

Progesterone, Estradiol 17 beta 및 Cholesterol이 Sucrose 층으로부터 정자의 Swim-up 분리에 미치는 영향

김경화 · 여영근 · 박영식
경북대학교 농과대학

Effect of Progesterone, Estradiol 17 beta and Cholesterol on Sperm Swim-up Separation through Sucrose Layer

K. H. Kim, Y. K. Yeo and Y. S. Park

College of Agriculture, Kyungpook National University

SUMMARY

This study was carried out to elucidate the effect of progesterone, estradiol 17 beta and cholesterol in follicular fluid on sperm chemotaxis for fertilization. By inducing swim-up migration through sucrose layer into bMSS containing progesterone, estradiol 17 beta and/or cholesterol, their effects on sperm migration and sperm movement were examined. And the results obtained were as follows:

1. Progesterone inhibited sperm migration and movement, but significantly attracted capacitated-sperm at the level of 50 μ g/ml.
2. Estradiol 17 beta inhibited sperm migration and movement, but didn't significantly inhibit migration of capacitated-sperm at the level of 10 μ g/ml.
3. Cholesterol significantly stimulated sperm migration and movement at the level of 50 μ g/ml, but didn't attract capacitated-sperm.
4. Progesterone and estradiol 17 beta reduced the effect of cholesterol stimulating sperm migration and movement. But estradiol 17 beta and cholesterol didn't reduce the effect of progesterone attracting capacitated-sperm.

In conclusion, progesterone of 50 μ g/ml in bMSS attracted the capacitated-sperm, cholesterol of 50 μ g/ml stimulated sperm migration and movement, but estradiol 17 beta of 10 μ g/ml didn't affect sperm swim-up separation.

(Key words: progesterone, estradiol 17 beta, cholesterol, sperm selection, swim-up migration, movement, capacitation, sucrose layer)

서 론

난포액내 steroids의 농도는 발정주기에 따라 변하는데, progesterone (P_4)과 estradiol 17 beta (E_2) 함유량은 황체기에 각각 $0.228 \mu\text{M}$ 과 $0.478 \mu\text{M}$ 이지만, 배란 전에는 각각 $0.387 \mu\text{M}$ 과 $6.05 \mu\text{M}$ 로 함유량이 증가된다 (Dieleman 등, 1987). 이와 같이 배란전 난포액내 steroids는 증가는 체내 수정과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

P_4 는 정자의 이동, 활력, 수정능획득 및 침모반응에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Lee와 Blandau (1979)는 생리적 수준보다 높은 수준의 P_4 가 첨가된 배양액에서 정자의 유영속도가 떨어졌다고 하였으며, Mbizvo 등 (1990)도 P_4 가 첨가된 배양액에서 운동정자의 비율이 감소하였다고 보고하였다. 그러나 Sliwa (1995b)는 오히려 정자의 이동을 자극한다고 보고한 바 있다. 한편 Andersen과 Jorgensen(1995)은 P_4 가 정자의 활력을 촉진한다고 하였으나, Ridley와 Blasco (1981a) 및 Libersky와 Boatman (1995)은 정자의 활력에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 한편 정자의 수정능획득과 그 지표인 과민 운동성에 대한 연구에서 Oehninger 등(1994)은 P_4 가 정자의 과민 운동성을 증가시켰다고 하였으며, Barboni 등 (1995)도 정자의 수정능획득반응을 유발하여 수정율에 영향을 미치는 것으로 보고하였으나, Kay 등 (1994)은 P_4 가 정자의 과민운동성을 자극하지 않았다고 하였다. 정자의 침모반응에 관한 연구에서 Thomas와 Meizel (1989)과 Juneja 등(1993)은 P_4 가 정자내 칼슘의 유입을 자극한다고 하였으며, Osman 등(1989)도 침모반응을 유발한다고 보고하였으나 Oehninger 등(1994)은 P_4 가 첨가된 배양액에서 1~3시간 배양하였으나, 정자의 침모반응이 유발되지 않았다고 하였으며, Barboni 등 (1995)도 P_4 가 자발적으로 정자의 침모반응을 유발하지 않는 것으로 보고하였다. 이상에서와 같이 정자의 이동과 활력 및 수정능획득과 침모반응에 대한 P_4 의 영향은 연구자에 따라 다양하게 나타나고 있다.

