

제주흑우 동결정액 제조에 있어 난황 Tris 희석제에 항산화제로서 Taurine, Hypotaurine 그리고 Trehalose의 첨가가 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향

오신애¹ · 고민희¹ · 강태영¹ · 최선호¹ · 고문석¹ · 정영호² · 조원모^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²중부대학교 애완동물자원과학과

Effect of Adding Taurine, Hypotaurine and Trehalose as Antioxidants to a Tris-based Egg Yolk Extender on Korean Jeju Black Bull Sperm Quality Following Cryopreservation

Shin-Ae Oh¹, Min-Hee Ko¹, Tae-Young Kang¹, Sun-Ho Choi¹, Moon-Suck Ko¹, Young-Ho Chung² and Won-Mo Cho^{1*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Odeung-dong San 175-6, Jeju-Do, 690-150, Korea, ²Department of Companion Animal and Animal Resources Science, Joongbu University, Chungcheongnam-Do, 312-702, Korea

ABSTRACT

Cryopreservation induces sublethal damage to the spermatozoa, which leads to their reduced fertile life. The objective of this study was to investigate the effect of taurine, hypotaurine and trehalose as antioxidants on the function of the freezing-thawed sperm in Korean Jeju Black Bull. The semen was cryopreserved with tris egg yolk extender containing 7% glycerol and treated with 20mM taurine, hypotaurine and trehalose. Frozen-thawed sperms were evaluated for sperm motility, viability, membrane integrity, acrosome integrity and sperm penetration ability. The results were compared to semen cryopreserved in tris egg yolk extender containing 7% glycerol only as control. Frozen-thawed semen evaluation clearly indicated that the addition of taurine or hypotaurine significantly improved ($p < 0.05$) the motility and viability compared to control spermatozoa. Moreover, in membrane integrity, swollen sperm ratio was significantly increased ($p < 0.05$) in taurine, hypotaurine or trehalose compared to control. In sperm acrosome integrity, F pattern ratio was increased ($p < 0.05$) in hypotaurine among treatments, and AR pattern was significantly lowered ($p < 0.05$) in taurine, hypotaurine and trehalose. In assessed sperm fertilizing ability, taurine, hypotaurine or trehalose significantly improved ($p < 0.05$) the ratio of pronucleus formation and SFI. Finally, compared with the control, addition of taurine, hypotaurine or trehalose as an antioxidant to the freezing extender showed more positive effects on the frozen-thawed spermatozoa. It is concluded that the addition of taurine, hypotaurine, or trehalose to the freezing extender could reduce cryodamage of the Korean Jeju Black Bull spermatozoa.

(**Key words** : Antioxidant, Taurine, Hypotaurine, Trehalose, Semen freezing, Korean Jeju Black Bull)

서 론

제주흑우는 FAO에 등록되어 있는 한우의 한 품종으로 멸실위험에 처해있는 재래가축으로서 제주에서 그 명맥이 유지되고 있다. 제주흑우는 희소 품종으로 분류되어 있기에 현재 산업적 이용에 있어 활발한 유통은 어렵지만 국내 가축유전자원의 다양성 확보에 있어 매우 중요한 국가적 자원이다. 뿐만 아니라, 최근 국내의 한우 산업이 한미 자유무역협정(FTA) 체결과 같은 개방화의 진전으로

인해 경쟁력이 심화되고 있다. 그로인해 국내산 쇠고기의 가격은 주 수입국인 미국에 비하여 4배 이상 비싸 가격 경쟁력이 미약한 실정으로 국제 경쟁력을 가지고 차별화가 가능한 토종 가축의 육성 및 대량 증식이 시급하다. 이러한 희소한우인 제주 흑우를 보존하고 이용하는 방안으로서는 정액을 이용한 번식과 수정란을 이용한 번식으로 증식이 가능하다. 정액을 이용한 보존은 수정란을 이용한 보존에 비하여 취급이 용이하고 안정적이므로 수정란에 비해 손쉽게 보존이 가능하다.

