大韓不妊學會誌: 第29卷 第2號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 2, 2002, 6

소 정자에 있어서 활성산소계가 정자 기능과 지방산화 및 DNA 절편화에 미치는 영향

중앙대학교 동물자원과학과[1], 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소[2],
의과대학 산부인과학교실[3]

류범용[1,2] · 정영채[1] · 김창근[1] · 신현아[1] · 한정호[2]
방명걸[2] · 오선경[2] · 김석현[2,3] · 문신용[2,3]

Effects of Reactive Oxygen Species on Sperm Function, Lipid Peroxidation and DNA Fragmentation in Bovine Spermatozoa

Buom-Yong Ryu[1,2], Yung-Chai Chung[1], Chang-Keun Kim[1], Hyun-A Shin[1], Jung-Ho Han[2], Myung-Geol Pang[2], Sun-Kyung Oh[2], Seok-Hyun Kim[2,3], Shin-Yong Moon[2,3]

Department of Animal Science & Technology Chung-Ang University[1], Ansung, Korea, Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center[2], Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine[3], Seoul National University, Seoul, Korea

Objective: To evaluate the effects of the reactive oxygen species (ROS) generated with a xanthine (X) and xanthine oxidase (XO) system on sperm function, the change of sperm characteristics, lipid peroxidation, and DNA fragmentation in bovine spermatozoa.

Materials and Methods: ROS were produced using a combination of 1000 uM X and 50 mU/ml XO. The ROS scavengers: superoxide dismutase (SOD) (200 U/ml) and catalase (500 U/ml) were also tested. Spermatozoa were incubated for 2 hours in BWW medium with a combination of X-XO supplemented with or without ROS scavengers at 37℃ under 5% CO_2 incubator. Sperm movement characteristics by CASA (computer-aided sperm analysis), HOST (hypoosmotic swelling test), Ca-ionophore induced acrosome reaction, malondialdehyde formation for the analysis of lipid peroxidation, the percentage of DNA fragmentation using the method of TdT-mediated nick end labelling (TUNEL) by flow cytometry were determined after 2 hours incubation.

Results: The action of ROS on bovine spermatozoa resulted in a decreased in capacity for sperm motility, Ca-ionophore induced acrosome reaction and membrane integrity, an increased in malondialdehyde formation and the percentage of sperm with DNA fragmentation. In the effects of antioxidant, catalase completely alleviated the toxic effects induced by the ROS in terms of sperm function and characteristics, however SOD exhibited no capacity to reduce the toxic effects.

Conclusion: The ROS can induce significant damages to sperm functions and characteristics. The useful ROS scavengers can minimized the defects of sperm function and various damages of spermatozoa.

Key Words: ROS, Sperm function, Lipid peroxidation, DNA fragmentation, Catalase, SOD

주관책임자: **문신용**, 우) 110-744 **서울특별시 종로구 연건동** 28, **서울대학교 의과대학 산부인과학교실**
Tel: (02) 760-2384, Fax: (02) 3672-7601, e-mail: shmoon@plaza.snu.ac.kr

활성산소계 (reactive oxygen species; ROS)가 여러 가지 질병 발생과 세포 노화에 영향을 미친다는 것은 과거부터 잘 알려진 사실이다. 모든 호기성 (aerobic) 세포들은 세포 내에서 산소대사가 이루어지며, 이 과정 중에 자연적으로 ROS가 생성된다. 따라서 이들 세포들이 산소대사를 유지하는 동안 ROS에 노출되는 것은 피할 수 없는 상황이다. 생체 내에서는 형성되는 위치와 산소압에 따라 superoxide anions ($\cdot O_2^-$), peroxyl radical (ROO$\cdot$) hydroxyl radicals ($\cdot$OH), hydrogen peroxide (H_2O_2), 불안정 산화지방과 같은 다양한 종류의 ROS가 생성된다.