발성기 난포액에 다량 함유되어 있는 E_2 가 정자의 운동성에 미치는 영향도 연구자에 따라 상

반된 결과가 보고되고 있다. Cheng과 Boettcher (1979)는 E_2 가 정자의 전진운동을 자극한다고 하였으며, Mbizvo등 (1990)도 E_2 가 첨가된 배양액에서 정자는 빠른 전진 운동과 직선 운동 및 생존성을 나타내었다고 하였다. 그러나 Sliwa(1995a)는 E_2 와 E_3 가 정자의 이동에 영향을 미치지 않으며, Ridley와 Blasco(1981)도 E_2 가 정자의 활력에 영향을 미치지 않았다고 하였다. 한편 Allag와 Rangari (1997)는 antiestrogen과 같이 첨가된 E_2 가 양비례적으로 정자의 활력과 이동을 오히려 감소시켰다고 보고한 바 있다.

포유동물의 세포막에 함유되어 있는 cholesterol은 막을 안정하게 유지하는데 중요한 영향을 미친다.(Yeagle, 1985), 정자의 원형질막에도 cholesterol이 풍부하게 함유되어 있으며 (Friend와 Bearer, 1981), 배란시기에 활성이 강해진 steril sulfatase에 의해 cholesterol이 유리되고, 유리된 cholesterol은 albumin과 lipoprotein과 같은 cholesterol acceptor에 의해 정자막으로부터 제거된다고 보고된 바 있다(Fournier-Delpech와 Thibault, 1993). 정자막으로부터 cholesterol의 제거는 정자의 수정능획득반응의 유발과 운동정자의 감소 (Ehrenwald 등, 1988) 및 침모반응의 유발 (Langlais와 Roberts, 1985)과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

이상에서 언급한 바와 같이 P_4 와 E_2 및 cholesterol이 정자의 운동성과 수정능획득 및 침모반응에 미치는 영향에 관한 연구에서 연구자간 상반된 결과가 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 배란시 난포액내 높은 농도로 함유되어 있는 P_4 와 E_2 및 정자막의 안정화와 관련이 있는 cholesterol이 sucrose 층으로부터 swim-up 분리에 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 정자선별용 기초용액의 준비

정액의 회석과 정자의 세척 및 배양을 위하여 108mM NaCl, 4.5mM KCl, 1.0mM KH_2PO_4 , 4.15mM NaHCO_3 , 20.85mM HEPES, 3.0mM CaCl_2 , 0.9mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 23.28mM Na-

lactate, 0.3mM Na-pyruvate, 5.0mM glucose를 첨가하고 pH 7이 되도록 조정된 정자선별용 기초 용액(basic medium for sperm selection, bMSS)을 준비하였다.

2. 실험계획

1) 실험 1: P₄의 효과와 적정 농도

P₄가 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up분리에 미치는 영향을 조사하고 또한 정자의 선별을 위한 적정 P₄농도를 결정하기 위하여 P₄가 각각 0, 10, 50 및 100 µg/ml 첨가된 bMSS(P₄-MSS)을 준비하였다. 준비된 각 용액 980 µl를 원심분리관에 주입하고 미리 36°C에서 10분간 온도를 평형시켰다. 한편 동결보존된 소정액을 공기중에 7초간 방치한 다음 36°C 항온수조에서 20초간 융해하였다. 융해한 정액을 원심분리관에 옮기고 bMSS로 5배 희석하였다. 희석한 정액을 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 10mM sucrose가 함유된 bMSS (su-MSS) 60 µl를 첨가하여 정자펠렛을 재부유하였다. 재부유한 정액 20 µl를 미리 온도를 평형시킨 P₄-MSS 980 µl 아래에 주입한 다음 36°C에서 10분간 배양하였다. 배양후 상등액 500 µl를 회수하여 정액성상 검사판을 이용 정자의 수와 운동정자의 비율을 측정하였다. 또한 회수한 정자 중에서 수정능 획득 정자의 비율을 구하기 위하여 배양 후 회수한 상층액에 수정능 획득 정자에서 첨모반응을 유발하는 phorbol 12-myristate 13-acetate 5 µM를 첨가하고 36°C에서 30분간 배양한 다음 첨모반응율을 측정하였다.

2) 실험 2: E₂의 효과와 적정 농도

E₂가 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up분리에 미치는 영향을 조사하고 또한 정자의 선별을 위한 적정 농도를 결정하기 위하여 E₂가 각각 0, 10, 50 및 100 µg/ml 첨가된 bMSS (E₂-MSS)를 준비한 다음 36°C에서 10분간 온도를 평형시켰으며, 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수된 정자의 수와 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율과 수정능 획득 정자

의 비율을 조사하였다.

3) 실험 3: Cholesterol의 효과와 적정 농도

Cholesterol이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하고 정자의 선별을 위한 적정 농도를 결정하기 위하여 cholesterol이 각각 0, 0.5, 10, 50 및 100 µg/ml 첨가된 bMSS (h²-MSS)를 준비한 다음 36°C에서 10분간 온도를 평형시켰으며, 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수된 정자의 수와 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율과 수정능 획득 정자의 비율을 조사하였다.