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임

* Corresponding author : Won-Mo Cho, Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Odeung-dong San 175-6, Jeju-Do, 690-150, Korea. Tel: (064) 754-5716, Fax: (064) 754-5713, E-mail: cwmo3451@rda.go.kr

인공수정을 위한 정액의 이용 방법에는 액상정액의 이용과 동결 정액으로 보존하는 방법이 있는데, 채취한 정액을 동결하여 -196 °C에서 보존하면 반영구적으로 보관이 가능하다 (Bolten 등, 2005). 그러나 현재 제주흑우 정액의 채취와 동결 보존에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이며, 최적 조건을 확립하는 것은 매우 까다로운 일이다. 특히 동결 후 정자는 손상을 입게 되어 동결 용해 후 초기 수정능획득이 증가하게 된다. 이러한 현상은 정자의 운동성 저하 뿐만 아니라 정자의 수명 감소, 자성 생식기도와의 상호작용 및 정자의 수정능력에도 영향을 미친다고 보고하였다 (Medeiros 등, 2002). 동결 용해 과정은 또한 활성산소 (reactive oxygen species; ROS)의 증가를 야기시킨다. 동결과정동안 발생된 잉여 ROS는 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존성, 정자막 온전성, 수정 능력 및 정자의 기능을 저하시킨다 (Aitken 등, 1998; Bilodeau 등, 2000).

Tris egg yolk 희석제는 일반적으로 소의 동결 정액 제조시 널리 사용되고 있는 희석제이다 (Purdy, 2006). 최근 소 (Uysal 등, 2007; Sariozkan 등, 2009), 돼지 (Funahashi와 Sano, 2005; Hu 등, 2009), 양 (Bucak 등, 2007) 그리고 개 (Martins-Bessa 등, 2009; Michael 등, 2007)의 동결정액 제조에 있어 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose와 같은 항산화물질을 동결보호제와 함께 첨가하여 동결 용해 후 정자의 성상을 개선한 바를 보고하였다. Taurine과 hypotaurine은 sulfonic amino acid로서 정자의 plasma membrane 전체에 걸쳐 항산화 역할을 수행하며, ROS에 대항하여 정자의 과산화지질화를 억제하여 세포를 보호하는 역할을 수행한다 (Chen 등, 1993; Foote 등, 2002). Trehalose는 비환원성 이당류 (non reduction disaccharide)로 삼투압의 영향으로부터 세포를 보호하는 역할을 수행하며 세포막의 인지질안에서 특이한 상호작용을 형성, 고장액의 용출 및 빙상결정화에 의한 세포손상을 감소 시키는 역할을 수행한다 (Anchordoguy 등, 1987; Liu 등, 1998; Molinia 등, 1994; Storey 등, 1998).

따라서 본 연구에서는 제주흑우의 유전자원 보존뿐만 아니라 토종 가축의 육성 및 대량 증식을 위한 안정적인 동결정액 제조법을 수립하기 위하여 제주흑우의 동결정액 제조시 항산화제로서 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가가 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존율, 정자막 온전성, 침체막 온전성 및 정자의 난자내 침투 능력에 미치는 영향에 대하여 연구하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 제주흑우 정액 채취

정액채취에 이용된 흑우는 3세 이상의 수컷 6두를 선발하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 월 4회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질 (Model 66000-D, Nasco, FHK, 일본)을 사용하여 채취하였다. 정액 채취를 위하여 암컷을 안전하게 정액 채취실 보정틀에 고정시킨 후, 제주흑우 수컷을 2~3회 암컷의 주

위를 땀뭇게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 penis 를 인공질에 삽입하여 정액을 채취하였다. 인공질의 온도는 38 °C를 유지하였으며, 인공질에는 penis의 삽입을 원활하게 하기 위하여 젤을 도포하였다. 인공질 끝 부분에 15 ml tube를 채취 전에 장착하여 사출된 정액을 회수하였다. 회수된 정액은 37 °C 온수고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다.

2. 정액의 처리 및 제조

본 실험에 이용된 보존액의 조성은 Table 1과 같으며, 대조군으로서 7%의 glycerol을 동결보호제로 사용하였으며 실험군으로 7%의 glycerol이 포함된 희석제에 20 mM의 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose를 첨가하였다. 채취된 정액은 즉시 실험실로 운반하고, 원정액을 Tris-Egg yolk extender과 1:1로 희석하여 냉각을 시작하여 5단계를 거쳐 총 2시간동안 냉각시켰다. 마지막 희석 후, 동결보호제가 첨가된 희석액을 첨가하여 2시간동안 평형을 유도하였으며, 평형이 완료된 정자는 50×10^6 /ml로 농도를 조절하여 0.5 ml straw에 충전 봉합하였다. 충전된 straw는 액체질소 표면 5 cm 높이에서 10분간 노출시켜 예비동결을 실시한 후에 액체질소에 침지하여 동결을 완료하였다. 동결된 정액은 LN₂ tank에서 보관하였으며 필요 시 용해하여 사용하였다. 동결정액은 공기중에서 약 10 초간 정지하여 37 °C 온수에 20초간 침지시켜 용해한 후 정자의 생존율 및 정자 양상을 조사하였다.

