J. Emb. Trans. (2011) Vol. 26, No. 1, pp. 71~78

미니돼지정액의 보존 시 콜레스테롤과 혈청 알부민이 정자 성상과 지질 과산화에 미치는 영향

김동우[1], 이용승[1], 유한준[1], 정희태[2], 양부근[1], 박춘근[1,*]
[1]강원대학교 동물생명과학대학, [2]강원대학교 수의과대학

Effect of Cholesterol and Serum Albumin on Sperm Ability and Lipid Peroxidation during the Storage of Miniature Pig Sperm

Dong-Woo Kim[1], Yong-Seung Lee[1], Han-Jun Yoo[1], Hee-Tae Cheong[2], Boo-Keun Yang[1] and Choon-Keun Park[1,*]
[1]College of Animal Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
[2]College Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

This study was undertaken to find out the effect of cholesterol and serum albumin on sperm ability and lipid peroxidation levels period to the liquid storage of miniature pig sperm. Ejaculated semen from miniature pigs was collected by gloved-hand method into a pre-warmed (37℃) thermos bottle, and extended with Modena solution {with and without BSA, methyl-beta-cyclodextrin (−cholesterol) and cholesterol loaded cyclodextrin (+cholesterol)}. Each semen was assessed for viability (SYBR-14 / PI staining) and acrosome intactness, intensity and capacitation status by chlorotetracycline (CTC) staining at 1, 3, 5, 7 and 10 days of storage. At for the effects of cholesterol and serum albumin on lipid peroxidation, semen were incubated with H_2O_2 (10 μM), and lipid peroxidation level were measured by flow cytometry using the lipid peroxidation reporter probe C_{11}-BODIPY$^{581/591}$. The result, lipid peroxidation level in sperm added with cholesterol were lower in 10 μM H_2O_2 compared to the added sperm with serum albumin. Also, added cholesterol to sperm had significant ($p<0.05$) higher viability when storage for 7 and 10 days and lower when 10 days of storage percentage of acrosome-reacted sperm (AR pattern) in acrosome state as say result compared to other treated groups. In conclusion, role of cholesterol during lipid storage in miniature pig spermatozoa was protected boar spermatozoa from lipid peroxidation prior to lipid storage. Addition serum albumin during lipid storage in sperm may be induce sperm membrane damage by lipid peroxidation. Therefore, addition of cholesterol to miniature pig sperm will be lead to extension of liquid storage periods.

(Key words : miniature pig, cyclodextrin, lipid peroxidation, cholesterol)

서 론

돼지 산업에 있어서 인공수정 기술은 자돈 생산, 종축 개량 및 종모축의 이용 효율 증대를 위해 세계적으로 널리 이용되고 있는 번식 기술이다. 대부분의 인공수정에 이용되는 돼지 정액은 다양한 희석액으로 희석되어 15~20℃에서 약 5~7일 동안 보존되어진다(Johnson 등, 2000). 정액의 보존을 위해 이용되는 희석제는 정액과 동일한 삼투압과 pH를 유지하고, 정액 내 정자의 생존에 필요한 에너지원을 공급함으로써 보존 온도와 더불어 정자의 보존 기간을 좌우하는 중요한 인자이다. 이와 같은 인자들을 기초로 돼지에서의 희석 정액의 장기간 보존에 관한 연구가 이루어졌다(Estienne MJ 등, 1989). 그러나 희석액을 이용한 액상 보존의 경우, 보존 기간이 길어짐에 따라 다양한 스트레스로 인해 정자의 수정 능력이 감소하게 된다(Johnson 등, 2000; Bailey 등, 2008). 정자의 수정 능력 감소는 긴 시간 동안 낮은 온도에서의 액상 보존과 동결 보존에 따른 원형질막의 지질 산화에 의한 손상이 원인이다(Guthrie와 Welch, 2006; Vallorani C 등, 2010). 지질 과산화는 많은 종의 정자에서 생존율, 운동성 및 수정 능력을 감소시키는 손상 과정으로 인식되어진다(Alvarez와 Storey, 1984; Gagnon 등, 1991; Hammerstedt, 1993; Aitken 등, 1994; lenzi 등, 1996).

* 본 연구에 수행하는 있어서 정자의 지질 과산화 분석에 이용된 형광 분석 장비와 flow cytometry 장비의 도움을 준 강원대학교 동물자원공동연구소와 공동실험실습관에 감사드립니다.

* Correspondence : E-mail : parkck@kangwon.ac.kr

일반적으로 돼지의 정장액은 상대적으로 낮은 항산화 능력을 가지고 있으며(Brezezinska-Slevbodzinska 등, 1995), 상대적으로 다른 동물 종에 비해 원형질막의 콜레스테롤/인지질 비율이 낮고, 막 인지질 내에 고도불포화 지방산을 많이 가지고 있어 과산화 피해에 민감하다(Cerolini S 등, 2001). 액상 보존 기간 중 정자원형질막을 산화스트레스로부터 보호하기 위해 각각 crocin, trolox, vitamin C, nacetyl-cysteine, taurine, glutathione, faffinose, trehalose, cysteamine 및 butylated hydroxytoluene 등과 같은 다양한 항산화제를 희석제에 첨가하였을 때 정자 보존에 보다 효과적이었다고 보고된 바 있다(Brezezinska-Slebodzinska 등, 1995; Funahashi 등, 2005; Michael 등, 2009; Branco 등, 2010; Coyan 등, 2010; Dominguez-Rebolledo 등, 2010; Neagu 등, 2010; Shiva Shankar Reddy 등, 2010; Tuncer 등, 2010).