ROS가 세포에 악영향을 미치는 기전 중의 하나는 불포화 지방산의 산화 (lipid peroxidation; LPO)를 고려할 수 있다. 포유동물의 정자는 원형질막 (plasma membrane)에 불포화 지방산이 풍부한 반면, 정자 세포 내에 ROS의 작용을 완화시킬 수 있는 효소가 부족하기 때문에 ROS의 영향에 매우 민감하게 반응한다.[1]

정액 내에 존재하는 ROS는 정자 자체나 백혈구로부터 유래되는 것으로 알려지고 있다. 적절한 농도의 ROS는 수정능력에 영향을 미치는 signal transduction 기작의 매개체로서 중요한 역할을 수행한다. 정상적인 상태에서 ROS는 정자의 고활력 운동 (hyperactivation)을 조절하고 phospholipase A2를 활성화하여 수정능 획득이나 첨체반응과 같은 정자 기능에 유익한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.[2~4] 정액 내에는 생성된 ROS를 완화시킬 수 있는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소가 존재하고 있다. 그러나 어떤 이상으로 인하여 정액 내에 ROS의 농도가 증가할 경우에는 정자의 운동성과 구조적인 안정성 및 생존성이 저하되는 심각한 악영향이 초래된다.[5] 또한 과도하게 생성된 ROS는 ATP 고갈로 인하여 정자의 axoneme의 손상,[6] mitochondria 기능 저하, DNA, RNA 및 단백질 합성의 저해,[7] 세포 골격 (cytoskeleton)의 변화,[8] 정자와 난자의 융합 저해[9] 등과 같은 다양한 현상에 악영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

본 연구는 ROS가 소 정자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 xanthine (X)-xanthine oxidase (XO)를 이용하여 인위적으로 발생된 ROS가 정자 기능, LPO 및 정자의 DNA fragmentation에 미치는 영향과 항산화제의 처리 효과를 구명하기 위하여 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 축협중앙회 개량사업본부 젖소개량부에서 Holstein 종모우로부터 제조된 0.5 ml straw의 동결정액을 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 기본 배양액

본 연구에서는 20 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethane sulphonic acid (HEPES; Sigma, USA), 20 mM $NaHCO_3$ (Sigma, USA)와 0.1% polyvinyl alcohol (PVA; Sigma, USA)이 첨가된 Biggers Witten Whittingham (BWW) 배양액[10]을 전체 연구의 기본 배양액으로 사용하였다.

2) 정액 처리

본 연구 전반에 걸친 기본적인 정액 처리 방법은 다음과 같다.

소 동결정액의 융해는 37℃ 수조에서 20초간 실시하였으며, 융해 후 5 ml의 기본 배양액으로 희석하여 원심분리 (500×g, 5 min)하였다. 상층액을 제거하고 정자괴를 2 ml의 기본 배양액으로 희석하여 2차 원심분리 (300×g, 5 min)하였다. 이후 기본 배양액으로 각각의 실험에 맞는 적절한 정자 농도로 희석하여 추후 실험을 진행하였다. 희석 후 정자의 운동성이 80% 미만이었던 경우는 실험에서 제외하였다.

3) 컴퓨터를 이용한 정자 운동성 분석 (Computer-Aided Sperm Analysis; CASA)

CASA는 전 처리된 정액 10 ㎕를 미리 37℃로 가열된 makler counting chamber (Sefi medical instrument, Israel) 위에 떨어뜨린 후 TI-23A CCD 카메라 (NEC, Japan)가 부착된 위상차 현미경 (Olympus, Japan)에 연결된 CTS-60/200 system (Motion Analysis, USA)을 이용하여 시행하였다.

정자의 운동 특징을 나타내는 항목으로서 운동성 (motility), 직선운동속도 (straight line velocity; VSL), 곡선운동속도 (curvilinear velocity; VCL), 곡선경로 선형도 (linearity; LIN), 측두 이동 거리 (amplitude of

Table 1. Parameter settings of CTS-60 system

1. Temperature	37℃
2. Frame rate	60 frames/sec
3. Duration of data capture	30 frames
4. Minimum path length	25 frames
5. Minimum motile speed	10 ?m/sec
6. Maximum burst speed	600 ?m/sec
7. ALH path smoothing factor	7 frames
8. Depth of sample	10 ?m