4) 실험 4: P₄, E₂ 및 cholesterol의 병용 효과

P₄, E₂ 및 cholesterol의 병용처리가 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 P₄, E₂와 /또는 cholesterol가 각각 50 µg/ml, 10 µg/ml 및 50 µl/ml 첨가된 bMSS(P₄E₂-MSS, P₄Ch-MSS, E₂Ch-MSS, P₄E₂Ch-MSS)을 준비한 다음 36°C 10분간 온도를 평형시켰으며, 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 준비하고 배양하였다. 배양후 회수된 정자의 수와 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율과 수정능 획득 정자의 비율을 조사하였다.

3. 통계처리

반복처리에 의해 얻어진 결과는 분산분석 (ANOVA)에 의해 통계처리하여 mean±SE (standard error)로 표시하였으며, Duncan 다중검정에 의해 처리간 차이의 유의성을 검정하였다. 이러한 유의성 검정의 결과는 p<0.05 또는 p<0.01로 표기하였는데, 이는 처리간에 5% 또는 1% 수준에서 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

결과 및 고찰

1. P₄의 효과와 적정 농도

P₄가 정자의 이동과 운동성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 sucrose 층으로부터 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수와 회수된 정자

Table 1. Effect of progesterone(P₄) levels in bMSS on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

Conc of P ₄ (μ g/ml)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
0(Control)	19.3 \pm 2.4 ^c	68.3 \pm 4.1 ^c	50.0 \pm 6.3 ^b
10	7.7 \pm 1.6 ^d	46.0 \pm 5.6 ^d	72.3 \pm 6.6 ^{ba}
50	3.2 \pm 1.2 ^d	34.8 \pm 2.9 ^{de}	88.6 \pm 3.6 ^a
100	3.0 \pm 1.0 ^d	23.3 \pm 3.3 ^e	82.8 \pm 2.4 ^a

* Superscripts ^a and ^b mean that treatments in the same column are significantly different at p<0.01.

** Superscripts ^{cd} and ^e mean that treatment in the same column are significantly different at p<0.05.

중 운동정자의 비율과 수정능획득정자의 비율을 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 1과 같다

P₄가 각각 0, 10, 50 및 100 μ l/ml 첨가된 bMSS로 정자의 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 각각 19.3 \pm 2.4, 7.7 \pm 1.6, 3.2 \pm 1.2 및 3.0 \pm 1.0 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 68.3 \pm 4.1, 46.0 \pm 5.6, 34.8 \pm 2.9 및 23.3 \pm 3.3% 였고. 첨모반응율은 각각 50.0 \pm 6.3, 72.3 \pm 6.6, 88.6 \pm 3.6 및 82.8 \pm 2.4%였다.

회수된 정자의 수는 P₄ 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 낮았으며, P₄의 첨가농도가 증가할수록 감소하는 경향이 있었다. 박 (1996)은 sucrose 층을 이용하지 않는 정자의 swim-up 분리에서도 P₄가 정자의 이동을 억제하였다고 하였으며, Lee와 Blandau(1979)도 생리적 수준보다 높은 수준의 P₄가 정자의 유영속도를 감소시킨다고 보고한 바 있다. 따라서 progesterone은 정자의 swim-up 이동을 억제하는 것으로 사료된다.

회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 P₄ 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 감소하였으며, P₄의 첨가농도가 증가할수록 운동정자의 비율이 유의하게 감소하였다. Mbizvo등 (1990)도 P₄가 첨가된 배양액에서 정자가 과민 운동성을 보였으나 운동정자 비율은 감소하였다고 하였다. 한편 Ridley와 Blasco (1981)와 Libersky와 Boatman (1995)은 P₄가 정자의 활력에 영향을 미치지 않는다고 하였으며, 오히려 Andersen과 Jorgensen (1995)는 P₄가 생리적 수준인 2 μ l/ml 첨가된 배양액에 25분간 배양하였을 때 정자의 활력이 증가되었다고 하였다. 이러한 차이는 실험조건에 차이가 있어 유래된 것으로 사료되며, 본 실험에서

sucrose을 통과하여 이동하는 정자의 운동성을 유지하거나 자극하는 물질이 결여되어 있는 정자 선별용 용액에서 P₄는 회수된 정자의 운동성을 감소시킨다는 결과를 얻었다.