콜레스테롤은 세포막의 구성물 중 하나로 세포막의 기능 조절(Yeagle, 1985), 막 유동성(Hartel 등, 1998) 및 침투성(McGrath, 1988)에 결정적인 역할을 한다. 세포막내 스테롤의 존재가 인지질의 변화를 억제한다고 보고된 바 있다(Holt, 2000). 장기간 보존 시 정자의 생존율과 운동성을 유지하기 위해 bovine serum albumin(BSA)을 첨가하기도 하지만, BSA는 정자의 세포막에서 콜레스테롤을 추출한다는 보고가 있다(Langlais 등, 1988; Visconti 등, 1996). 또한 methyl-β-cyclodextrin (MBCD)을 첨가하여 보존 후 지질 분석을 하였을 때도 정자의 세포막을 파괴하여 스테롤이 추출되는 결과를 보였다(Chiu 등, 2005). 이는 정액 보존시 원형질막과 첨체막내 콜레스테롤양의 손실되었을 때 정자의 첨체에 악영향을 미칠 것으로 생각된다. 이와는 반대로 콜레스테롤을 세포막내로 첨가시켜주는 것(Zeng과 Teraka, 2001; Purdy와 Graham, 2004)으로 알려진 cholesterol loaded cyclodextrin(CLC)을 토끼 정자에 처리하였을 때 첨체 반응을 억제한다는 연구가 있었다(Melih Aksoy 등, 2010).

따라서 본 연구는 미니 돼지 정액의 액상 보존율 향상을 위해 정액 보존 시 정자 원형질막내 콜레스테롤을 MBCD와 CLC를 이용하여 조절하였을 때 정자 성상 변화를 분석하고, 정액의 액상 저장 동안 발생된 산화 스트레스에 의한 지질 과산화와 정자막 내 콜레스테롤과의 연관성을 알아보기 위해 일반적으로 액상보존액에 많이 이용되는 BSA나 콜레스테롤을 첨가하여 정자의 지질 과산화를 비교분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 정액의 수집 및 운반

본 연구는 강원대학교 목장에서 사육 중인 PWG miniature pig(PWG제네틱스, M-type)를 이용하였다. 정액의 채취는 의빈대를 이용하여 음경수압법을 실시하였으며, 채취된 정액은 거름망으로 한 번 거른 후에 37℃로 가온된 보온병에 담아 1시간 이내로 실험실로 운반하였다. 실험실에 도착 후 정액과 37℃도 가온된 희석액(Mulberry Ⅲ; modified-Modena B)을 혼합하여 최종 농도를 5×10^7 sperm/ml가 되도록 하였다.

2. 정액의 처리

준비된 정액은 대조군, BSA(A4503, sigma)를 0.4%(w/v) 첨가한 처리군, Methyl-β-Cyclodextrin(MBCD, C4555, Sigma)을 0.625 mg/ml 첨가한 처리군, 그리고 Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin(CLC)을 0.625 mg/ml 첨가한 4개의 처리군으로 나누어 실험에 사용하였다.

3. 실험 1. 액상보존 기간 동안 정자 성상에 미치는 영향

1) 생존율 검사

생존율은 Maxwell과 Johnson(1997)이 사용한 Live/Dead^{TM} sperm viability kit(Molecular Probes, USA, L7011)의 SYBR-14/PI 이중염색으로 검사하였다. SYBR-14와 PI는 형광염색 시약으로 SYBR-14는 녹색, PI는 붉은색 형광을 가지는데, 세포막 투과성의 차이로 살아있는 정자에는 SYBR-14가 염색되고, PI는 투과하지 못하여 염색되지 않는다. 반면, 죽어 있는 정자에는 PI가 투과하여 핵에 염색되는 원리를 이용한 것이다. 먼저 정액 500 μl를 원심분리(1,500 rpm, 5분)하여 상층액 제거 후 PBS로 세척하였고, SYBR-14 염색약을 2 μM 분주하여 37℃ 암실에서 5분간 처리하였다. 그 후 다시 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS를 사용하여 재부유 후 PI 염색약을 2 μM 분주하여 동일 조건으로 처리하였다. 최종적으로 염색된 표본은 형광현미경(×400) 하에서 관찰하였다.

2) 첨체 상태 검사(CTC)

첨체 상태 검사는 Wang 등(1995)의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다. PBS로 세척 후 D-PBS 200 μl를 첨가하여 재부유 후, CTC solution{750 uM Chlorotetracycline Sigma, C-4881, USA) + 5 mM cysteine + 130 mM NaCl + 20 mM Tris (pH 7.8)}과 polyvinyl-pyrolidone(PVP-40; Sigma)를 첨가하여 차광 상태의 실온에서 5분간 염색하였다. 마지막으로 12.5% paraformaldehyde를 첨가하여 5분간 고정시킨 후 slide glass에 표본과 DABCO를 각 10 μl씩을 혼합하여 현광현미경(× 400) 하에서 관찰하였다. 정자의 두부가 전체적으로 노란색으로 염색이 되면 수정능 획득과 첨체 반응이 일어나지 않은 정자(F pattern), 첨체 부위에만 염색이 된 경우는 수정능 획득은 일어났으나, 첨체 반응이 일어나지 않은 정자(B pattern), 전체적으로 염색이 희미하거나 첨체 적도 부위에만 염색이 된 경우는 수정능 획득과 첨체 반응이 모두 일어난 정자(AR pattern)로 판단하였다.