Table 1. Composition of Tris-egg yolk extender

Component	Concentration
Tris	121.1 mM
Fructose	180.2 mM
Citric acid	294.1 mM
Egg yolk	10%
Glycerol	7%
Streptomycin sulfate	10 mg/ml

3. 정자의 운동성 평가

정액의 운동성 평가는 MicroLux 현미경 (X 70, Olympus, Japan)하에서 정자의 활력을 평가하였다. 혈구계산판에 5 µl의 정액을 놓고 cover glass로 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하였다. 혈구계산판의 격자 2군데를 반복적으로 관찰하여 거의 모든 정자들이 소용돌이 치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들을 격자 별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80개 이상일 때 80%로, 70개 이상일 때 70%로 판단하고 움직이는 정도가 전진 운동 또는 느리게 전진 운동하는 수준일 때 50%, 느리게 전진운동 하거나 진자 운동 혹은 미동하는 수준일 때 30%로 평가하였다.

4. 정자의 생존율 평가

정자의 생존성은 Eosin-Y 염색법을 이용하여 생존율을 평가하였다. 0.9% NaCl 용액에 0.5% Eosin-Y를 용해한 후 10 µl의 정액을 slide glass 위에 올린 다음 동량의 염색액을 섞어 도말하여 cover glass를 덮고 MicroLux 현미경(X 70, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다. 100 배율에서 염색 상태를 관찰하여 표본 1개당 200개의 정자를 카운트하였으며, 붉게 염색된 죽은 정자의 비율을 계산하여 개체 당 2개의 표본을 만들어 총 400개의 정자를 카운트, 생존율을 평가하였다.

5. 정자막 온전성 평가

정자막 온전성을 측정하기 위하여 Jeyendran 등(1984)의 방법을 변형하여 저삼투압 용액을 이용한 정자 미부의 팽창형태를 분석하였다(Hypo-Osmotic Swelling Test: HOST). 37°C의 저장액(150 mOsm/kg, 0.45% NaCl 용액) 1 ml에 정자 샘플 100 µl를 혼합하여 37°C에서 5분간 정치시킨 후 slide glass에 도말하였다. 도말한 표본은 개체당 2개의 slide를 만들어 표본당 200개의 정자를 카운트하여 정자막의 온전성을 평가하였다.

6. 침체막 변화 양상의 측정

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 Chlortetracyclin (CTC) 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 침체막 변화 양상을 조사하였다. 정액을 400 Xg에서 2분간 원심분리하여 세척한 다음 500µl의 CTC 용액(750 µM CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cystein in 20 mM Tris buffer; pH 7.8)을 혼합하여 20초간 암실에서 상온배양 하였다. CTC 반응을 고정시키기 위하여 10 µl의 12.5% glutaraldehyde를 혼합하여 4°C에서 보관하였다. 염색후 24시간 이내에 판독하였으며, 정자 침체막 양상의 판독 기준은 Fraser (1995)의 분류를 따라 정자 두부가 전체적으로 형광 발광을 할 경우 수정능획득이 일어나지 않은 F pattern으로, 적도면 부분에 띠가 형성되어 침체 아랫부분에서 형광 발광을 할 경우 수정능획득이 일어난 B pattern으로 구분하였으며, 마지막으로 정자 두부가 형광 발광을 하지 않거나, 얼룩덜룩한 발광을 할 경우 침체반응이 일어난 AR pattern으로 구분하였다.

7. 정자의 난자내 침투 능력 평가

10주~15주령 사이의 햄스터에 PMSG 30 IU를 복강내 주사하고 48시간 후 hCG 30 IU를 복강 주사하여 배란을 유도하였다. hCG 주사 15시간 후 개복하여 난관을 채취하여 난관내 배란된 난자를 회수하였다. 회수된 난자는 0.1% hyaluronidase를 이용하여 난구 세포를 제거한 다음 0.1% trypsin을 처리하여 투명대를 제거하였다.

동결 용해된 정자를 PBS를 이용하여 400 gX, 2회 원심분리하여 동결보존액을 제거한 다음, 10 µg/ml의 heparin이 포함된 TALP 배양액을 이용하여 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 수정능획득을 유도하였다. 수정능획득이 유도된 정자는 2 × 10⁵ live sperm/ml로 농도를 조절하여 투명대가 제거된 햄스터 난자와 3.5시간동안 공배양하였다. 3.5시간 후 공배양 된 난자를 2~3회 세척하여 slide glass위에 올려 mounting 한 다음 methanol : acetic acid (3:1, v/v) 용액에서 24시간동안 고정시켰다. 고정된 난자는 1% lacmoid를 이용하여 염색한 후 위상차 현미경을 이용하여 침투된 정자의 변화를 관찰하였다 (X 400 magnification).