첨모반응율로 표시된 회수된 정자 중에서 수정능획득정자의 비율은 50 μ g/ml과 100 μ l/ml P₄ 첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았으며, P₄ 첨가구간에 유의한 차이가 없었다. 즉, 50 μ g/ml 이상 P₄가 첨가된 배양액에서 회수된 정자중 수정능획득정자의 비율이 높았다. 수정능획득정자의 이동에 관한 연구에서 Sliwa(1995a)는 P₄가 없는 배양액에 비해서 P₄가 1~100 μ g/ml 함유된 배양액으로 정자의 이동이 많았다고 하였으며, Vadillo Ortega 등(1994)과 Villanueva 등(1995)도 난포액에서 분리한 지질 중에서 P₄가 생리적 수준 내에서 양비례적으로 정자 유인능을 보였다고 하였다. 한편 P₄는 수정능획득정자의 이동을 자극할 뿐만 아니라 정자의 수정능획득을 유발할 수도 있다(Barboni 등, 1995; Kay 등, 1994). P₄는 수정능력을 획득한 정자를 유인하거나 수정능획득반응을 유발하는 것으로 사료된다.

결론적으로 P₄는 정자의 이동과 운동성을 감소시키지만 수정능획득 정자를 이동을 자극하였으며, 본 실험조건에서 50 μ g/ml 수준의 P₄는 수정능력을 획득한 정자의 선별에 적절한 것으로 사료된다.

2. E₂의 효과와 적정 농도

E₂가 정자의 이동과 운동성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 sucrose 층으로부터 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수와 회수된 정

Table 2. Effect of estradiol 17- β (E₂) levels in bMSS on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

Conc of E ₂ (μ g/ml)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
0(Control)	4.2 \pm 1.1 ^c	29.2 \pm 15.8	75.6 \pm 0.5 ^c
10	4.1 \pm 0.9 ^c	22.5 \pm 5.6	78.3 \pm 0.9 ^c
50	1.9 \pm 0.3 ^{cd}	3.0 \pm 3.0	75.8 \pm 1.1 ^c
100	0.8 \pm 0.3 ^d	0.0 \pm 0.0	58.7 \pm 4.6 ^d

* Superscripts ^{cd} and ^e mean that treatment in the same column are significantly different at p<0.05.

자중 운동정자의 비율과 수정능획득정자의 비율을 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 2와 같다.

E₂가 각각 0, 10, 50 및 100 μ g/ml 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 각각 4.2 \pm 1.1, 4.1 \pm 0.9, 1.9 \pm 0.3 및 0.8 \pm 0.3 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 29.2 \pm 15.8, 22.5 \pm 5.6, 3.0 \pm 3.0 및 0.0 \pm 0.0%였고, 첨모반응율은 각각 75.6 \pm 0.5, 78.3 \pm 0.9, 75.8 \pm 1.1 및 58.7 \pm 4.6%였다.

회수된 정자의 수는 10 μ g/ml E₂ 첨가구가 대조구와 유의한 차이가 없었으며, 50 μ g/ml E₂ 첨가구에 비하여 높았으나 유의한 차이는 없었고, 100 μ g/ml E₂ 첨가구에 비해서는 유의하게 높았다. 즉, E₂의 첨가수준이 증가할수록 회수되는 정자의 수가 감소하는 경향이 있었다. Allag와 Rangari (1997)도 E₂가 양비례적으로 정자의 이동을 저하시킨다고 보고한 바 있다.

회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 E₂ 첨가구가 대조구에 비하여 낮았으나 유의한 차이는 없었다. 즉, 50 μ g/ml과 100 μ g/ml 수준의 E₂는 정자의 운동성을 감소시키는 경향이 있었다. Cheng과 Boettcher (1979)는 변형된 Tyrode 용액에 0.1 μ g/ml와 0.32 μ g/ml 수준으로 첨가된 E₂가 정자의 전진운동성을 증가시킨다고 하였으며, Mbizve 등(1990)도 E₂가 첨가된 배양에서 정자는 빠른 전진 운동과 직진 운동성 및 생존성을 나타내었다고 하였다. 그러나 Ridley와 Blasco (1981)는 E₂가 정자의 활력에 영향을 미치지 않는다고 하였으며, Allag와 Rangari (1997)은 항estrogen 제제인 tamoxifen 또는 centchroman과 함께 첨가된 E₂가 양비례적으로 정자의 활력을 저하시켰다

고 보고하였다. 이와 같이 연구간에 상반된 결과는 실험조건의 차이에 기인한 것으로 사료되며, 따라서 본 실험조건에서는 10 μ g/ml 이상 높은 수준의 estradiol은 정자의 활력을 감소시키는 것으로 사료된다.

첨모반응율로 표시된 수정능획득정자의 비율은 10 μ g/ml 및 50 μ g/ml E₂ 첨가구가 대조구에 비하여 유의한 차이가 없었으나 100 μ g/ml E₂ 첨가구보다 유의하게 높았다 특히, 100 μ g/ml수준의 E₂는 수정능획득정자의 이동을 억제하였다. Sliwa (1995a)은 E₂와 E₃가 정자의 이동에 영향을 미치지 않는 것으로 보고한 바 있다. 그러나 본 실험 조건에서는 100 μ g/ml 이상 높은 수준의 E₂가 오히려 수정능획득정자의 이동을 억제하는 결과를 얻었다.