4. 실험 2. 산화스트레스에 의한 정자의 지질 과산화에 미치는 영향

Guthrie와 Welch(2007), Brouwers와 Gadella(2003)의 방법을 보완하여 실시하였다. 각 처리군별로 준비된 정액을 세척하여 최종 농도가 1×10^7 sperm/ml가 되도록 한 후 지질 과산화를 유도하기 위하여 H_2O_2(10 μM)와 지질 과산화를 측정하기 위한 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a, 4adiaza-s-indacene-3-undecanoic acid(C_{11}-BODIPY$^{581/591}$, Molecular Probes, D3861)를 2 μM 첨가하여 37℃의 암실에서 30분간 배양하였다. 산화가 일어난 부분에서는 녹색 형광이 나타나며 그렇지 않은 부분은 적색 형광이 나타난다. FACs(BD FACSAria Ⅱ Cell sorter)를 이용하여 Flow cytometric analysis 방법으로 지질 과산화에 따른 형광 변화의 차이를 측정하였다. Argon(488 nm) laser를 사용하여 측정된 수치는 상대적인 수치이며 Dot plot과 Histogram으로 나타내었다.

5. 통계처리

정자의 액상보존 기간 동안의 통계상의 수치와 유의적 차이 분석은 통계프로그램 SAS(version 9.1)에서 Duncan's multiple range test로 유의차($p<0.05$)를 검정하였다.

결 과

1. 보존일수 별 정자의 생존율의 변화

1, 3, 5, 7 및 10일 동안의 생존율을 Fig. 1과 같이 나타내었다. 전체적으로 보존 일수별 정자의 생존율 변화를 보면 1일과 3일에서 생존율은 유의적($p<0.05$)인 차이를 보이지 않았으나, 5일차부터 정자의 생존율이 전체적으로 감소하여 1, 3일차에 비해 유의적($p<0.05$)으로 낮은 생존율을 나타냈다. 7일차에서 CLC 처리군이 79.92±0.59%로 유의적($p<0.05$)으로 가장 높고, MBCD 처리군이 70.05±3.28%로 유의적($p<0.05$)으로 가장 낮은 생존율을 나타났다. 10일차에서는 BSA 처리군과 CLC 처리군이 각각 72.58±1.12%, 72.64±1.00%로 대조군(68.44±0.22%)과 MBCD 처리군(66.86±1.26%)에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높은 생존율을 나타냈다. 정액 보존 일수에 따른 BSA 그룹과 CLC 그룹 간의 유의적($p<0.05$) 차이는 나타나지 않았다.

2. 보존일수 별 정자의 첨체 상태의 변화

정자의 첨체 상태의 변화 분석을 위한 보존 일수 별 정자의 CTC 분석 결과는 각각 Fig. 2, 3, 4에 나타내었다. Fig. 2는 정자의 막이 손상되지 않고 온전한 상태를 나타내는 F pattern을 분석한 그래프이다. 보존 일수에 따라 대조군과 모든 처리군이 유의적($p<0.05$)으로 감소하는 것을 볼 수 있었고, 10일차에서는 BSA 처리군(5.33±0.88%)이 유의적($p<0.05$)으로 가장 높았으며, MBCD 처리군(1.33±0.33%)이 유의적($p<0.05$)으로 가장 낮게 나타났다. 수정 능력이 획득된 정자의 첨체 상태인 B pattern을 분석한 결과는 Fig. 3에서 나타냈다. 7일까지 B pattern이 유의적($p<0.05$)으로 증가하다가 10일째 유의적($p<0.05$)으로 감소하는 경향이 나타났다. 7일차에서는 대조군과 CLC 처리군이 BSA과 MBCD 처리군보다 유의적($p<0.05$)으로 높았고, 10일차에서는 CLC 처리군이 다른 처리군과 대조군에 비해 유의적($p<0.05$)으로 가장 높게 나타났다. Fig. 4는 첨체막이 손상된 정자의 첨체 상태를 나타내는 AR pattern을 분석한 그래프이다. 7, 10일차에서는 MBCD 처리군이 다른 처리군과 대조군에 비해 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났고, 10일차에서 CLC처리군(46.33±0.33%)이 유의적($p<0.05$)으로 가장 낮은 AR pa-

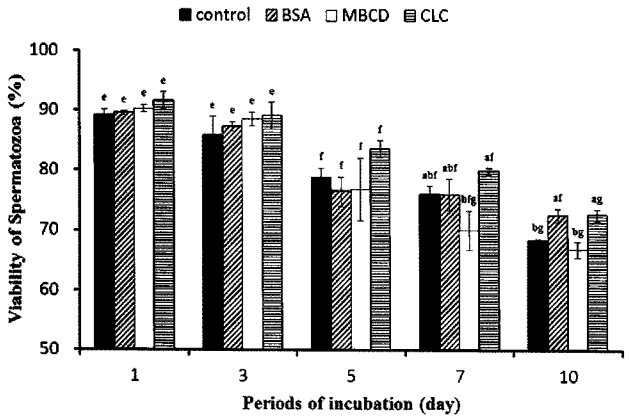

Fig. 1. Effect of serum albumin and cholesterol on survival ability of miniature pig sperm using SYBR-14/PI staining during a liquid storage. a~b: Significantly difference of treatment groups ($p<0.05$). e~g: Bar with different superscripts within the same category difference significantly.

