

## 개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화

### I. 저온보존에 따른 효과

정정란 · 유재규 · 양성렬 · 여현진 · 박종식 · 예은하 · 노규진<sup>†</sup> · 최상용  
경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

## Acrosomal Changes and Survivability of Following Preservation of Dog Spermatozoa I. The Effects of Different Chilling Duration

J. R. Cheong, J. G. Yoo, S. R. Yang, H. J. Yeo, J. S. Park, E. H. Yeao,  
G. J. Rho<sup>†</sup> and S. Y. Choe

*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,  
Gyeongsang National University, Chinju, Republic of Korea, 660-701*

### SUMMARY

Artificial insemination (AI) with frozen or cooled semen is widely used in commercial fields of cattle and pig. Little is known about characteristics of canine sperm after freezing or cooling. For both practical and commercial goal, the canine semen treated with cooling and freezing should be carried out to exam the fundamentals, including sperm motility, survivability and fertilizing capacity. The aim of this study, thus, was to identify the effects of extended exposure to 4°C on canine semen by motility, survivability, acrosomal changes following different duration. Fifteen ejaculates collected by digital manipulation twice per week from 3 dogs (Shih-Tzu) were divided to 16 aliquots after adding Tris-egg yolk (TE) buffer formulated by our laboratory, and cooled from 37 to 4°C, by ramp rate of 0.6°C/min. Each sample was evaluated by their motility, survivability and the acrosomal status at 0 h (control), 2 h, 12 h and 1 d~10 d, respectively. The motility of spermatozoa was graded to 6 levels using the modified method of Seager. The survivability of sperm was assessed using an epifluorescence microscope after Fert/Light (Molecular Probes Inc.) staining. To estimate the proportion of the spermatozoa of intact acrosome, 200 spermatozoa were assessed in randomly selected fields, using epifluorescence microscope after FITC/PSA (Sigma) staining. At 2 h after cooling, the motility of most spermatozoa were assessed to be grade 0 and 1. At 12 h, high number of sperm were in grade 0 to 1, however, it was significantly ( $P<0.05$ ) lower than that of 2 h. From 1 d to 4 d, ~50% of sperm was assessed to grade 0 to 1. On day 7, a little sperm were in grade 0 to 1. No sperm showed motility on day 10. Sperm motility was rapidly reduced by the percent of 10% of grade 0 to 1. From 2 h to 6 h, the number of live sperm was 90% and the sperm chilled for 10 days lived >50%. Acrosomal intact of spermatozoa exposed to 4°C for 2 h was 51%, supposed the sperm of control was 100%. Our results suggest that 1) this is easy to transfer and preservation for short periods 2) AI can be used by semen chilled for 6-Day.

(Key words : survivability, acrosome, cooling rate, sperm, dog)

<sup>†</sup>Correspondence : jinrho@mongae.gsnu.ac.kr

## 서 론

현재 우리나라의 가축을 번식하고 개량하는데 있어서 가장 중요한 관건은 우량 유전인자를 확보하는데 있으며, 이러한 유전인자를 확보하여 활용하는 방법은 첨단과학인 생명 공학적인 방법으로 체내 또는 체외수정, 핵 이식 및 세포질 내 정자 주입법 등을 이용한 형질전환 및 복제동물의 생산으로 가능할 수도 있다. 그러나 이러한 방법들은 일반화되지 못하여 현재 가장 일반화되어 있는 방법은 인공수정과 수정란이식이 가축에 이용되고 있다. 개는 수정란의 생산과 수정란이식이 용이하지 않아서 대체로 자연교미 및 인공수정에 의존하고 있다. Spallanzani(1776)가 개에게 인공수정을 실시하여 처음으로 산자를 보고한 이후, 1954년 Rowson에 의해 개 인공수정에 대한 연구가 재 시도되면서, 1960년대에 개의 번식생리에 관한 포괄적인 연구가 많이 진행되어 (Martin, 1963; Foote, 1964; Rathore 등, 1966) 짧은 기간동안 정자보존에 관한 연구와 인공수정 기술이 발달하였다. 인공수정에 이용되는 정액의 종류에는 신선정액 (fresh semen), 저온보존정액 (chilled semen), 동결정액 (frozen semen) 등이 있으며, 정액의 보존방법으로 온도가 낮으면 정자의 대사활동이 가역적으로 감소한다(Spallanzani, 1776)는 것을 기초로 하여 정자의 저온보존에 관한 연구가 이루어지기 시작했다.

