의 생존률에 미치는 영향: 정자의 생존률은 대조군, caffeine 처리군, Ca-ionophore 처리군 및 caffeine, Ca-ionophore 복합처리군에서 각각 37.91, 27.67, 22.33 및 25.59%로 대조군이 처리군에 비하여 유의성있게 높게 나타났으며 ($p < 0.05$), 처리군간에는 유의차를 인정할 수 없었다. 그러나 caffeine이 첨가된 군이 첨가되지 않은 군보다 약간 높은 수준의 생존률을 나타내었다 (Table 4).

Caffeine과 Ca-ionophore의 처리가 정자의 침체반응에 미치는 영향: 정자의 침체반응률은 대조군, caffeine처리군, Ca-ionophore 처리군 및 caffeine, Ca-ionophore 복합처리군에서 각각 10.33, 37.92, 48.09 및 57.17%로 각군별로 유의성있는 차이를 나타내었으며 ($p < 0.05$), caffeine 처리군보다는 Ca-ionophore 처리군이 침체반응률이 높았으며, 특히 caffeine, Ca-ionophore 복합처리군에서 높은 수준을 나타내었다 (Table 5).

고 찰

정자의 성숙과 수정능 획득 및 침체반응에 관계하고 있는 모든 세포내, 외적인 요인들을 종합하여 이에 관한 여러가지 가설들이 제시되었으며 이들을 토대로 Yanagimachi³⁵가 제시한 가설은 정자가 정세관으로 부터 정소상체로 나왔을 때 정자의 원형질막이 정소액과 정소상체액내의 물질에 의해 덜하게 되며 사정시 혼합되는 정장성분도 원형질막을 덮어 매우 안정적인 상태를 유지하게 된다고 한다. 이런 상태의 정자가 암컷의 생식도관내역이나 배양액내에서 원형질막을 덮고 있는 특정물질이 제거되거나 변질되는데 이것을 수정능 획득이라고 한다. 이때 만들어진 경로를 통하여 Ca 이온이 유입되고, 이것에 의하여 원형질막과 침체외막의 전하가 중화되며, phospholipid의 변화가 유발되어 원형질막과 침체외막간의 구조적 혼란을 유발하여 두막의 융합과 소포화를 촉진하고 이것에 의해 막의 탈락과 효소의 분비가 이루어 진다고 한다. 그러나 이 기전에 관한 분자생물학적인 이해가 아직 확실하지 않은 상태이다.

세포내에서의 Ca 이온의 농도와 분포는 여러 종류의 세포에서 중요한 기능을 제어하는 작용이 있으며 정자에서도 역시 regulatory mediator로 작용하는 것으로 알려져 있다.³⁶ 정자의 운동성과 수정획득에 Ca 이온이 필요한 것으로 알려져 있다. Yanagimachi와 Usui²는 Ca 이온이 결여되어 있는 상태에서는 기니픽 정자의 활성화와 침체반응이 억제되어 수정능력이 상실된다고 하였으며, 정자의 활성화와 침체반응을 개시하기 위한

최소한의 Ca 이온농도는 0.2mM이라고 하였다. Morton et al^{3,4}은 햄스터의 정자가 정소내에서 운동성이 억제되는 것은 cAMP와 Ca 이온의 결여 때문이라고 하였으며 Ca 이온에 의해 운동성이 자극된다 하였고, Davis⁵는 마우스 정자에서 Ca 이온 농도 1.7mM에서 정자의 운동성과 수정능력을 자극한다고 하였으나 Bredderman과 Foote⁶는 소의 정자에서, 그리고 McGrady et al⁷은 소와 침팬지의 정자에서 각각 상대적으로 높은 세포질외의 Ca 이온 농도(소에서 각각 7.5mM과 10mM 이상)는 오히려 정자의 운동성을 억제한다고 하였다. 본 실험에서는 Ca 이온이 첨가된 군(2.25mM)의 생존률(26.00%)이 첨가되지 않은 군(21.00%)보다 유의성있게 높게 나타났으며, 침체반응률도 Ca 이온이 첨가된 군(52.15%)이 첨가되지 않은 군(17.09%)보다 유의성있게 높게 나타났다. 이 결과로 미루어 보아 정자의 생존률과 침체반응에 Ca 이온이 필요하다고 생각되며, Ca 이온 농도에 따른 성적의 차이는 통계학적 유의성은 인정할 수 없었으나 2.25mM 수준이 정자의 배양을 위한 배양액에 첨가하는 Ca 이온 농도로 적당한 것으로 생각된다.