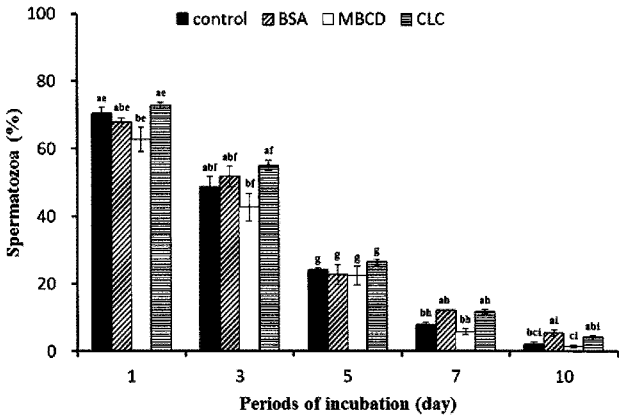

Fig. 2. Effect of serum albumin and cholesterol on F pattern ratio (intact acrosome) of miniature pig sperm using CTC staining during a liquid storage. a~c: Significantly difference of treatment groups ($p<0.05$). e~i: Bar with different superscripts within the same category differ significantly ($p<0.05$).

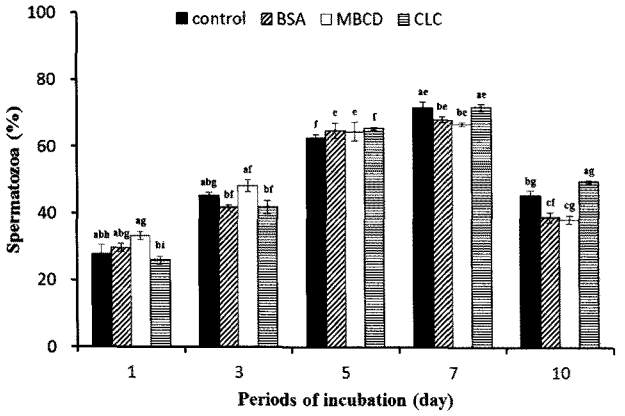

Fig. 3. Effect of serum albumin and cholesterol on B pattern ratio (intact acrosome) of miniature pig sperm using CTC staining during a liquid storage. a~c: Significantly difference of treatment groups ($p<0.05$). e~i: Bar with different superscripts within the same category differ significantly ($p<0.05$).

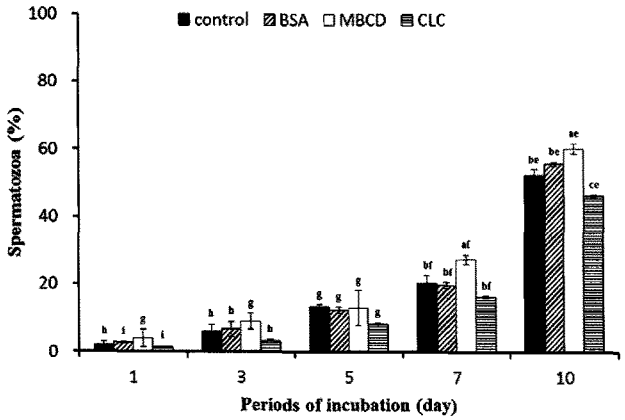

Fig. 4. Effect of serum albumin and cholesterol on AR pattern ratio (intact acrosome) of miniature pig sperm using CTC staining during a liquid storage. a~b: Significantly difference of treatment groups ($p<0.05$). e~i: Bar with different superscripts within the same category differ significantly ($p<0.05$).

ttern율을 나타냈다.

3. 정자의 지질 과산화 분석

정자 막의 지질 과산화 정도를 분석하기 위해 C_{11}-BODIPY $^{581/591}$ 염색 후 flow cytometry를 통한 상대적인 수치를 Dot plot과 Histogram으로 나타내었다(Fig. 5A, B). Fig. 5A에서 세로축은 정상적인 지질 상태(붉은색 형광), 가로축은 과산화된 지질의 상태(녹색 형광)를 나타낸 것이며, 빨간 점들은 정자 군집을 나타낸 것이다. C_{11}-BODIPY$^{581/591}$ 염색을 하지 않은 Control을 기준으로 지질 과산화를 유도시키지 않은 unperoxidation은 붉은색 형광 영역에 정자군집이 분포된 것을 관찰할 수 있다. 나머지 대조군과 처리군은 10 μM의 H_2O_2를 처리하여 지질 산화를 유도한 결과, Fig. 5A에서와 같이 지질 산화가 일어난 녹색 형광 영역으로 정자의 군집이 이동된 것을 관찰할 수 있다. 그 중 CLC 처리군의 정자 군집이 녹색 형광 영역으로 가장 적게 이동하였으며, BSA 처리군이 가장 많이 녹색 형광 영역으로 이동된 것을 관찰할 수 있다. Fig. 5B는 대조군과 각 처리군 간의 차이를 상대적으로 분석된 Histogram 그래프로 나타낸 것으로 피크가 오른쪽으로 갈수록 강한 녹색 형광이 발현된 것이며, 이는 지질 산화가 많이 일어났음을 의미한다. 상대적으로 BSA 처리군이 가장 강한 녹색 형광을 가진 것으로 나타났으며, CLC 처리군이 가장 약한 형광을 나타났다. 이와 같은 결과는 BSA 처리군이 가장 많이 지질 과산화가 진행되었음을 의미하며, 상대적으로 형광 발현이 가장 적게 나타난 CLC 처리군은 지질 과산화 손상을 가장 적게 받은 것으로 분석할 수 있다. 각 처리군별 정자의 지질 과산화의 차이를 가시화하기 위해 형광현미경을 사용하여 촬영한 사진을 Fig. 6에서 나타냈다. H_2O_2에 의해 산화가 유도된 처리군 중 Fig. 5에서 나타난 결과와 마찬가지로 BSA 처리군의 녹색 형광이 가장 세게 나타나는 것을 확인할 수 있다.