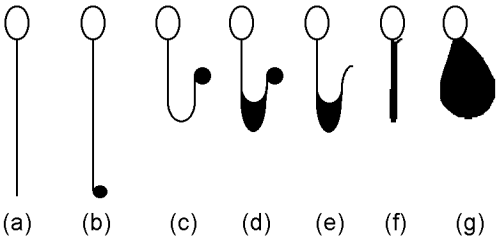

Figure 1. Diagrammatic representation of hypo-osmotic swelling patterns. Shaded area denote regions of tail swollen. a, no swelling; b~d, tail-tip patterns; e~g, various types of swelling.[12]

lateral head displacement; ALH)를 분석하였다. 이때 고활력 정자 (hyperactivated sperm)의 기준은 VCL≥ 100 ?m/s, LIN<60%, ALH≥5 ?m로 정하였다.[11]

본 실험에서 사용된 CTS-60/200 system의 초기 설정치는 Table 1과 같다.

4) 정자의 저장액 처리 (Hypo-Osmotic Swelling Test; HOST)

HOST는 Jeyendran 등[12]의 방법에 준하여 시행하였다.

전 처리된 정액 300 ?l (20×10^6 spermatozoa/ml)를 fructose (Sigma, USA) 13.51 gm과 sodium citrate (Shinyo, Japan) 7.35 gm을 3차 증류수 1000 ml에 녹여 최종 삼투압 150 mOsm/Kg로 제조된 저장성 용액 5 ml과 혼합한 후 37℃의 수조 내에서 30분간 배양하였다. 이후 500×g에서 5분간 원심분리하였으며, 상층액을 제거한 후 정자괴에서 10 ?l를 취하여 깨끗한 슬라이드에 도말하고 실온에서 건조시켰다.

결과의 분석을 위하여 위상차 현미경에서 슬라이드 당 최소 200개 이상의 정자를 판독하였다. 정자 팽창의 유형은 Figure 1과 같이 분류하였다. 미부가 전혀 팽창되지 않은 경우는 a, 미부 말단만 팽창된 경우로 미부의 굴곡이 없으면 b, 굴곡이 있으면 c로 판독하였으며, 미부 중간 부위와 말단이 동시에 팽창된 경우는 d, 미부 중간 부위만 팽창된 경우는 e, 미부가 전반적으로 팽창된 막대모양은 f, 미부가 전반적으로 팽창된 눈사람 형태는 g로 구분하였다. HOST 후 정자 미부가 변화된 정자의 비율은 판독한 정자의 총수에서 미부가 변화된 b~g 유형의 비율로 계산하였다.

5) 정자의 첨체반응 분석

(1) Stock solution의 제조

Calcium ionophore A23187 (A23187; Sigma, USA) 1.0 mg을 382 ?l의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)에 녹여 최종 농도 5 mM/L stock solution을 제조한 후 알루미늄호일에 싸인 eppendorf tube에 20 ?l 씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 사용 당일 분주된 20 ?l의 stock solution에 4.98 ml의 기본 배양액을 첨가하여 최종 농도 20 ?M/L의 A23187 용액과 대조군으로는 4.98 ml의 기본 배양액에 DMSO 20 ?l를 첨가한 용액을 제조하여 사용하였다.

Hoechst 33258 (H33258; Sigma, USA)을 기본 배양액으로 1 mg/ml의 농도로 조정한 후 알루미늄호일에 싸인 eppendorf tube에 20 ?l 씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 사용 당일 분주된 stock solution을 기본 배양액으로 희석하여 최종 농도 1 ?g/ml로 조정한 후 사용하였다.

Fluorescein isothiocyanate conjugated pisum sativum agglutinin (FITC-PSA; Sigma, USA)을 증류수로 1 mg/ml의 농도로 조정한 후 알루미늄호일에 싸인 eppendorf tube에 100 ?l 씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 사용 당일 분주된 FITC-PSA 용액을 증류수로 희석(1 : 9)하여 최종 농도 100 ?g/ml로 조정한 후 사용하였다.

(2) 첨체반응

첨체반응 분석은 Cummins 등[13]의 방법에 준하여 시행하였다.