정자의 난자내 침투 능력의 평가는 Oh 등의 방법(2010)을 이용하여 계산하였다.

8. 통계 분석

통계 분석은 통계분석프로그램(SPSS version 18.0)을 이용하였으며, 항산화제의 첨가가 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향에 대한 결과는 ANOVA를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 항산화제가 정자의 운동성과 생존율에 미치는 영향

제주후우 정액의 동결정액 제조시 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가가 정자의 운동성 및 생존율에 미치는 영향은 Table 2와 같다. Taurine과 hypotaurine을 첨가하여 동결정액을 제조하였을 때 다른 실험구보다 유의적으로 높은 운동성과 생존율을 나타냈다(p<0.05).

Table 2. Effect of taurine, hypotaurine and trehalose on motility and viability of frozen-thawed sperm

	Motility (%)	Viability (%)
Control	64.00 ± 7.42 ^c	58.25 ± 6.03 ^c
Taurine	69.00 ± 5.12 ^b	63.80 ± 7.50 ^b
Hypotaurine	75.00 ± 4.47 ^a	71.55 ± 5.09 ^a
Trehalose	65.00 ± 4.47 ^c	59.15 ± 6.09 ^c

^{a, b, c} Values with different superscripts within same column are significantly different by ANOVA (p<0.05). Data are presented as mean ± SD.

2. 항산화제가 정자막 온전성에 미치는 영향

정자의 운동성 및 생존율의 결과와 마찬가지로 taurine과 hypotaurine을 첨가한 실험구에서 유의적으로 높은(p<0.05) 정자막 온전성을 나타냈다(Table 3). Trehalose의 첨가는 운동성과 생

Table 3. Effect of taurine, hypotaurine and trehalose on sperm membrane integrity of frozen-thawed sperm

	swollen sperm (%)
Control	51.90 ± 9.99 ^c
Taurine	60.50 ± 6.86 ^b
Hypotaurine	68.70 ± 6.04 ^a
Trehalose	57.95 ± 9.28 ^b

^{a, b, c} Values with different superscripts within same column are significantly different by ANOVA (p<0.05). Data are presented as mean ± SD.

존율이 대조구와 유의적 차이를 보이지 않은 반면에 정자막 온전성에 있어서는 대조구에 비하여 유의적으로 높은 결과를 나타냈다 (p<0.05).

3. 항산화제가 정자의 침체막 변화 양상에 미치는 영향

Fig. 1에서 볼 수 있듯이 제주흑우 동결정액 제조에 있어 hypotaurine은 F pattern의 비율을 유의적으로 높게 유지시키는 것으로 나타났다(p<0.05). 뿐만 아니라 hypotaurine의 첨가는 AR pattern의 비율도 다른 실험구에 비하여 유의적으로 낮게 나타남을 볼 수 있다(p<0.05). Taurine과 trehalose의 첨가는 F pattern과 B pattern 모두 대조구와 비슷한 수준의 비율을 나타내었으나, AR pattern의 비율에 있어서 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 수준을 나타냈다(p<0.05).

4. 항산화제가 정자의 난자내 침투 능력에 미치는 영향

Table 4는 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose가 정자의 난자내 침투 능력에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. Taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가는 대조구에 비하여 유의적으로 높은 정자의 PN 형성과 SIF를 나타냈다(p<0.05). 특히 hypotaurine은 taurine과 trehalose에 비하여 높은 침투율을 나타냈으나, 이들 사이의 유의적 차이는 보이지 않았다.

Table 4. Effect of taurine, hypotaurine and trehalose on sperm penetration ability using zona-free hamster oocytes

	PN	DC	EN	SFI
Control	0.4 ± 0.55 ^b	1.0 ± 0.71	1.8 ± 9.99	0.36 ± 0.13 ^b
Taurine	1.2 ± 0.45 ^a	1.8 ± 0.45	2.0 ± 6.86	0.62 ± 0.08 ^a
Hypotaurine	1.6 ± 0.55 ^a	1.8 ± 0.84	2.2 ± 6.04	0.72 ± 0.08 ^a
Trehalose	1.2 ± 0.45 ^a	1.6 ± 0.55	2.0 ± 9.28	0.60 ± 0.19 ^a

PN: Pronucleus, DC: Decondensed sperm, EN: Enlarged sperm and SFI: Sperm fertility index. SFI= (PN × 2 + DC + EN) / No. of oocytes. SFI was calculated by method of Oh et al. (2010).