Yanagimachi와 Usui는 기니픽과 햄스터의 정자내로 유입된 Ca 이온이 정자의 심한 꼬리의 운동성을 나타낸다고 하였고, Babcock et al⁸은 Ca-ionophore에 의해 유입된 Ca 이온에 의해 소정자와 기니픽 정자에서 몹시 심한 운동성을 확인하였다고 보고하였으며, 이는 수정능 획득후에 관찰할 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 Ca-ionophore 처리후에 소정자의 몹시 심한 운동을 생존한 정자에서 관찰할 수 있어 전술한 선인들의 보고와 일치하였으며 이런 성적은 정자의 수정능 획득을 판정할 수 있는 지표로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Kopf et al¹⁷은 정자의 수정능 획득과 침체반응을 유도하는 독립된 요인은 cAMP 뿐이라고 하였으며 Ca 이온의 정자내 유입과 cAMP 수준의 증가는 서로 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. Casillas와 Hoskins¹⁷는 원숭이 정자에서 thyroxine과 triiodothyronine이 adenylyl cyclase를 활성화시키는 것에 의해서 cAMP가 증가되어 정자의 침체반응이 유도된다고 하였다. Morton과 Albagli¹⁸는 햄스터 정자에서, Fraser¹⁹는 마우스 정자에서 각각 caffeine이 정자내의 cAMP 수준을 증가시켜 정자의 침체반응을 유도한다고 보고하였다. 대사기능이 바뀌게 되고 해당작용과 호흡작용이 증가된다는 것은 운동성의 증가를 의미하는 것이며, phosphodiesterase 활성의 감소와 adenylyl cyclase 활성의 증가로 정자내의 cAMP를 증가시키고 상대적으로 ATP

가 감소된다고 하였다.²¹ 본 실험에서도 정자의 체외배양시에 caffeine이 첨가된 군의 생존률과 운동성이 첨가되지 않은 군보다 오래 지속됨을 관찰할 수 있었으며 이는 앞에서 설명한 바와 같은 기전에 의해서 정자에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

소정자의 체외에서의 수정능 획득과 침체반응을 유도하기 위한 방법으로 여러 가지 화학물질을 첨가하여 배양을 실시하는 방법들이 실시되었다.^{20,22,25,28,30,31} 그러나 수시간에 걸친 체외배양은 정자의 생존률에 큰 손상을 주기 때문에 보다 신속하고 안전한 방법이 강구되었다. 특히 체외수정의 편의성과 반복성을 도모하기 위하여 동결정액을 이용할 때에는 동결융해한 정자는 체외에서 생존시간이 신선정액보다 짧기 때문에 보다 효과적인 방법이 필요하게 되었으며³² 소정자에서 Ca-ionophore를 이용하여 Ca 이온의 정자내로의 유입을 유도함으로써 정자의 수정능 획득과 침체반응을 유도하게 되었다.