전 처리된 정자 부유액 (20×10^6 spermatozoa/ml)을 반분하여 각각을 동량의 20 ?M/L A23187 용액 (최종 농도 10 ?M/L)과 DMSO 용액으로 희석하여 30

분간 37℃, 5% CO_2 배양기 내에서 배양하였다.

(3) 정자 염색 및 첨체반응 분석

배양 후 정자 부유액에 동량의 H33258 용액을 첨가하여 상온에서 어두운 상태를 유지하면서 7분간 염색하였다. 이후 1.5 ml의 정자 부유액을 phosphate buffered saline (PBS; GibcoBRL, USA)으로 희석된 4 ml의 2% polyvinyl pyrrolidone (Sigma, USA) column 위에 올려 놓고 500×g로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 정자괴를 잘 섞어준 후 20 ㎕를 취하여 슬라이드 위에 도말, 건조시킨 후 95% ethanol에서 5분간 고정하였다. 고정, 건조된 슬라이드 위에 FITC-PSA (100 ㎍/ml) 100 ㎕를 떨어뜨린 후 4℃ moist chamber에서 15분간 정치시켰다. 증류수로 염색액을 세척하고 건조시킨 후 정자에 염색된 형광이 사라지는 것을 방지하기 위하여 propyl gallate mountant로 봉입하였다. 슬라이드의 관찰은 mercury burner와 epi-illumination module이 장착된 형광 현미경 (Olympus, Japan) 하에서 1000의 배율로 H33258 염색에 의한 정자의 생사 여부 관찰을 위하여 filter cube U를 사용하였고, FITC-PSA 염색에 의한 정자 첨체 부위의 관찰을 위하여 filter cube B를 사용하였다.

두 장의 슬라이드에서 각각 200개 이상의 정자를 관찰하여 H33258이 염색되어 밝은 청색을 나타내는 죽은 정자와 정자 두부 전체가 염색되지 않았거나, 비정상적인 첨체 형태를 지닌 정자는 제외하고 첨체 부위가 완전히 염색된 것, 적도대 (equatorial segment)가 염색되고 첨체 부위가 부분적으로 염색된 것, 적도대만이 염색된 정자의 총 수에서 정상적인 투명대 통과 및 난막 (oolemma)과의 융합이 가능한 첨체내막이 노출되고 온전한 적도대를 지닌 적도대 부위만이 염색된 정자의 비율로 대조군과 A23187 처리군 각각에서 첨체반응률 (%)을 조사하였다.

A23187에 반응하여 첨체반응을 나타낼 수 있는 첨체반응 정도는 A23187 처리군의 첨체반응률에서 대조군의 첨체반응률의 차이로서 산정하였다.

6) 정자막 지방의 산화 (lipid peroxidation)

Lipid peroxidation은 최종 산물인 malondialdehyde를 측정하는 thiobabituric acid (TBA) 반응법으로분석하였다.[14]

전처리된 정액을 Ca^{++}, Mg^{++}이 제거된 Hank's balanced salt solution으로 희석하여 정자 농도가 20×10^6/ml 되게 조정하였다. Lipid peroxide의 malondialdehyde로의 전환을 증진시키기 위하여 3차 증류수로 희석된 1 mM ferrous sulphate (Sigma, USA)와 5 mM sodium ascorbate (Sigma, USA)를 각각 10 ㎕씩 상기 정자 부유액 1 ml에 첨가하고 37℃에서 30분간 배양하였다. 250 ㎕의 40% trichloroacetic acid (Sigma, USA)를 첨가하고 0℃에서 10분간 정치하여 lipid peroxidation을 중지시킨 후 2500×g에서 10분간 원심분리하였다. 이후 상층 1 ml을 회수하여 250 ㎕의 1% TBA와 혼합하여 끓는 물에서 10분간 중탕하였고 상온에서 냉각시켰다. Malondialdehyde의 농도는 spectrophotometer (Kontron instruments, Switzerland)를 이용하여 532 nm 파장에서 반응액의 흡광도 (optical density)를 측정하여 분석하였다. 생성된 malondialdehyde의 몰 농도는 몰 흡광계수 (1.49×10^5 l · mol^{-1} · cm^{-1})를 기준으로 환산하였다.[15]