개의 정액은, 개의 정액을 동결시키기 전에 적절한 냉각속도(cooling rates)와 저온평형시간이 정자 동결보존에 중요한 요인으로 작용한다. Cooling의 개념은 1951년 Milovanov에 의해 정자가 동결 등의 온도변화가 있을 때 손상이 크다는 것을 발견하여, 처음으로 온도에 의한 정자의 손상을 temperature shock이라고 명하였다. 이러한 온도의 손상으로부터 동결 시 정자를 보호하기 위해서 1976년 Watson은 단계적인 cooling방법을 도입시켰으며, 정자가 저온자극을 받게 되는 일련의 손상을 'cold shock'이라고 하였다. 소, 염소, 돼지 및 영장류인 사람의 정자의 cold shock에 대한 연구에 대해서는 많은 연구가 진행되어 왔으나 개의 정자에 대한 연구는 많이 접하지 못하여 본 실험에서는 개 정자

를 보존하여 인공수정을 실시하기 위하여 실험실에서 자체적으로 개발한 동결보호제를 사용하여 저온보존을 실시하여 정자의 수정능을 확인하고 시간경과에 따른 정자의 성상변화를 비교 관찰하고자 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

실험에 사용된 개는 2~4년 생의 Shih-Tzu 3두(♂)를 공시하였고, 사료는 배합 사료 (JERONY puppy)를 자유급식 시켰으며, 사육방법은 cage에 1두씩 넣어 사육하고 매일 2~3시간 충분한 운동을 실시하였다.

### 2. 정액 채취

정액 채취 전에 생식기 주위를 생리식염수에 향생제를 섞은 멸균거즈로 깨끗이 닦은 후, 음경 마사지법으로서 음경의 발기를 유도하여 구선 부위를 잡고 압박하여 3단계로 분획하여 사정시켰다. 사정된 정액의 온도 변화를 줄이기 위하여 정액채취에 사용된 기구는 37°C에서 미리 warming하였으며, 실험에 사용된 정액은 3단계 사출정액 중 정자가 가장 많은 2단계 (sperm-rich fraction) 채취정액만을 사용하였다

### 3. 정액 검사

채취한 정액은 빛을 차단하기 위해서 호일로 싸서 37°C 항온 수조 안에 보관하고, 보관된 정액을 실험에 사용할 수 있는 지를 확인하기 위하여 정자

Table 1. Classification on motility of canine spermatozoa by its motility

Ranges	Characteristic
5	Very rapid and vigorous forward motion
4	Rapid progressive motion
3	Steady progressive motion
2	Slow progression, including stop and start motion
1	Weak undulation or oscillatory motion
0	No discernable motility

의 농도, 운동성, 생존율, 정자의 침체 반응 등을 검사하였다.

### 1) 정자의 농도 및 운동성

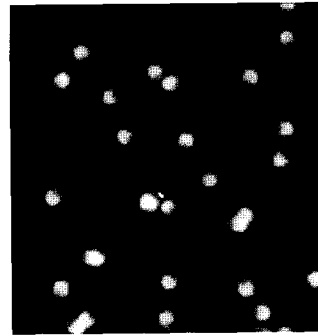
정자 농도측정은 정자수계산판 (Makler counting chamber, Sefi medical Instruments, U.S.A.)을 이용하였으며, 운동성은 Seager 등 (1969)의 방법에 준하여 정자 200마리의 운동성을 확인하여 Table 1 과 같이 6등급으로 나누어 평가하였다.