결론적으로 E₂의 첨가수준이 10 μ g/ml에서 100 μ g/ml으로 증가할수록 회수된 정자의 수, 회수된 정자중 운동정자의 비율 및 수정능획득정자의 비율이 감소하였다. 따라서 10 μ g/ml 이하의 E₂는 정자의 선별에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다

3. Cholesterol의 효과와 적정 농도

난포액에는 유리 cholesterol과 총 cholesterol이 각각 39.9 \pm 8.2 및 61.5 \pm 11.6 mg% 함유되어 있다 (Menezo 등, 1984). 이러한 cholesterol이 정자의 이동과 운동성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 sucrose 층으로부터 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수와 회수된 정자중 운동정자의 비율과 수정능획득정자의 비율을 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Effect of cholesterol levels in bMSS on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated-sperm recovered from the migration

Conc of Cholesterol ($\mu\text{g/ml}$)	No. of sperm recovered ($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm (%)	Percentage of sperm acrosome-reacted (%)
0(Control)	3.2 ± 0.7	3.7 ± 3.7	82.9 ± 7.0
0.5	6.0 ± 1.5	20.6 ± 12.9	90.0 ± 0.0
10	11.3 ± 2.6	23.3 ± 14.5	83.2 ± 6.6
50	34.1 ± 14.2	21.1 ± 12.5	81.7 ± 4.4
100	14.0 ± 4.5	6.4 ± 6.4	81.1 ± 5.9

Cholesterol이 각각 0, 0.5, 10, 50 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 첨가된 bMSS로 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 3.2 ± 0.7 , 6.0 ± 1.5 , 11.3 ± 2.6 , 34.1 ± 14.2 및 $14.0 \pm 4.5 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 3.7 ± 3.7 , 20.6 ± 12.9 , 23.3 ± 14.5 , 21.1 ± 12.5 및 $6.4 \pm 6.4\%$ 였고, 침모반응율은 82.9 ± 7.0 , 90.0 ± 0.0 , 83.2 ± 6.6 , 81.7 ± 4.4 및 $81.1 \pm 5.9\%$ 였다,

회수된 정자의 수는 cholesterol 첨가구가 대조구에 비하여 높았으나 유의한 차이가 없었다. 특히 $50 \mu\text{g/ml}$ cholesterol 첨가구에서 가장 높았으나, 표준오차가 크게 나타나서 첨가구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 $50 \mu\text{g/ml}$ 수준까지 cholesterol의 첨가수준을 증가시킬 때 정자의 이동이 증진되는 경향이 있었다. 정자막으로부터 cholesterol을 제거하면 운동정자의 비율이 감소한다는 Ehrenwald 등 (1988)의 연구 결과를 고려할 때 $50 \mu\text{g/ml}$ 수준 이하의 cholesterol은 정자막의 안정화를 유발하여 정자의 운동성을 유지하며 이로서 정자의 이동을 자극하는 것으로 사료된다.

회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 cholesterol 첨가구가 대조구에 비하여 높았으나, 이들간에 유의한 차이가 없었다. 특히 0.5, 10 및 $50 \mu\text{g/ml}$ cholesterol의 첨가구가 $100 \mu\text{g/ml}$ cholesterol 첨가구에 비하여 높았으나 유의한 차이가 나타나지 않았다. 정자막으로부터 cholesterol을 제거하면 운동정자의 비율이 감소하는데 (Ehrenwald 등, 1988), 본 실험조건에서 $50 \mu\text{g/ml}$ 수준 이하의 cholesterol은 정자막을 안정하게 유지함으로써 운동정자의 감소를 완화시키는 것으로 추론된다.

침모반응율로 표시된 수정능획득 정자의 비율

은 cholesterol 첨가구와 대조구간에 유의한 차이가 없었으며, 일정한 경향도 나타나지 않았다. 포유동물 세포막의 주요 sterol은 cholesterol로서 막의 안정화에 중요한 영향을 미친다(Yeagle, 1985). 정자의 원형질막에도 cholesterol이 풍부하며 (Friend와 Bearer, 1981), cholesterol의 제거는 정자막의 침투성을 변하게 하며 이로 인하여 세포내 칼슘농도가 증가하여 침모반응이 일어나는 것으로 보고된 바 있다 (Langlais와 Roberts, 1985). 따라서 본 실험조건에서 정자선별용 용액에 첨가된 cholesterol은 수정능획득정자의 이동에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

결론적으로 cholesterol은 정자의 이동과 운동성을 증진시키지만 수정능획득정자의 이동에 영향을 미치지 않았다. 특히 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 cholesterol은 정자의 이동과 운동을 자극하는데 적절한 것으로 사료된다.