7) 유세포 분석기 (flow cytometry)를 이용한 정자 DNA fragmentation 분석

정자의 DNA fragmentation 측정은 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labelling) 기법이 적용된 APO-DIRECT™ kit (Pharmingen, USA)와 유세포 분석기 (Becton dickinson, USA)를 사용하여 실시하였다. 전 처리된 정자를 0.5 ml의 PBS로 희석하여 정자 농도가 $2\sim4\times10^6$/ml이 되도록 조정하고 5 ml의 1% paraformaldehyde (pH 7.2)를 넣어 얼음 위에서 15분간 고정시켰다. 이후 300×g에서 5분간 원심분리하고 정자괴를 5 ml의 PBS로 2회 세척 후 70% ice-cold ethanol 5 ml을 넣고 -20℃에서 최소 30분간 정치하였다. 300×g에서 5분간 재 원심분리하여 상층의 ethanol을 제거한 후 정자괴를 1.0 ml의 wash buffer로 희석하여 300×g에서 5분간 원심분리하는 세척 과정을 2회 반복하였다. 이렇게 얻은 정자괴에 FITC-dUTP와 TdT enzyme이 들어 있는 염색액 50 ㎕를 넣고 37℃에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 5 ml의 rinse buffer를 넣고 300×g에서 5분간 원심분리하는 세척 과정을 2회 반복하였다. 이후 정자괴에 0.5 ml의 propidium iodide(PI)/RNase A액을 첨가하여 암실에서 30분간 염색하였다. 염색 후 유세포 분석은 3시간

이내에 시행하였다.

유세포 분석은 488 nm argon laser (15 mW)를 장착한 유세포 분석기를 이용하였다. DNA histogram의 분석은 CELLQuest program (ver. 3.1)을 이용하였다. DNA fragmentation이 야기된 정자의 형광강도에 대한 기준을 설정하기 위하여 TdT 효소를 제거한 반응액으로 처리한 정자를 DNA fragmentation 발생되지 않은 negative control로 간주하였고, PBS로 희석된 0.1 IU DNase I (Sigma, USA)을 처리하여 인위적으로 DNA fragmentation을 유도한 정자를 positive control로 이용하여 Figure 2에서와 같이 DNA fragmentation이 야기된 정자의 형광강도에 대한 기준을 설정하였다. 이후 분석은 Figure 2의 설정치를 기준으로 분석되는 정자의 DNA fragmentation 정도를 측정하였다.

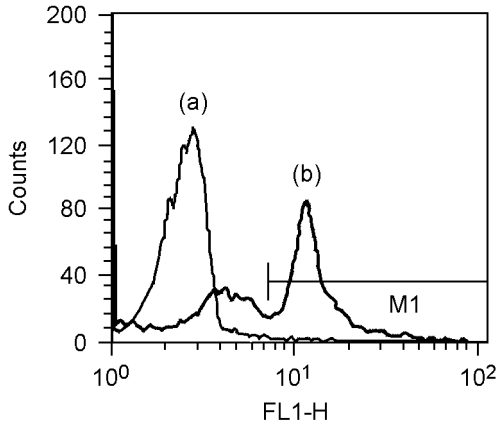

Figure 2. Histograms of the TUNEL assay in bovine spermatozoa analyzed by flow cytometry. **(a)** A typical negative control, in which 0.1% of the spermatozoa are labeled. **(b)** A positive control treated with DNase I, in which 62.8% of the spermatozoa are labeled.

8) ROS의 발생과 항산화제의 처리

ROS가 소 정자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 xanthine (X)과 xanthine oxidase (XO)의 병용 처리로 인위적인 ROS의 발생을 유도하였다. 먼저 X-XO 처리의 적정 농도와 적정 처리 시간을 알아보기 위하여 기본 배양액에 250, 500, 1000 uM의 X와 25, 50 mU/ml의 XO를 병행 처리하여 전 처리된 소 정자에서 시간별 운동성 감소 정도를 분석하였으며 (결과 기술하지 않음), 운동성 감소 효과가 가장 뚜렷하게 나타났던 2시간 처리 시 고농도의 조합 (1000 uM X~50 mU/ml XO)을 선택하여 추후 실험