^{a, b} Values with different superscripts within same column are significantly different by ANOVA (p<0.05). Data are presented as mean ± SD.

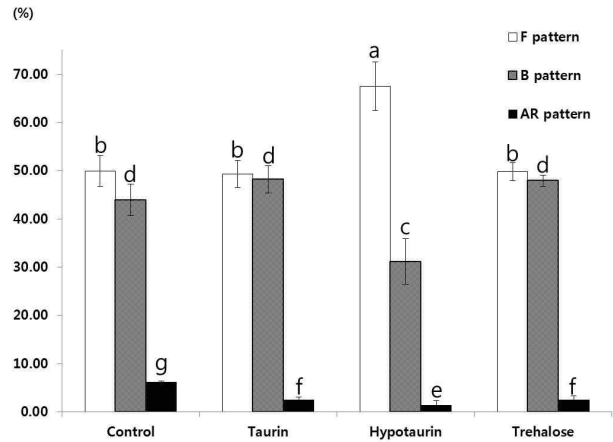


Fig. 1. Effect of taurine, hypotaurine and trehalose on capacitation status of frozen-thawed sperm.

^{a, b} F pattern values for various cryoprotectants with different superscripts were significantly different by ANOVA (p<0.05).

^{c, d} B pattern values for various cryoprotectants with different superscripts were significantly different by ANOVA (p<0.05).

^{e, f, g} AR pattern values for various cryoprotectants with different superscripts were significantly different by ANOVA (p<0.05).

고찰

본 연구는 제주흑우 정액의 동결정액 제조시 동결보존액에 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose를 첨가하여 제주흑우 동결 정액의 운동성, 생존성, 정자막 온전성, 침체막 변화 양상 그리고 정자의 난자내 침투 능력을 개선하고자 수행하였다. 현재 사용되고 있는 동결정액 제조 방법은 성공적인 상업적 이용이 되고 있으나, 정자는 동결 용해 과정 동안에 큰 손상을 입게 되며 (Liu 등, 2004; Aisen 등, 2005; Gillan 등, 1997), 이러한 손상은 인공수 정 후 정자의 운동성과 수정능력을 감소시키게 된다. 정자세포의 막은 고도로 농축된 불포화지방산을 함유하고 있으며, O₂⁻ 또는 OH⁻에 의하여 과산화지방으로 변할 수 있다 (Alvarez와 Storey, 1989; Storey, 1997). 이들 O₂⁻와 OH⁻는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)로서, 정자의 동결과정에서 발생하여 정자막을 과산화지방화 시켜 손상을 주게 된다. ROS에 의해 손상된 정

자는 용해 후 운동성 및 생존율이 감소하게 된다(Maxwell과 Watson, 1996). ROS에 의해 유도된 정자의 손상은 정자막 인지질의 bis-allylic methylene group을 과산화인지질화 시키게된다(Yanagimach, 1994; Irvine, 1996; Upreti 등, 1998; Chatterjee 등, 2001). 이러한 현상은 정자막에 화학적인 oxidative stress를 주게 되며, 정자 구조에 돌이킬 수 없는 손상을 주어 정자막 유동성 및 정자의 효소적 활성의 변화를 야기시켜 정자의 운동성, 생존율 및 수정능력과 관련된 기능을 저하시킨다(Aitken 등, 1989, 1998; de Lamirande와 Gagnon, 1992). 게다가 정액의 동결시 온도의 감소가 정자의 ROS 발생을 유의적으로 야기하며, 이러한 ROS는 정자의 기능을 저하시킨다(Aitken 등, 1989, 1998; Alvarez와 Storey, 1989; Aitken 등, 1993).