4. Progesterone, estradiol 17 beta 및 cholesterol의 병용 효과

P_4 , E_2 와/또는 cholesterol의 병용처리가 정자의 이동과 운동성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 sucrose 층으로부터 swim-up 분리를 유도하여 회수한 정자의 수와 회수된 정자준 운동정자의 비율과 수정능획득 정자의 비율을 조사하였던 바 얻어진 결과는 Table 4와 같다.

P_4 와 E_2 병용처리의 효과를 조사한 세부실험 1에서 bMSS와 $50 \mu\text{g/ml}$ P_4 와 $10 \mu\text{g/ml}$ E_2 가 함께 첨가된 bMSS(P_4E_2 -MSS)로 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 1.6 ± 0.3 과 $0.4 \pm 0.4 \times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 22.8 ± 8.4 와 $18.9 \pm 9.9\%$ 였고 침모반응율은 78.7 ± 0.9 와

Table 4. Effect of combined treatments of progesterone(P₄), estradiol(E₂) and/or cholesterol(Ch) on sperm swim-up migration through sucrose layer and movement of sperm and attraction of capacitated sperm recovered from the migration

Trial	Medium	No. of sperm recovered($\times 10^4$)	Percentage of motile sperm(%)	Percentage of sperm acrosome-reacted(%)
I	bMSS	1.6 \pm 0.3 ^c	22.8 \pm 8.4	78.7 \pm 0.9
	P ₄ E ₂ -MSS	0.4 \pm 0.4 ^d	18.9 \pm 9.9	87.2 \pm 3.4
II	bMSS	4.8 \pm 0.9	44.2 \pm 15.3	58.7 \pm 0.6 ^d
	P ₄ Ch-MSS	7.1 \pm 0.1	3.2 \pm 3.2	91.6 \pm 2.2 ^c
III	bMSS	2.3 \pm 0.4 ^d	41.1 \pm 4.5 ^a	66.1 \pm 2.3
	E ₂ Ch-MSS	12.7 \pm 1.4 ^c	7.4 \pm 4.0 ^b	67.5 \pm 2.7
IV	bMSS	7.3 \pm 0.9	28.4 \pm 12.6	57.3 \pm 6.0
	P ₄ E ₂ Ch-MSS	5.9 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0	65.6 \pm 3.6

*Superscripts ^a and ^b mean that treatments in the same column are significantly different at p<0.01.

**Superscripts ^c and ^d mean that treatment in the same column are significantly different at p<0.05.

87.2 \pm 3.4%였다. 회수된 정자의 수는 병용첨가구가 대조구에 비하여 적었으나 유의한 차이는 없었다. 즉 P₄와 E₂의 병용처리는 정자의 이동에 영향을 미치지 않았다. 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 병용첨가구와 대조구간에 유의한 차이는 없었다. 역시 이들의 병용처리는 정자의 운동성에 영향을 미치지 않았다. 첨모반응율로 표시된 수정능획득정자의 비율은 병용첨가구가 대조구에 비하여 높았으나 유의한 차이는 없었다. 이 실험의 결과와 실험 1과 실험 2의 결과를 고려할 때, E₂는 수정능획득정자의 이동을 자극하는 P₄의 효과를 억제하는 것으로 추론된다.

P₄와 cholesterol 병용처리의 효과를 조사한 세 부실험 2에서 bMSS와 50 μ g/ml P₄와 50 μ g/ml cholesterol이 함께 첨가된 bMSS(P₄Ch-MSS)로 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 각각 4.8 \pm 0.9와 7.1 \pm 0.1 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 각각 44.2 \pm 15.3과 3.2 \pm 3.2%였고, 첨모반응율은 각각 58.7 \pm 0.6과 91.6 \pm 2.2%였다. 회수된 정자의 수는 병용첨가구가 대조구에 비하여 많았으나 유의한 차이가 없었다. 실험 1과 실험 3의 결과를 고려할 때, cholesterol의 정자의 이동을 억제하는 P₄의 효과를 완화시키는 것으로 추론된다. 한편, 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 병용첨가구가 대조구에 비하여 낮았으나 처리구에서 표준오차가 커서 이들간에 유의한 차

이는 없었다. 실험 1과 실험 3의 결과를 고려할 때, P₄는 정자의 운동을 자극하는 cholesterol의 효과를 감소시키는 것으로 추론된다. 첨모반응율로 표시된 수정능획득정자의 비율은 병용첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았다. 실험 1과 실험 3의 결과를 고려할 때, cholesterol은 수정능획득 정자를 유인하는 progesterone의 효과를 억제하지 않는 것으로 추론된다.