고 찰

본 연구는 미니돼지 정자의 액상 보존을 향상을 위해 세포막을 안정화 시켜주는 역할을 하는 것으로 알려진 콜레스테롤을 CLC를 이용해 정자 세포막내 주입하였을 때 정액 보존기간 동안의 정자 성상의 변화와 그 원인을 분석하고자 하였다. 기존의 정액 보존액에서는 일반적으로 정자의 생존 기간을 연장하기 위해 BSA가 효과적으로(Weitze, 1991) 대다수의 돼지 정액 액상 보존액에 널리 이용되고 있다. 본 연구에서 또한 Fig. 1의 결과에서 보면 액상 보존 기간 중 BSA 처리군의 생존률이 10일간 액상 보존 시에도 68.44±0.22%로 가장 높은 생존율을 나타냈다. 그러나 액상 보존 기간 동안 첨가되는 알부민이 정자의 수정능 획득과 첨체 반응을 자극한다고 보고된(Rogers, 1978) 바 있으며, 또한 이러한 반응은 보존 시간에 따라서도 그 영향을 받는다고 보고되었다(Fraser, 1987). 기존의 연구 결과와 마찬가지로 본 연구에서도 비슷한 양상을 보였다. 첨체 상태의 변화를 관찰하기 위해 실시한 CTC 분석 결과, BSA 처리군이 CLC 처리군에 비해 수정능이 획득된 정자를 나타내는 B pattern이 유의적으로($p<0.05$) 낮게 나타났고, 첨체가 손상된 AR pattern 정자의 비율이 유의적으로($p<0.05$) 높게 나타났다(Fig. 3, 4). 장기간 보존을 위해 생존율도 중요하지만 보존된 정액을 인공 수정에 사용하기 위해서는 보존 기간 동안에 수정 능력을 유지하는게 최선이라 할 수 있다.

본 연구의 결과에서 콜레스테롤을 정자막내 주입하기 위해 처리한 CLC 처리군의 경우, BSA 처리군과 비교하여 유의적

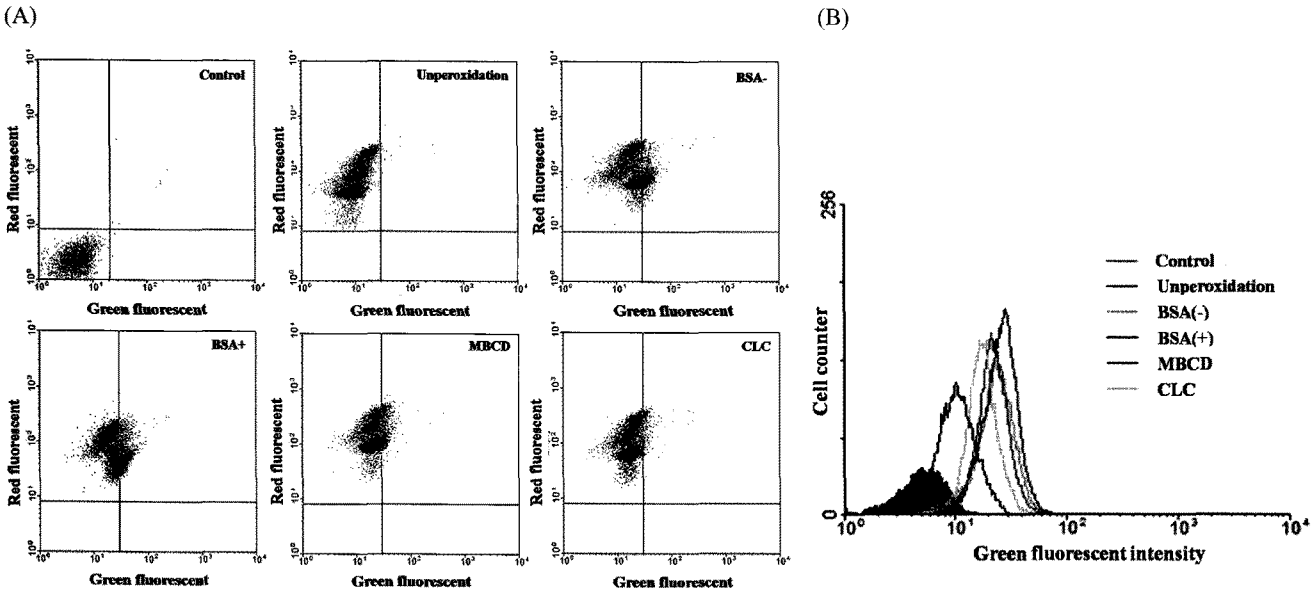

Fig. 5. Flow cytometric analysis of the impact of bovine serum albumin and cholesterol on lipid peroxidation in miniature pig spermatozoa treated with 10 μM H_2O_2 as recorded by C_{11}-BODIPY$^{581/591}$. (A) Dot plotic an alysis of peroxidation damage. (B) Histogram assay of peroxidation damage.