최근 정자의 동결 용해 후 기능을 개선시키고자 동결 정액 제조 시 taurine, hypotaurine 및 trehalose 등 항산화제를 첨가하여 이들의 역할에 관한 연구가 진행되고 있다(Bucak 등, 2007; Hu 등, 2009; Sariozkan 등, 2009). Taurine은 sulfonic amino acid로써 정자가 산소가 공급되는 조건에 노출되거나 동결 용해 과정동안에 ROS로부터 정자를 보호하는 역할을 하는 비효소적 물질이다(Alvarez와 Storey, 1983; Chen 등, 1993). Hypotaurine은 포유류의 정자 안에 존재하는 taurine의 전구물질로서 정자의 수정능획득, 운동성, 수정능력 그리고 조기 배아발달에 있어 필수적 물질로 알려져 있다(Meizel 등, 1980; Boatman 등, 1990). Hypotaurine은 정자의 동결 과정동안에 정자의 운동성, 형태 그리고 기능적인 정자막 온전성을 개선시키는 역할을 수행하며(Meizel 등, 1980; Boatman 등, 1990), trehalose는 비환원성 이당류로 정자의 plasma membrane 안에서 인지질과의 상호작용을 통해 정자막 유동성을 증가시켜 동결 용해의 손상에 대한 정자의 저항성을 증가시킨다(Aboagla와 Terada, 2003). Hypotaurine은 토끼(Alvarez와 Storey, 1983), 햄스터(Boatman 등, 1990) 그리고 사람(Donnely 등, 2000)에 있어서 hypotaurine의 존재가 액상 저장 상태에서 정자의 운동성을 개선시킨다고 보고된 바 있으며, 동결보호제에 taurine의 첨가는 bufflao 정자의 동결 용해 후 운동성과 생존성을 개선시킨다고 보고되었다(Shiva Shankar Reddy 등, 2010). 그러나 trehalose는 소의 동결 정액 제조에 있어 동결 용해 후 정자의 정상 개선에 유의적인 영향을 끼치지 않는다고 보고된 바 있다(Chen 등, 1993; Foote 등, 1993). 이와같은 보고들은 본 연구의 taurine과 hypotaurine을 첨가한 실험구에서 모두 대조구와 비교하여 운동성 및 생존성이 유의적으로 ($p < 0.05$) 높게 나타났지만 trehalose의 첨가는 유의적 차이가 나타나지 않은 결과와 일치한다(Table 2). HOST를 통한 정자막 온전성 검사에 있어서는 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가가 대조구에 비하여 유의적으로 높게 ($p < 0.05$) 나타났다(Table 3). 이러한 결과는 Bucak 등(2009)의 산양 정액의 동결시 hypotaurine을 첨가가 정자막 온전성을 증가 시키고, Shiva Shankar Reddy(2010)의 buffalo 정액의 동결시 taurine의 첨가가 정자막 온전성을 증가시켰다는 보고와 부합한다. 또한 Aisen 등(2000)은 양 정자의 동결

용해에 있어 trehalose가 정자 막의 손상을 유의적으로 감소시킨다고 하였으며, 본 연구에서도 trehalose는 대조구에 비하여 유의적으로 높은 정자막 온전성을 나타냈다.

수정능획득은 정자가 난자와 결합하여 수정을 하기 위해 반드시 선행되어야 할 필요 조건이지만, 수정능획득이 된 정자는 hyperactivated motility를 가지며 직선운동보다 활기찬 운동 양상을 보이고 침체반응이 일어나게 되는데 사실상 이러한 현상은 정자세포가 죽음에 이르는 과정이다(Harrison 등, 1996). 냉각기간 동안 세포막은 변성을 겪게 되며 막 단백질의 파괴가 일어나 세포막의 인지질로부터 탈락하게 되어 인지질은 fluid에서 gel phase로 변화하게 된다. 이러한 막의 변화는 calcium ion channel의 기능적 손상을 초래하며, 결과적으로 세포 내 Ca^{2+} 농도의 상승을 야기하여 수정능획득이나 침체반응과 같은 기작을 보이게 된다(Szasz 등, 2000; Pena 등, 2003). 따라서 동결 용해 후 수정능획득 유사 변화 과정을 거친 수정능획득 유사 상태 정자 비율이 사출 시 보다 약 25% 정도 높게 나타난다(Pena 등, 2003). 이처럼 동결로 인해 수정능획득 유사 상태 정자의 증가는 정자의 수정능력을 감소시킨다(Bailey 등, 2000). Bufflo의 동결 정액 제조에 있어 taurine의 첨가(Shiva Shankar Reddy 등, 2010), 양에서 hypotaurine의 첨가(Bucak 등, 2009) 그리고 돼지에 있어 trehalose의 첨가(Hu 등, 2009)는 동결로 인해 발생하는 capacitation-like state의 정자 비율을 감소시키는데 영향을 준다고 보고하였다. 본 연구의 결과 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가가 동결 용해 후 조기 침체반응의 발생을 감소시켜 AR pattern의 비율이 대조구에 비하여 유의적으로 감소하였으나($p < 0.05$), 수정능획득을 나타내는 B pattern의 비율은 hypotaurine에서만 유의적으로 감소하였으며($p < 0.05$), 또한 수정능획득 반응이 나타나지 않은 F pattern의 비율도 hypotaurine 첨가에서만 유의적으로 높은 결과($p < 0.05$)를 나타냈다(Fig. 1). 이러한 결과는 항산화제로서 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가가 동결 용해 후 정자를 보호하여 동결로 인해 발생한 수정능획득 상태의 정자를 보호하여 조기 침체 반응을 방지하는 것으로 판단된다.