E₂와 cholesterol 병용처리의 효과를 조사한 세 부실험 3에서 bMSS와 10 μ g/ml estradiol과 50 μ g/ml cholesterol이 함께 첨가된 bMSS(E₂-MSS)로 swim-up 분리를 유도하였던 바, 회수된 정자의 수는 2.3 \pm 0.4와 12.7 \pm 1.4 $\times 10^4$ 였으며, 운동정자의 비율은 41.1 \pm 4.5와 7.4 \pm 4.0%였고, 첨모반응율은 66.1 \pm 2.3과 67.5 \pm 2.7%였다. 회수정자의 비율은 병용첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 높았다. 실험 2와 실험3의 결과를 고려할 때, E₂는 정자의 이동을 자극하는 cholesterol의 효과를 억제하지 않는 것으로 추론된다. 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 병용첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 감소하였다. 실험 2와 실험 3의 결과를 고려할 때, E₂는 정자의 운동을 자극하는 cholesterol의 효과를 억제하는 것으로 추론된다. 첨모반응율로 표시한 수정능획득 정자의 비율은 병용 첨가구가 대조구에 비하여 유의한 차이가 없었으며, 일정한 경향도 나타나지 않았다. 실험

2와 실험 3의 결과를 고려할 때, E₂와 cholesterol은 수정능획득정자의 이동에 관여하지 않는 것으로 추론된다.

P₄, E₂ 및 cholesterol 병용처리의 효과를 조사한 세부실험 4에서 bMSS와 50 μg/ml P₄, 10 μg/ml E₂ 및 50 μg/ml cholesterol이 모두 함유된 bMSS(P₄E₂Ch-MSS)로 swim-up 분리를 유도하였던 바 회수된 정자의 수는 7.3±0.9와 5.9±0.9×10⁴였으며, 운동정자의 비율은 28.4±12.6과 0.0±0.06%였고, 첩모반응율은 57.3±6.0과 65.6±3.6%였다. 회수된 정자의 수는 병용첨가구가 대조구에 비하여 유의하게 감소하였으며, 실험 1, 2 및 3의 결과를 고려할 때 P₄가 정자의 이동을 자극하는 cholesterol의 효과를 억제한 것으로 추론된다. 회수된 정자 중에서 운동정자의 비율은 병용첨가구 대조구에 비하여 감소되는 경향이 있었는데 실험 1, 2 및 3의 결과를 고려할 때 P₄가 정자의 운동을 자극하는 cholesterol의 효과를 감소시킨 것으로 추론된다. 첩모반응율로 표시된 수정능획득 정자의 비율은 병용첨가구와 대조구간에 유의한 차이가 없었다. 실험 1, 2 및 3의 결과를 고려할 때, E₂와 cholesterol은 수정능획득정자의 이동을 자극하는 P₄의 효과를 감소시키지 않았다.

결론적으로 P₄, E₂ 및 cholesterol의 병용처리에서 cholesterol은 정자의 이동과 운동을 자극하였으며 P₄와 E₂는 이러한 cholesterol의 효과를 감소시켰다. 또한, P₄는 수정능획득정자의 이동을 자극하였으며 E₂와 cholesterol은 이러한 P₄의 효과를 억제하지 않았다

적 요

난포액에 함유되어 있는 steroids와 sterol이 수정에 참여하는 정자의 주화성에 미치는 영향을 밝히기 위하여, progesterone, estradiol 17 beta 및 cholesterol이 sucrose 층으로부터 정자의 swim-up 분리에 미치는 영향을 조사하였던 바 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. Progesterone은 정자의 이동과 운동성을 억제하였으나 수정능획득한 정자를 유인하였으며, 특히 50 μg/ml 수준의 수준의 proge-

sterone은 수정능력을 획득한 정자의 이동을 유의하게 자극하였다.

2. Estradiol 17 beta의 첨가수준이 증가할수록 정자의 이동과 운동성이 억제되었으나, 10 μg/ml 수준의 estradiol은 정자의 이동과 운동성 및 수정능획득정자의 이동에 영향을 미치지 않았다.
3. Cholesterol은 정자의 이동과 운동성을 자극하였으나, 수정능획득정자의 이동에 영향을 미치지 않았으며, 특히 50 μg/ml 수준의 cholesterol은 정자의 이동과 운동성을 유의하게 자극하였다.
4. Progesterone, estradiol 및 cholesterol의 병용처리에서, cholesterol은 정자의 이동과 운동을 유의하게 자극하였으나, progesterone과 estradiol은 이러한 cholesterol의 효과를 감소시켰다.