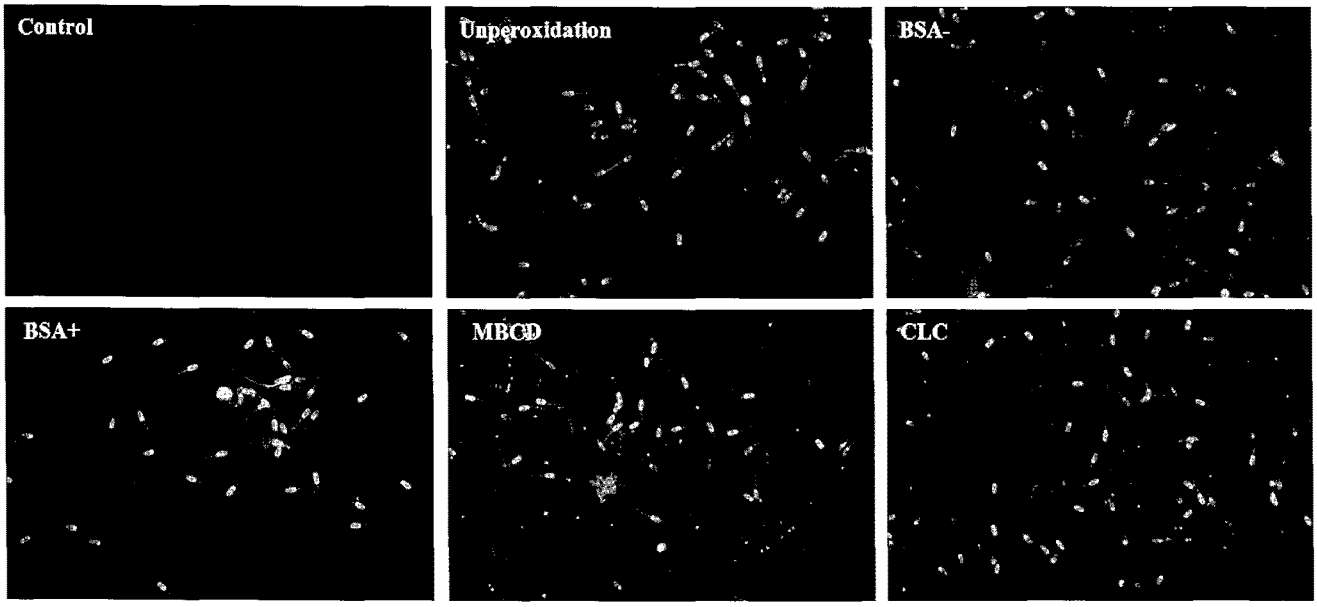

Fig. 6. Florescence imaging of sperm labeled with C_{11}-BODIPY$^{581/591}$ and incubated in 10 μM H_2O_2 for 30 min was monitored by fluorescent microscope. Areas of lipid peroxidation appear green or orange fluorescent.

차이가 없을 정도로 생존율이 높게 나왔으며, 첨체 상태를 분석한 CTC 분석에서는 BSA에 비해 첨체 손상이 적고 수정능력을 가진 정자의 비율이 유의적으로(p<0.05) 높게 나타났다. 그 동안의 연구에서 알부민은 정자의 콜레스테롤에 대한 수용체 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Davis 등, 1980; Go와 Wolf, 1985), 이후 연구에서 MBCD도 강력한 콜레스테롤 수용체로써 쥐(Choi와 Toyoda, 1998; Visconti 등, 1999), 소(Visconti 등, 1999), 사람(Osheroff 등, 1999)의 정자세포막에서 콜레스테롤을 유출하는 것으로 알려졌다. BSA와의 정자 성상의 차이를 분석하고자 비교 처리군으로 콜레스테롤 수용체인 MBCD를 처리하여 보존 기간 동안의 정자 성상의 변화를 분석한 결과, 생존율은 유의적으로 가장 낮았으며, 첨체 손상은

가장 높게 나타났다(Fig. 1, 2, 3, 4). 이와 같은 결과는 BSA는 콜레스테롤을 제거하기도 하지만 정자에 단백질을 공급하고 기존연구에도 생존율과 운동성을 향상시킨다는 보고가 있었으나, MBCD에 의해 콜레스테롤이 제거된 정자의 경우 막손상만이 유발되어 정자의 생존율과 첨체 손상이 가장 높게 나타났을 것이다. 위의 결과를 볼 때 정자막에 콜레스테롤을 주입하였을 때 정자의 액상 보존율을 향상시키며, MBCD 처리를 통해 콜레스테롤 제거에 따른 분석 결과를 비춰 볼 때 콜레스테롤의 제거가 정자 막손상을 야기하는 것으로 보인다. 또한 BSA 역시 막 내 콜레스테롤을 제거하는 것으로 보고된 바 있으나, 정자의 생존율이 가장 높았으므로 BSA가 막내 콜레스테롤 제거 효율이 MBCD에 비해 떨어지거나, 정자의 활력에 있어서 단백질 공급원과 같은 BSA의 또 다른 효과가 있을 것이다.