이러한 정자의 운동성, 생존성, 정자막 온전성, 수정능획득 양상의 검사들은 모두 정자의 수정능력획득을 판단하기 위해 없어서는 안될 요소들이다. 투명대를 제거한 햄스터 난자를 이용한 정자의 난자내 침투 능력 검사는 이미 오래전부터 시행되어온 방법으로 정자의 수정능력을 평가하는데 매우 효과적이다(Eaglesome과 Garcia, 1990). 본 연구에서는 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose를 첨가한 모든 실험구에서 대조구보다 유의적으로 높은 ($p < 0.05$) 옹성 전핵 형성율과 SFI를 나타냈다(Table 4). 이러한 결과는 앞서 설명된 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose가 정자의 동결 과정에서 발생하는 세포의 손상으로부터 정자를 보호하여 정자의 운동성, 생존성, 정자막 온전성, 침체막 온전성을 개선시키고, 최종적으로 정자의 수정능력을 보호한다는 보고들과 일치한다. 본 연구의 결과 제주흑우의 동결 정액 제조에 있어 항산화제로서 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 첨가는 동결 용해 과정에서 발생하는 손상으로

부터 정자를 보호하여 정자의 운동성, 생존성, 정자막 온전성, 첨체막 온전성 및 수정능력을 유의적으로 개선시킴을 보여주고 있다.

요 약

제주흑우의 동결 정액 제조시 동결 보존액에 첨가한 taurine과 hypotaurine은 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존성 그리고 정자막 온전성을 개선시키는 것을 알 수 있었다. Taurine과 hypotaurine의 첨가는 유의적으로 높은 운동성, 생존성을 보였으며 ($p<0.05$), 특히 hypotaurine은 다른 실험구에 비하여 유의적으로 높은 정자막 온전성을 나타냈다 ($p<0.05$). 뿐만 아니라, hypotaurine은 유의적으로 높은 F pattern 비율을 유지하였으며 ($p<0.05$), 이들 항산화물질을 첨가한 실험구에서는 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 AR pattern을 나타내어 ($p<0.05$) 동결로 기인된 수정능 획득 유사 상태 정자의 비율을 유의적으로 감소시켜 조기 첨체반응 비율을 감소시켰다. 정자의 난자내 침투능력이 있어서 모든 처리구에서 대조구보다 높은 응성전핵 형성율과 SFI를 나타냈으며, hypotaurine의 처리는 가장 높은 침투능력을 나타냈으나 처리구간의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 본 연구결과는 멸실위험의 토종가축 생식세포 및 유전자원 보존과 토종가축 육성을 위한 번식 증대를 위한 제주흑우 동결정액 제조에 중요한 이용 방법이 될 것이며, 동결 용해 후 정자의 기능 개선을 위한 다양한 희석제 및 첨가제를 활용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

(주제어: 제주흑우, 동결정액, 항산화제)

사 사

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연수과 정지원사업에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

- Aboagla, E. M. and Terada, T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69:1245-1250.
- Aisen, E. G., Alvarez, H. L., Venturino, A. and Garde, J. J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53:1053-1061.
- Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H. and Venturino, A. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50:239-249.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. and Fishel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.* 41:183-197.
- Aitken, R. J., Buckingham, D. and Harkiss, D. 1993. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 97:441-450.
- Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z. and Irvine, D. S. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59:1037-1046.
- Alvarez, J. G. and Storey, B. T. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29:548-555.
- Alvarez, J. G. and Storey, B. T. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete. Res.* 23:77-90.
- Anchordoguy, T. J., Rudolph, A. S., Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24:324-331.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F. and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21:1-7.
- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A. and Gagnon, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55:282-288.
- Boatman, D. E., Bavister, B. D. and Cruz, E. 1990. Addition of hypotaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. *J. Androl.* 11:66-72.
- Bolten, M., Weissbach, L. and Kaden, R. 2005. Cryopreserved human sperm deposits: Usability after decades of storage. *Urologe A* 44:904-908
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varişli, O., Yüce, A., Tekin, N. and Akçay, A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67: 1060-1067.
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariozkan, S., Ulutaş, P. A., Coyan, K., Başpınar, N. and Ozkalp, B. 2009. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Res. Vet. Sci.* 87:468-472.
- Chatterjee, S., de Lamirande, E. and Gagnon, C. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.* 60:498-506.
- Chen, Y., Foote, R. H., Tobback, C., Zhang, L. and Hough, S. 1993. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates

- in egg yolk-tris and whole milk extenders. Dairy. Sci. 76:1028-1034.
- Donnelly, E. T., McClure, N. and Lewis, S. E. 2000. Glutathione and hypotaurine *in vitro*: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis 15:61-68.
- Eaglesome, M. D. and Garcia, M. M. 1990. The effect of Mycoplasma bovis on fertilization processes *in vitro* with bull spermatozoa and zona-free hamster oocytes. Vet. Microbiol. 21:329-337.
- Foote, R.H., Chen Y., Brockett C. C. and Kaproth, M. T. 1993. Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. J. Dairy. Sci. 76:1908-1913.
- Foote, R. H., Brockett, C. C. and Kaproth, M. T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Anim. Reprod. Sci. 71:13-23.
- Fraser, L. R., Abeydeera, L. R. and Niwa, K. 1995. Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosome alexocytosis as determined by chlortetracycline analysis. Mol. Reprod. Dev. 40:233-241.
- Funahashi, H. and Sano, T. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. Theriogenology 63:1605-1616.
- Gillan, L., Evans, G. and Maxwell, W. M. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev. 9:481-487.
- Harrison, R. A. P., Ashworth, P. J. C. and Miller, N. G. A. 1996. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. Mol. Reprod. Dev. 45:378-391.
- Hu, J. H., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Yang, H., Zhang, S. S. and Zhao, H. W. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. Reprod. Domest. Anim. 44:571-575.
- Irvine, D. S. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. Rev. Reprod. 1:6-12.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven. H. H., Prez-Pelaez, M., Carbo, B. G. and Zaneveld, L. J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. 70:219-228.
- de Lamirande, E. and Gagnon, C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J. Androl. 13:379-386.
- Liu, J. L., Kusakabe, H., Chang, C. C., Suzuki, H., Schmidt, D. W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C. L., Tian, X. C., Yanagimachi, R. and Yang, X. 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. Biol. Reprod. 70:1776-1781.
- Liu, Z., Foote, R. H. and Brockett, C. C. 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology 37:219-330.
- Martins-Bessa, A., Rocha, A. and Mayenco-Aguirre, A. 2009. Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. Theriogenology 71:248-253.
- Maxwell, W. M. C. and Watson, P. F. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 42:55-65.
- Medeiros, C. M., Forell, F., Oliveira, A. T. and Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology 57:327-344.
- Meizel, S., Lui, C. W., Working, P. K. and Mrsny, R. J. 1980. Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive track fluids of several mammals. Dev. Growth Differ. 22:483-494.
- Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P. and Boscos, C. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. Theriogenology 68:204-212.
- Molinia, F. C., Evans, G., Quintana Casares, P. I. and Maxwell, W. M. C. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 36:113-122.
- Oh, S. A., You, Y. A., Park, Y. J. and Pang, M. G. 2010. The sperm penetration assay predicts the litter size in pigs. Int. J. Androl. 33:604-612.
- Pena, A. I., López-Lugilde, L., Barrio, M., Becerra, J. J., Quintela, L. A. and Herradon, P. G. 2003. Studies on the intracellular Ca²⁺ concentration of thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. Reprod. Domest. Anim. 38:27-35.
- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rum. Res. 6:215-225.
- Sariozkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutas, P. A. and Bilgen, A. 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology 58:134-138.
- Shiva Shankar Reddy, N., Jagan Mohanarao, G. and Atreya, S. K. 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.
- Storey, B. T. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3:203-213.
- Storey, B. T., Noiles, E. E. and Thompson, K. A. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37:46-58.
- Szasz, F., Sirivaidyapong, S. M., Cheng, F. P., Voorhout, W. F., Marks, A., Colenbrander, B., Solti, L. and Gadella, B. M. 2000. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol. Reprod. Dev.* 55:289-298.
- Upreti, G. C., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D. M., Vishwanath, R. and Smith, J. F. 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim. Reprod. Sci.* 51:275-287.
- Uysal, O., Bucak, M. N., Yavas, I. and Varush, O. 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *J. Anim. Vet. Adv.* 6:1362-1366.
- Yanagimach, R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E. (Ed.). *The physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, U. S. A. PP. 189-317.

(Received Jul. 10, 2012; Revised Aug. 22, 2012; Accepted Aug. 24, 2012)