Progesterone은 수정능획득 정자의 이동을 자극하였으나 estradiol이나 cholesterol은 progesterone의 이러한 효과를 억제하지 않았다.

결론적으로 progesterone은 50 μg/ml 첨가수준에서 수정능력을 획득한 정자의 swim-up이동을 유의하게 자극하였으며, cholesterol은 50 μg/ml 첨가수준에서 정자의 이동을 자극하였으나, estradiol은 10 μg/ml 첨가수준에서 정자의 이동과 운동성에 영향을 미치지 않았다.

참고문헌

- Allag IS and Rangari K. 1997. *In-vitro* effect of estrogen-antagonist on motility and penetration ability of human spermatozoa. Indian J. Expl. Biol., 35:822-824.
- Andersen CY and Jorgensen N, 1995. Improvement of sperm motility by the addition of progesterone to the percoll medium during sperm purification. Hum. Reprod., 10:3183-3185.
- Barboni B, Mattioli M and Seren E. 1995. Influence of progesterone on boar sperm capacitation. J. Endocrinol., 144:13-18.

- Cheng CY and Boettcher B. 1979. The effect of steroids on the *in vitro* migration of washed human spermatozoa in modified tyrode's solution or in fasting human blood serum. *Fertil. Steril.*, 32:566-570.
- Dieleman SJ and Bevers MM. 1987. "Development of preovulatory follicles in the cow from luteolysis until ovulation.", in: Roche JF and O'Callaghan D. Eds., *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*, Martinus Nijhoff Publishers, pp.31-44.
- Ehrenwald E, Parks JE and Foote RH. 1988. Cholesterol efflux from bovine sperm. 1. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res.*, 20:145-147.
- Fournier-Delpech S and Thibault C. 1993. "Acquisition of sperm fertilizing ability.", in: Thibault C, Levasseur MC and Hunter RHF, Eds., *Reproduction in Mammals and Man*, Ellipses, Paris, pp.257-270.
- Friend DS and Bearer EL. 1981. Beat hydroxysterol distribution as determined by freeze-fracture cytochemistry. *J. Histochem.*, 13: 535-546.
- Juneja R, Kadam P, Kadam AL, and Koide SS. 1993. Inhibition of progesterone action by a factor in human follicular fluid. *Horm. Metab. Res.*, 25:298-300.
- Kay VJ, Coutts JR, and Robertson L. 1994. Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum. Reprod.*, 9:2318-2323.
- Langlais J and Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.*, 12:183-224.
- Lee WI and Blandaw RJ. 1979. Laser light-scattering study of the effect of progesterone on sperm motility. *Fertil. Steril.*, 32:320-323.
- Libersky EA and Boatman DE. 1995. Effects of progesterone on *in vitro* sperm capacitation and egg penetration in the golden hamster, *Biol. Reprod.*, 53:483-487.
- Mbizvo MT, Thomas S, Fulgham DL, and Alexander NJ, 1990. Serum hormone levels affect sperm function. *Fertil. Steril.*, 54: 113-120.
- Menezo Y, Testart J. Khatchadourian C, and Frydman R. 1984. Human Preovulatory follicular fluid and lipids. Are they the trigger for capacitation? *Int. J. Fertil.*, 29:61-64.
- Ochninger S, Acosta R, Morshedi M, Philput C, Swanson RJ, and Acosta AA. 1990. Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. *J. Androl.*, 11(5):446-52.
- Osman RA, Andria ML. Jones Ad, and Meizel S. 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160:828-833.
- Ridley AJ and Blasco I. 1981. Testosterone and gossypol effects on human motility. *Fertil. Steril.*, 36:638-642.
- Sliwa LT. 1995a. Effect of some sex steroid hormones on human spermatozoa migration *in vitro*. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 58(2):173-175.
- Sliwa LT. 1995b. Chemotaction of mouse spermatozoa induced by certain hormones. *Arch. Androl.*, 35(2): 105-10.
- Thomas P and Meizel S. 1989. Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem. J.*, 264:539-456.
- Vadillo-Ortega F, Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez QB. Rermejo L, and Bustos-Lopez H. 1994. Chemotactic factor for spermatozoa:

- a new biological function of progesterone. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 62:127-130.
- Villanueva-Diaz C, Arias-Martinez J, Bermejo-Martinez L, and Vadillo-ortega F. 1995. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil. Steril.*, 64(6):1183-1188.
- Yeagle PL 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, 882: 267-287.
- 박영식. 1936. Progesterone과 BSA를 이용한 동결정액내 정자의 선별. *한국수정란이식학회지*, 11:309-316.
-
- (접수일자 : 1998. 11.30/채택일자 : 1998. 12. 23)