돼지 신선 정액의 최적의 액상 보존 온도는 15~20℃(Johnson 등, 2000)로 낮은 온도에서 장시간 보존시 원형질막의 지질산화에 의한 손상이 원인이 된다(Guthrie 와 Welch, 2006). 또한 정액이 보존되는 대기의 조건도 산소가 약 20% 정도의 상태로 보존 기간 동안의 산화 스트레스로 인한 지질 과산화의 피해를 입을 수 있다. 그래서 본 연구는 정자 액상 보존 시 발생될 수 있는 산화 스트레스에 의한 손상을 알아보기 위해 H_2O_2 10 μM을 처리하여 C_{11}-BODIPY$^{581/591}$ 형광 염색을 통해 지질 과산화 정도를 분석하였다. 그 결과, Fig. 5에서 flow cytometry를 이용하여 형광의 세기 분석을 통해 지질 과산화 정도를 측정하였을 때 상대적으로 BSA 처리군이 가장 많고, CLC 처리군이 가장 적은 것으로 나타났다. 또한 Fig. 6에서와 같이 지질산화의 정도를 형광현미경으로 가시화한 사진을 관찰해 보면 BSA가 유독 지질 과산화 정도가 심하게 나타났으며, 일부 정자의 경우 첨체막에서의 지질 과산화가 일어난 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과로 미루어볼 때 알부민은 지질산화에 의해 정자세포막에 손상을 유발한다고 볼 수 있다. 또한 콜레스테롤의 차이에 따른 지질 과산화에 대한 손상을 보면 BSA 만큼의 큰 지질 과산화 정도는 아니었지만 CLC 처리군과 MBCD 처리군 간의 상대적인 차이는 있었다. 그러나 BSA가 첨가되지 않는 비 첨가군에 비해서 상대적으로 MBCD가 지질 과산화가 적게 나타난 점을 봤을 때 단순히 콜레스테롤의 첨가로 인해 지질 과산화 손상이 적었던 것이 아니라고 해석할 수 있다. 두 처리군 간의 차이는 콜레스테롤에 있고 기본적으로 cyclodextrin을 기본 구조로 하기 때문에 지질 과산화에 cyclodextrin의 연관성이 있을 수도 있다.

결론적으로 미니돼지의 정자를 액상 보존 시 콜레스테롤의 첨가는 보존 기간을 늘려줄 수 있으며, 산화 스트레스로부터 정자의 막 손상을 보호해 주는 것으로 나타났다. 그러나 산화 스트레스의 막 손상의 경우 단순히 콜레스테롤의 첨가 유무만의 문제로 판단한 본 연구 결과만으로는 한계를 보인다. 그러므로 지질 과산화와 cyclodextrin과의 연관성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

결 론

본 연구는 미니돼지 정액의 액상보존 기간 동안 정자성상과 지질 과산화에서의 콜레스테롤과 BSA의 효과를 알아 보고자 하였다. 미니돼지 정액은 음경수압법으로 37℃의 보온컵에 채취하였다. 그리고 채취된 정액을 혈청 알부민이 제거된 Modena 희석제를 기본으로 각각 혈청 알부민, MBCD(콜레스테롤 제거군) 및 CLC(콜레스테롤 주입군)를 첨가하여 액상 보존하였다. 정액 성상 분석을 위해 생존율은 SYBR-14/PI로, 첨체상태 분석은 CTC로 형광염색하여 각각 1, 3, 5, 7 및 10일에 분석하였다. 정액의 지질 과산화에 콜레스테롤과 혈청이 미치는 영향을 알아보기 위해 10 μM의 H_2O_2을 처리한 후 정자의 지질 과산화 정도를 C_{11}-BODIPY$^{581/591}$로 형광 염색하여 형광 세기를 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 혈청 알부민 처리군에 비해 CLC를 이용한 콜레스테롤 첨가 처리군이 지질산화 정도가 낮게 나타났다. 또한 보존 일수별 정자의 생존율과 첨체 손상의 정도를 분석한 결과 CLC를 이용한 콜레스테롤첨가 처리군이 7일과 10일에 유의적으로($p<0.05$) 높은 생존율과 유의적으로($p<0.05$) 낮은 첨체 손상율을 나타냈다. 그러므로 미니돼지의 정자를 액상 보존 시 콜레스테롤의 첨가는 보존 기간을 늘려줄 수 있으며, 산화스트레스로부터 정자의 막손상을 보호해 줄 것이다. 하지만, 추가적으로 지질 과산화와 cyclodextrin과의 연관성에 대한 연구가 필요하다.

참고문헌

Alvarez JG and Storey BT. 1984. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. Biol. Reprod. 30:833-841.

Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Brèque C, Dobrinski I, Zeng W and Galantino-Homer HL. 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. Theriogenology 70:1251-1259.

Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B and Salvador M. 2010. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. Cryobiology 60:235-237.

Brezezinska-Slebodzinska E, Slebodzinski AB, Pietras B and Wieczorek G. 1995. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. Biol. Trace Elem. Res. 47:69-74.

Brouwers JFHM and Gadella BM. 2003. *In situ* detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm

cells. Free Radic. Biol. Med. 35:1382-1391.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F and Gliozzi TM. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Reproduction 121:395-401.

Chiu PC, Chung MK, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF and Yeung WS. 2005. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol effux and inhibits capacitation of spermatozoa. J. Biol. Chem. 280:25580-25589.

Choi Y-H and Toyoda Y. 1998. Cyclodextrin remove cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein-free medium. Biol. Reprod. 59:1328-1333.

Coyan K, Baspinar N, Bucak MN, Akalin PP, Ataman MB, Omur AD, Gungor S, Kucukgunay S, Ozkalp B and Sariozkan S. 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. Res. Vet. Sci. 89:426-431.

Davis BK, Byrne R and Bedigian K. 1980. Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during *in vitro* incubation of rat sperm cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77:1546-1550.

Dominguez-Rebolledo AE, Fernandez-Santos MR, Bisbal A, Ros-Santaella JL, Ramon M, Carmona M, Martinez-Pastor F and Garde JJ. 2010. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. Reprod. Fertil. Dev. 22:856-860.

Aitken RJ. 1994. A free radical theory of male infertility. Reprod. Fertil. Dev. 6:19-24.

Estienne MJ, Knight JW and Beal WE. 1989. Long-term storage of porcine spermatozoa separated using a discontinuous bovine serum albumin gradient. J. Anim. Sci. 50:535-543.

Fraser LR. 1987. Minimum and maximum extracellular Ca requirements during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J. Reprod. Fert. 81:77-89.

Funahashi H and Sano T. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. Theriogenology 63:1605-1606.

Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E and Kovalski N. 1991. Reactive oxygen species and human spermatozoa. Ann. N.Y. Acad. Sci. 637:436-444.

Go KJ and Wolf DP. 1985. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. Biol. Reprod. 32: 145-153.

Guthrie HD and Welch GR. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. J. Anim. Sci. 84: 2089-2100.

Guthrie HD and Welch GR. 2007. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. J. Anim. Sci. 85:1402-1411.

Hammerstedt RH. 1993. Maintenance of bioenergetics balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. Reprod. Fertil. Dev. 5:675-690.

Hartel S, Diehl HA and Ojeda SF. 1998. Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. Anal. Biochem. 258:277-284.

Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci. 62:3-22.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WM. 2000. Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci. 62:143-172.

Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G and Roberts KD. 1988. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. Gamete Res. 20:185-201.

Lenzi A, Picardo M, Gandini L and Dondero F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Hum. Reprod. Update 2:246-256.

Maxwell WMC and Johnsom LA. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Therogenology 48:209-219.

McGrath JJ. 1988. Membrane transport properties. In: J.J. McGrath, K.R. Diller, eds. Low Temperature Biotechnology: Emerfing Applications and Engineering Contribution. New York, NY: ASME Press, BED-Vol 10, HTD-Vol 98:91-111.

Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN and Boscos CM. 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 112:119-125.

Neagu VR, Garcia BM, Sandoval CS, Rodriguez AM, Ferru-

sola CO, Fernandez LG, Tapia JA and Pena FJ. 2010. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. Theriogenology 73:645-650.

Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J and Kopf GS. 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. Mol. Hum. Reprod. 5:1017-1026.

Purdy PH and Graham JK. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology 48:36-45.

Rogers BJ. 1978. Mammalian sperm capacitation and fertilization *in vitro* : Acritique of morthology. Gamete Res. 1:165-223.

Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G and Atreja SK. 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. Anim. Reprod. Sci. 119: 183-190.

Tuncer PB, Bucak MN, Sariozkan S, Sakin F, Yeni D, Cigerci IH, Atessahin A, Avdatek F, Gundogan M and Buyukleblebici O. 2010. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed angora buck (*Capra hircus ancryrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. Cryobiology 61:89-93.

Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C and Galeati G. 2010. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. Anim. Reprod. Sci. 22:58-65.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG and Kopf GS. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. J. Biol. Chem. 274:3235-3242.

Visconti PE, Olds-Clarke P, Moss SB, Kalab P, Travis AJ, de las Heras M and Kopf GS. 1996. Properties and localization of a tyrosine phosphorylated form of hexokinase in mouse sperm. Mol. Reprod. Dev. 43:82-93.

Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR and Niwa K. 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in protein- free chemically defined medium. J. Reprod. Fertil. 104:305-313.

Weitze KF. 1990. Long-term storage of extended boar semen. In: Johnson LA, Rath D (eds), Proc 2nd Int Conf Boar Semen Preservation, Beltsville, Maryland, USA. Reprod. Dom. Anim. Suppl. 1 pp. 231-253.

Yeagle PL. 1985. Cholesterol and the cell membrane. Biochim. Biophys. Acta. 822:267-287.

Zeng WX and Terada T. 2001. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. J. Androl. 22: 111-118.

(접수: 2011. 2. 24 / 심사: 2011. 2. 25 / 채택: 2011. 3. 2)