### 2) 정자의 생사염색

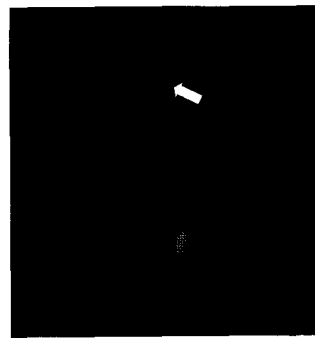
정자의 생사염색은 Fert/Light™ (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) 염색액을 이용하였으며, 10 mg/ml의 propidium iodide (PI, Sigma)로 대조염색을 하였고, Zeiss 형광현미경 (Zeiss, Germany; excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm)하에서 정자의 생사를 확인하였다 (Fig. 1). 정자의 두 부가 초록색으로 염색된 것을 생존 정자로 간주하고, 반면 빨강색 염색된 것을 죽은 정자로 간주하여 전체 200개의 관찰된 정자에 대한 생존정자의 백분율로 표기하였다.

### 3) 정자의 침체 검사

정자의 침체 검사 방법은 Cross 등 (1986)의 방법에 준하여 실시하였으며, 정자의 침체 검사는 FI-



(A)



(B)

Fig. 2. Sperm stained for acrosomal integrity by FITC/PSA under a fluorescent microscope.

A. Intact acrosome( $\times 200$ )

B. Reacted (arrow) and reaching (arrow head) acrosome( $\times 400$ )

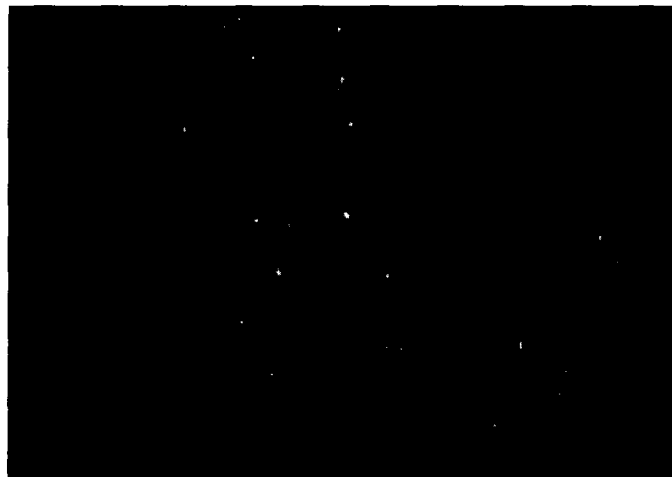


Fig. 1. Sperm of live and dead stained by Fert/Light under a fluorescent microscope. Green, live sperm: Red, dead sperm ( $\times 400$ )

uorescein Conjugated Lectin Pisum Savitum Agglutinin (FITC/PSA, Sigma)을 기본 염색액으로 하고, 10 mg/ml의 PI를 대조염색액으로 하였다. 슬라이드 위에 10 ml의 정액을 도말하여 건조시킨 후 -20 °C methanol에 2분간 고정하였다. 고정된 슬라이드를 건조시킨 후 암실에서 FITC/PSA와 대조염색액을 떨어뜨린 후 Para-film을 덮어둔 채 15 분간 방치하여 염색하였다. Zeiss 형광현미경 (excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm)하에서 침체의 손상 여부를 조사하여, intact acrosome, reacting acrosome, reacted acrosome으로 분류하였으며 (Fig. 2), 관찰된 정자에 대한 백분율로 각각 표기하였다.