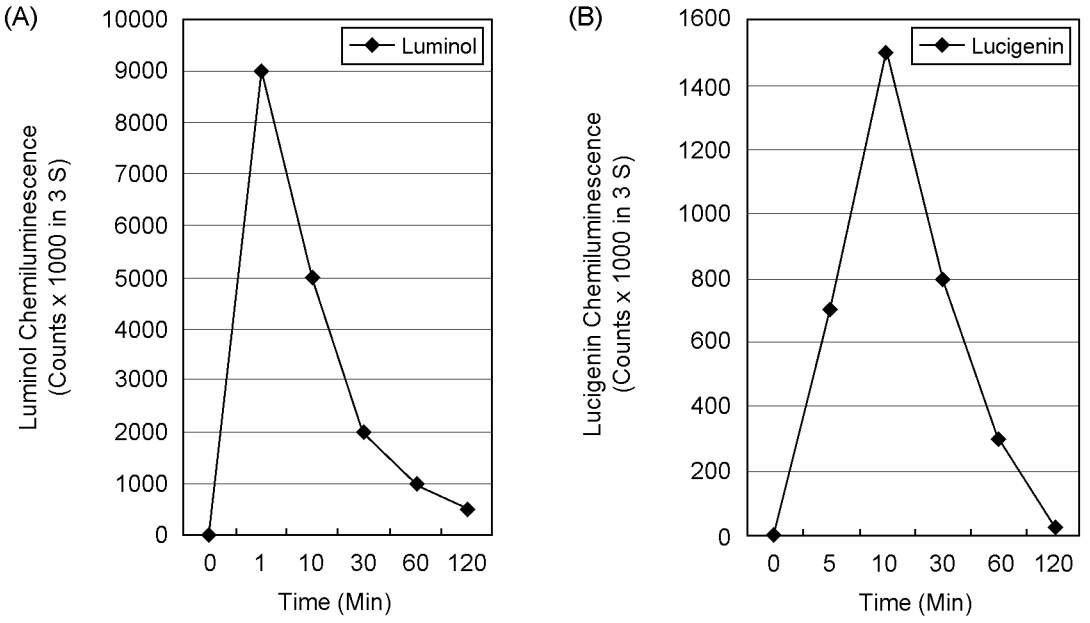

Figure 3. Kinetics of reactive oxygen species generation in the xanthine and xanthine oxidase system used in this study. **(A)** Luminol-dependent chemiluminescence for time resolution of H_2O_2 generation. **(B)** Lucigenin-dependent chemiluminescence for time resolution of $\cdot O_2^-$ generation.

Table 2. Influence of reactive oxygen species generation with the xanthine and xanthine oxidase system on the movement characteristics of bovine spermatozoa

Movement characteristic	Time (min)			
	0	30	60	120
Motility (%)	82.4±0.8	49.5±0.5*	50.8±1.5*	16.3±5.0*
VSL (?m/s)	66.3±7.2	41.8±2.5*	19.5±0.9*	4.8±4.8*
VCL (?m/s)	129.3±7.2	88.8±3.3*	86.5±3.1*	23.8±23.8*
LIN (%)	51.5±3.1	48.3±2.6	25.5±2.3*	5.0±5.0*
ALH (?m/s)	6.0±0.2	4.4±0.4*	4.8±0.3*	2.1±2.1*
HA (%)	21.6±3.4	5.1±1.9*	5.4±0.8*	0.4±0.4*

Values are mean±SEM, n=4. *p<0.05 compared with zero time. VSL: straight line velocity; VCL: curvilinear velocity; LIN: linearity; ALH: lateral head displacement; HA: hyperactivation.