Byrd²³는 BSA가 첨가된 배양액내에서 Ca-ionophore의 최종농도가 10 μ M이 되도록 하여 2시간이상 배양하면 90%이상의 침체반응물을 얻을 수 있다고 하였으며 Takahashi와 Hanada²⁴는 BSA가 첨가되지 않은 배양액에서 0.5 μ M 농도의 Ca-ionophore를 2.5분간 반응시킨 3후시간이상 배양했을 때 가장 높은 난자 통과율을 보였다고 하였다. Aoyagi et al²⁵은 BSA가 첨가된 배양액내에서 caffeine처리시는 4시간, caffeine과 Ca-ionophore 복합처리시는 2~3시간 배양하여 수정능 획득후 체외수정을 실시한 결과 복합처리시에 80%이상의 체외수정률을 나타냈다고 하였다. 본 실험에서는 Ca-ionophore를 첨가한 군에서 정자의 침체반응률(2.25 mM, 4.5mM; 48.09%, 57.17%)이 높게 나타났으며 2시간 배양후의 생존률(2.25mM, 4.5mM; 22.33%, 25.59%)도 만족스러운 정도였다. 주목할 점은 caffeine 첨가시에 정자의 생존률이 오래 지속된다는 것이며, Ca-ionophore와 caffeine을 복합처리하였을 때 정자의 침체반응률이 가장 높게 나타났고(57.17%) 생존률도 Ca-ionophore 단독처리시보다 caffeine과 복합처리시에 높게 나타났다(25.59%), 그러나 선인들의 보고에서는 80%이상의 정자에서 침체반응을 보였다고 하였으나 본 실험에서는 평균 57.17%로서 다소 낮은 수준을 나타내었고 이것은 짧은 배양시간 때문인 것으로 사료된다. 이와 같이 Ca-ionophore와 caffeine을 복합처리한 후 2시간 배양하는 것에 의해서 만족스러운 생존률과 침체반응률을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이와 같은 사실로 미루어 소정자의 생존률과 침체반응을 유도하기 위해서는 Ca 이온이 필수요소를 알

수 있었고, Ca-ionophore의 처리는 소정자의 침체반응을 유도함에 있어서 유용하였으며 특히 caffeine과의 복합처리시에 우수한 성적을 얻을 수 있었다. 그러나 아직까지는 정자의 생존률이 낮은 수준이며 또한 사멸정자를 제거하고 활력이 좋은 생존정자만을 선별할 수 있는 방법에 관한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

소 정자의 수정능 획득 과정에서 Ca 이온이 정자의 생존률과 침체반응에 미치는 영향과 caffeine과 Ca-ionophore A23187의 처리가 체외수정능 획득과 침체반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. Ca 이온 농도 0, 2.25 및 4.5mM에 대한 소 정자의 체외에서의 생존률은 각각 21.00, 26.00 및 22.59%로 2.25mM군에서 Ca 이온이 첨가되지 않은 군보다 유의성있게 높게 나타났다($p < 0.05$).

2. Ca 이온 농도 0, 2.25 및 4.5mM에 대한 소 정자의 침체반응률은 각각 17.09, 52.15 및 47.92%로 Ca 이온이 첨가된 군에서 유의성있는 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

3. Caffeine과 Ca-ionophore A23187에 의해 소 정자의 체외수정능 획득을 위한 처리 후의 생존률은 대조군 caffeine 처리군, Ca-ionophore A23187 처리군 및 caffeine, Ca-ionophore A23187 복합처리군에서 각각 37.91, 27.67, 22.33 및 25.59%로 대조군이 처리군에 비해 유의성있게 높게 나타났으며($p < 0.05$), 처리군간에는 유의차를 인정할 수 없었다.

4. Caffeine과 Ca-ionophore A23187에 의한 소 정자의 처리 후의 침체반응률은 대조군, caffeine 처리군, Ca-ionophore A23187 처리군 및 caffeine, Ca-ionophore A23187 복합처리군에서 각각 10.33, 37.92, 48.09 및 57.17%로 각 군별로 유의성있는 차이를 나타내었으며($p < 0.05$), 특히 caffeine, Ca-ionophore A23187 복합처리군에서 높은 침체반응률을 보였다.