#### 4. 저온보존 온도의 변화

저온보존 시 분당 온도의 변화 즉, cooling rate는 정자의 저온보존방법과 동일한 조건을 주어서 조사하고자 했다. 디지털 온도계(Thermocouple Thermometer, GLAS-COL, U.S.A)를 37°C의 Tris-egg yolk buffer가 든 5 ml tube에 넣고 이 tube를 37°C 물이 채워진 50 ml tube에 넣어서 4°C 냉장고에 두고, 30초 간격으로 온도의 변화를 조사하였다. 온도가 평형을 이루는 시각의 5분 후까지 관찰하였으며, 이 시각은 저온속도를 계산하는데 이용하였다.

#### 5. 정액의 저온보존 및 용해

채정된 정자를 Tris-Egg Yolk (Trisma. 81 mM; egg yolk 8%) buffer로 ml당  $8 \times 10^7$ 마리가 되도록 희석하여 5 ml tube에 넣고 이 tube를 37°C의 물이 채워진 50 ml tube에 넣어서 4°C의 저온 냉장고에 넣어 정자를 보존하였다 (4항의 저온보존 온도의 변화 조건과 동일). 정자를 4°C에서 저온보존하면서 10일 동안 정자의 보존시간에 따른 정자의 운동성과 생존율 및 침체반응 상태를 조사하였다. 저온보존 정액의 용해조건은 37°C 항온수조에서 2분 동안 흔들면서 실시한 후 정자의 운동성, 생사율, 침체의 상태를 비교 조사하였다.

#### 6. 통계학적 분석

본 실험에서는 저온보존 시 온도의 변화 조사는 5회 반복, 10일간의 저온보존시 정자의 성상 검사 실험은 10회 반복 실시하였으며, 각 실험값의 백분

율을 arc-sine을 이용하여 전환한 후 통계프로그램인 Analysis of Variance (ANOVA)로 분석하였고,  $P < 0.05$ 일 때 유의적 차이를 인정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 신선정액 검사

채취한 정액을 실험에 사용할 지의 여부를 판단하고자 실험 공시 건 개체별로 정자의 농도와 정상적인 정자의 형태비율을 조사한 결과 신선정액 (fresh semen)의 평균 정액량은 0.9 ml이었으며 정자농도는 ml 당 3억 4천 6백만 마리로 정상범주였다. 이는 TE buffer를 희석하여 사용할 수 있는 ml 당 8천만 마리 이상이 되는 정상적인 정액만을 선별하여 사용하였다.

### 2. 정액 저온보존 온도

정액을 저온보존하기 전에 저온보존 방법과 동일하게 온도의 변화와 평형을 이루는 온도를 3번 반복 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 저온보존 직후부터 10분까지는 급격한 온도의 감소를 보였으나, 이후에는 완만한 온도의 감소를 보였으며, 4°C로 평형을 이루게 되는 시간까지의 평균 cooling rate는 분당 0.6°C를 보였다.

### 3. 저온보존의 시간 경과에 따른 정자의 성상

4°C의 상태로 정자를 보존시키면서 시간경과

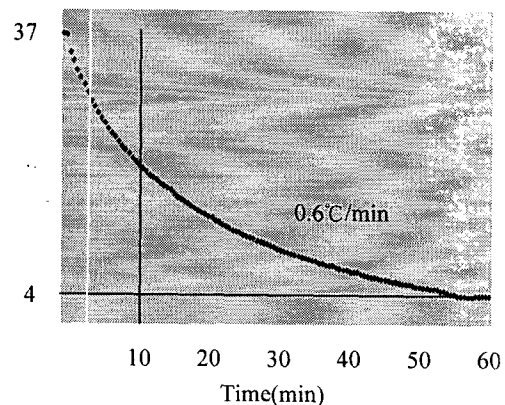


Fig. 3. Curve of cooling ramp rate in a refrigerator adjusted at 4°C.