Table 3. Effects of antioxidants on the movement characteristics of bovine spermatozoa after 2 h of incubation with the xanthine (X) and xanthine oxidase (XO)

Movement characteristic	Control	X-XO	X-XO +		
			SOD	CAT	SOD + CAT
Motility (%)	52.0±2.7	16.3±5.0*	17.5±4.6*	66.8±4.0*	63.3±4.5
VSL (?m/s)	72.5±3.9	4.8±4.8*	6.5±3.8*	63.3±8.1	61.5±5.8
VCL (?m/s)	123.0±6.7	23.8±23.8*	21.8±13.4*	121.3±6.8	115.3±5.3
LIN (%)	56.8±1.1	5.0±5.0*	16.8±10.8*	51.3±4.7	52.0±3.5
ALH (?m/s)	5.4±0.3	2.1±2.1	2.7±1.8	5.8±0.3	5.8±0.3
HA (%)	5.6±1.3	0.4±0.4*	0.0±0.0*	14.4±2.3*	11.3±2.5

Values are mean±SEM, n=4. *p<0.05 compared with control values. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; VSL: straight line velocity; VCL: curvilinear velocity; LIN: linearity; ALH: lateral head displacement; HA: hyperactivation.

을 시행하였다.

ROS에 대한 항산화제의 효과를 알아보기 위하여 X-XO와 superoxide dismutase (SOD) 또는 catalase를 병행 처리하였다. 항산화 효소들의 적정 처리 농도와 시간을 알아보기 위하여 기본 배양액에 200, 400, 800 U/ml의 SOD또는 500, 1000, 2000 U/ml의 catalase를 각각 첨가하여 정자의 시간별 운동성을 분석하였다 (결과 기술하지 않음). 두 제재 모두 농도별 운동성 변화에 유의한 차이는 없었으나 고농도 처리에서 다소 감소되는 경향이 나타났기 때문에 200 U/ml의 SOD와 500 U/ml의 catalase를 적정 농도로 선택하여 추후 실험을 시행하였다.

X-XO 단독 처리, X-XO와 SOD 또는 catalase의 병행 처리에 따른 소 정자의 운동 양상, 첨체반응률, HOST, lipid peroxidation, DNA fragmentation 분석은 각각의 처리에서 정자를 2시간 배양한 후 시행하였다.

9) ROS의 발생 측정

ROS의 발생은 chemiluminescence 방법으로 측정하였다.[16] Chemiluminescence signal은 LB950 luminometer (Berthold, German)를 이용하여 3초간의 integration mode로 기록하였다. ROS 측정을 위한 probe는 luminol (5-amino-2, 3-dihidro-1, 4phthalazinedione; Sigma, USA)과 lucigenin (10, 10'-dimethyl-9, 9'-biacridinium dinitrate; Sigma, USA)을 사용하였다. Luminol은 중성 pH 상태에서 세포 내로 침투되므로, 세포 내외의 다양한 ROS (H_2O_2, $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$)와 반응하여 발색하며, peroxidase 존재 하에 H_2O_2와 강력한

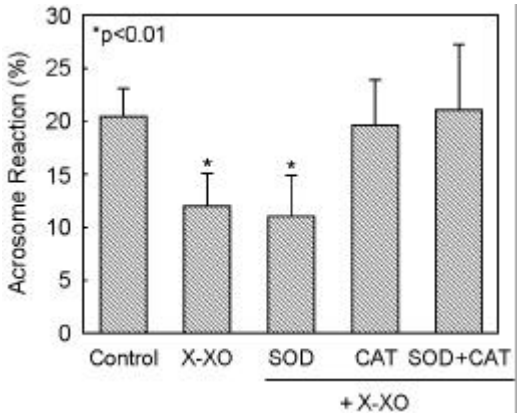

Figure 4. Effects of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on the acrosome reaction in bovine spermatozoa after 2 h of incubation with the xanthine (X) and xanthine oxidase (XO). Acrosome reaction expressed as the difference between spontaneous and ionophore induced acrosome reaction rates. Values are mean ±SEM, n=5. * p<0.01 compared with the control.

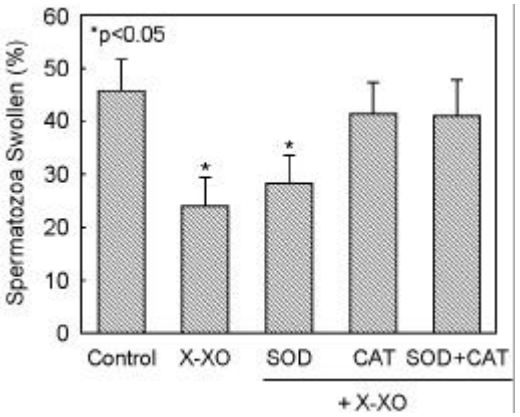

Figure 5. Effects of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on the swelling of bovine spermatozoa under hypo-osmotic condition after 2 h of incubation with the xanthine (X) and xanthine oxidase (XO). Values are mean±SEM, n=5. *p<0.05 compared with the control.