참 고 문 헌

1. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 1951;168: 697~698.
2. Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 1974;89:161~174.
3. Morton B, Harrigan-Lum J, Albagli L. The

- activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 56:372~379.
4. Morton BE, Fraser CF, Sagadraca R. Initiation of hamster sperm motility from quiescence; Effect of conditions upon flagellation and respiration. *Fertil Steril* 1979;32:222~227.
 5. Davis BK. Effect of calcium on motility and fertilization by rat spermatozoa *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978;157:54~56.
 6. Bredderman PJ, Foote RH. The effect of calcium ions on cell volume and motility of bovine spermatozoa. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;137: 1440~1443.
 7. McGrady AV, Nelson L, Ireland M. Ionic effects on the motility of bull and chimpanzee spermatozoa. *J Reprod Fert* 1974;40:71~66.
 8. Babcock DF, First NL, Lardy HA. Action of ionophore A23187 at the cellular level: Separation of effects at the plasma and mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 1976;251:3881~3886.
 9. Mahi CA, Yanagimachi R. The effects of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J Reprod Fert* 1973; 35:55~66.
 10. Toyota Y, Chang MC. Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs *in vitro*. *J Reprod Fert* 1973;36:125~134.
 11. Fraser LR. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility *in vitro*. *J Reprod Fert* 1983;69:539~553.
 12. Johnson MH. The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J Reprod Fert* 1975;44:167~ 184.
 13. Miyamoto H, Chang MC. The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J Reprod Fert* 1973;32: 193~205.
 14. Niwa K, Iritani A. Effect of various hexoses on sperm capacitation and penetration of rat eggs *in vitro*. *J Reprod Fert* 1978;53:267~271.
 15. Hoppe PC, Whitten WK. An albumin requirement for fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J Reprod Fert* 1974;39:433~436.
 16. Kopf GS, Tubb DJ, Garbers DL. Activation of sperm respiration by a low molecular weight egg factor and by 8-bromoguanosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem* 1979;254:8554~8560.
 17. Casillas ER, Hoskins DD. Activation of monkey spermatozoa adenyl cyclase by thyroxine and triiodothyronine. *Biochem Biophys Res Commun* 1970;50:697~703.
 18. Morton B, Albagli L. Modification of hamster sperm adenyl cyclase by capacitation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1973;50:697-703.
 19. Fraser LR. Accelerated mouse sperm penetration *in vitro* in the presence of caffeine. *J Reprod Fert* 1979;57:379~384.
 20. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology* 1985;24:537~549.
 21. Niwa K, Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 1988;30:733~741.
 22. Park CK, Ohgoda O, Niwa K. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J Reprod Fert* 1989;86:577~582.
 23. Byrd W. *In vitro* capacitation and chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J Exp Zool* 1981;215:35~46.
 24. Takahashi Y, Hanada A. Penetration of zona-free hamster eggs *in vitro* by ejaculated bull spermatozoa after treatment with ionophore A23187. *Japan J Anim Reprod* 1984;30:30~37.
 25. Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, et al. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 1988;30:973~985.
 26. Siegel M, Graves CN. Protein effects on bovine sperm acrosomal morphology and penetration and binding to bovine oocytes. *J Anim Sci*

- 1981;53(Suppl. 1):591.
27. Fulka J Jr, Pavlok A, Fulka J. *In vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture. *J Reprod Fert* 1982;64:495~499.
 28. Sirard MA, Lambert RD, Menard DP. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J Reprod Fert* 1985;75:551~556.
 29. Iritani A, Kasai M, Niwa K. Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J Reprod Fert* 1984;70:487~492.
 30. Lenz RW, Ball GD, Lohse JK. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 1983;28:683~690.
 31. Sugawara S, Hamano K, Kameyama K. *In vitro* fertilization in bovine oocytes precultured in various medium: Fertilizability of frozen spermatozoa preincubated in media contained with BFF. *Japan J Anim Reprod* 1985;31:62~67 (in Japanese).
 32. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591~600.
 33. Swanson EW, Bearden HJ. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J Anim Sci* 1951;10:981~987.
 34. Bryan HD, Akruk SR. A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Stain Technol* 1971;52:47~51.
 35. Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L Jr, Biggers JD, Ed. *Fertilization and embryonic development in vitro*. New York: Plenum Press, 1981;81~182.
 36. Babcock DF, Singh JP, Lardy HA. Alteration of membrane permeability to calcium ions during maturation of bovine spermatozoa. *Developmental Biol* 1979;69:85~93.