Table 2. Survivability, motility and acrosome integrity of sperm following different preservation time in 4°C

Preserve time	Survivability(%)	Motility(%)	Acrosome integrity as an intact(%)
Control	100	100	100
12h	89.7±0.3 <sup>a</sup>	88.0±0.8 <sup>a</sup>	51.3±0.4 <sup>a</sup>
12h	71.8±0.5 <sup>b</sup>	69.1±0.4 <sup>b</sup>	33.9±0.5 <sup>b</sup>
1d	79.4±0.2 <sup>b</sup>	67.0±0.6 <sup>b</sup>	32.6±0.5 <sup>b</sup>
2d	78.3±0.5 <sup>b</sup>	65.0±0.5 <sup>b</sup>	32.0±0.8 <sup>b</sup>
6d	64.7±0.8 <sup>c</sup>	59.4±0.3 <sup>b</sup>	32.8±0.9 <sup>b</sup>
7d	63.3±0.5 <sup>c</sup>	25.7±0.4 <sup>c</sup>	33.0±0.7 <sup>b</sup>
9d	62.3±0.5 <sup>c</sup>	18.7±0.2 <sup>c</sup>	21.5±0.5 <sup>c</sup>
10d	48.9±0.8 <sup>d</sup>	8.0±0.4 <sup>d</sup>	16.8±0.1 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts in a column differ significant(P<0.05) control, ejaculated sperm

\* Relative percentages as consider to ejaculate

에 따른 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 첨체의 상태를 조사한 결과를 Table 2에서 보는 바와 같다. 채정 된 직후의 정자의 생존율, 운동성 및 첨체의 intact 여부를 100%로 간주하였고, 그에 따른 시간 별 상태변화를 백분율로 표기하였다. 생존율은 12 시간까지 유의적 감소를 보이지 않았으나, 12시간 이후부터 2일 이내에 약 25%의 감소를 나타내었다. 60% 이상의 생존성은 보존 9일까지 지속되었다. 운동성에 있어서도 생존성과 유사한 감소현상을 보였으나, 상대적 비율에 있어서는 많은 감소를 보였다. 보존 12시간에 있어서는 69%, 6일째는 59% 그리고 7일에는 급격한 감소를 보여 26%의 수준을 보였다. 저온보존에 대한 가장 많은 변화를 보이는 첨체의 경우 보존 2시간 만에 절반의 첨체가 이미 reacted 및 reacting 상태로 되었으며, 보존 12 시간부터 7일까지 30% 전후의 intact한 상태를 보였다.

본 실험에서 정자를 일정기간 보존하는 동안 정자의 가장 두드러진 변화는 정자의 수명과 운동성, 첨체의 형태학적 강도의 단계적인 감소로써 이러한 결과는 Rathore와 Mukherjee (1966)와 Farstad (1996)의 보고와 일치되는 경향을 보였다.

정자를 저온 보존함에 있어서 cooling ramp rate는 정자의 생존성 및 운동성에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 있다. Fastard (1996)의 보고

에 따르면 정자를 4°C까지 저온 보존함에 있어, cooling ramp rate를 분당 2°C로 하였을 때 정자의 생존성 및 운동성에 많은 변화가 없다고 하였으나, 본 실험의 예비실험에서는 분당 0.6°C로 하였을 때 정자의 생존성 및 운동성에 가장 적은 변화를 보였다. 정자의 저온 보존 후 정자의 생존율에 있어서는 저온 보존 후 12시간째에 72%로 2시간째의 90%에 비해 유의적(p<0.05)으로 감소를 보인 이후 각각 6일째와 10일째에 유의적 (p<0.05)으로 감소하였다. 이것은 Rota 등(1999)의 결과와 비슷하게 나타났고, 운동성에 있어서는 12시간째에 69%로 2시간째의 88%에 비해 유의적으로 감소한 이후 각각 7일째와 10일째에 감소하였는데, 이것은 Rota 등(1995)의 egg-yolk-tris를 이용한 저온보존에서의 결과와 비교해 볼 때 하루째의 74%인 것보다 좋지 않았으나, 4일째의 54%인 것과 비교해 볼 때 유의성은 나타낼 수 없지만, 좋은 결과를 보였다. 첨체 상태를 비교해 볼 때는 본 실험에서는 12시간째와 9일째에 각각 유의적(p<0.05)으로 감소하였다. 이것은 Rota 등 (1995)의 4일째의 약 30%의 결과와 비교해 볼 때 유사한 결과를 보였다. 이것으로 본 실험에서 사용한 동결보호제를 이용한 저온보존의 방법으로 정액을 보존하였을 때 최대 6일까지도 보존하여 인공수정에 사용할 수 있을 것으로 사료되어진다.

## 적 요

본 실험에서는, 인공수정에 이용할 목적으로 개 정자를 보존하기 위해서 실험실에서 자체적으로 개발된 동결보호제를 사용하여 저온보존을 실시하여 보존시간에 따른 정자의 운동성, 생존성 및 침체반응을 비교 조사하여 얻어진 결과를 다음과 같다.

개의 신선정액 (fresh semen)의 평균 정액량 및 정자농도는 각각 0.9 ml 및 ml당 3억 4천 6백만 마리로 정상범주이었으며, 정자는 저온보존 직후부터 10분까지는 급격한 온도의 감소를 보였으나, 이후에는 완전한 온도의 감소를 보였으며, 4°C로 평형을 이루게 되는 시간까지의 평균 cooling rate는 분당 0.6°C였다. 4°C의 상태로 정자를 보존시키면서 시간경과에 따른 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 침체의 변화조사에 있어서 생존율은 12시간까지 유의적 감소를 보이지 않았으나, 12시간 이후부터 2일 이내에 약 25%의 감소를 나타내었다. 60% 이상의 생존성은 보존 9일까지 지속되었다. 운동성에 있어서도 생존성과 유사한 결과를 보였으나, 상대적인 비율에 있어서는 많은 감소를 보였다. 보존 12시간에 있어서는 69%, 6일째는 59% 그리고 7일에는 급격한 감소를 보여 26%의 수준을 보였다. 저온보존에 대한 가장 많은 변화를 보이는 침체의 경우 보존 2시간 만에 50%의 침체가 이미 reacted 및 reacting 상태로 되었으며, 보존 12시간부터 7일까지 30% 전후의 intact한 상태를 보였다.

이러한 결과로 보아서 개 인공수정시 동결보호제를 이용한 저온보존의 방법으로 정액을 보존하였을 때 6일간 보존한 정액을 이용한다면 개 인공수정을 일반화하는데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Cross NL. 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone : cholesterol is the major inhibitor. *Biol. Reprod.*, 54:138-145.
- Farstad W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, 42:251-260.

- Foote RH. 1964. The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm in buffered yolk medium. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 32-36.
- Martin ICA 1963. The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim-milk. *Res. Vet. Sci.*, 4:315-325.
- Milovanov VK. 1951. Methods of storage of semen of ruminants. In 'News in the Biology of Reproduction of Farm Animals, 139-165.
- Rathore AK and Mukherjee DP. 1966. Cyto-morphological changes in ram spermatozoa due to preservation in egg yolk citrate and egg yolk glycine dilutors. *Indian. Vet. J.*, 43:237-241.
- Rota, A, Strom B and Linde-Forsberg C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4(°C). *Theriogenology*, 44:885-900.
- Rota A, Pena AI, Linde-Forberge C and Rodriguez-Martinez H. 1999. *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.*, 57:199-215
- Rowson LEA. 1954. Infertility of cow, sow and bitch. *Irish Veterinary Journal*, 8:216-221
- Seager SWJ. 1969. Freezing and transportation of dog semen. VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, (Krakow), 5:1251-1252.
- Spallanzani L. 1776. *Opuscoli di fiscal animale e vegetabile. Opuscolo II. Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermaici dell' homo e degli animali.* Modena.
- Watson PF. 1976. The protection of bull and ram spermatozoa by the low-density fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. *J. Thermal. Biol.*, 1:137-141.

(접수일: 2001. 1. 27 / 채택일: 2001. 2. 15)