반응을 나타낸다. 반면, lucigenin은 중성 pH 상태에서 세포 내 비침투적이며, ROS 중 주로 $\cdot O_2^-$와 반응하여 발색한다.

이들 두 probe의 stock solution은 DMSO로 희석하여 25 mM로 제조하였다.

Luminol을 이용한 X-XO 처리에서 발생된 H_2O_2의 측정은 X (1000 uM)~XO (50 mU/ml)가 첨가된 400 ?l의 기본 배양액에 luminol stock solution 4 ?l (최종 농도 250 uM)와 PBS로 희석된 8 ?l의 horseradish peroxidase (최종 농도 12.4 U; Sigma, USA)를 첨가한 후 luminometer에서 120분간 signal을 측정하였다.

Lucigenin을 이용한 $\cdot O_2^-$ 측정은 X (1000 uM)~XO (50 mU/ml)가 첨가된 400 ?l의 기본 배양액에 lucigenin stock solution 4 ?l (최종 농도 250 uM)를 첨가한 후 luminometer에서 120분간 signal을 측정하였다.

3. 통계 분석

결과에 대한 통계학적 분석은 통계 패키지 프로그램인 SPSS (ver. 7.5)를 이용하였으며, 두 군간의 평균치 비교를 위하여 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 이때 $p<0.05$인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1000 uM X~50 mU XO/ml의 처리에서 실제로 발생되는 ROS를 측정한 결과 H_2O_2의 발생은 1분 경에 (9020×10^3 cpm), $\cdot O_2^-$의 발생은 10분 경에 최고치 (1400×10^3 cpm)를 나타내었으며, 이후 급격히 감소하는 경향을 보였다 (Figure 3). ROS의 급격한 감소는 Aitken 등[9]의 보고에서와 같이 X-XO system에서 발생되는 uric acid의 항산화 작용에 의한 것으로 생각된다. 정자의 운동성은 ROS 발생 양상과 유사하게 X-XO를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 초기 30분에 모든 정자 운동 parameter들이 유의하게 감소되었다 ($p<0.05$) (Table 2).

ROS의 종류에 따른 정자의 운동성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 X-XO와 항산화제로서 $\cdot O_2^-$의 완화제인 SOD와 H_2O_2의 완화제인 catalase의 단독 처리 또는 catalase와 SOD의 병행 처리를 시행한 결과는 Table 3에 요약된 것과 같다.

소 정자의 운동성에 있어서 catalase 또는 catalase와 SOD의 병행 처리는 X-XO system에서 발생되는 ROS의 악영향을 측정된 모든 운동 양상에서 효과적으로 완화하였으나, SOD의 단독 처리는 ALH를 제외한 모든 운동 양상이 X-XO를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 유의하게 저하된 결과를 나타내

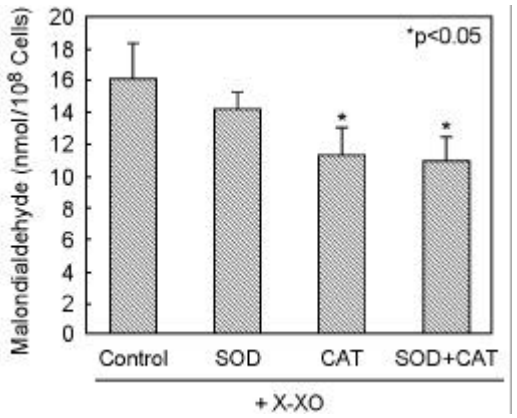

Figure 6. Effects of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on the induction of lipid peroxidation in bovine spermatozoa after 2 h of incubation with the xanthine (X) and xanthine oxidase (XO). Lipid peroxidation expressed as nmol malondialdehyde generated by 1×10^8 spermatozoa. Values are mean±SEM, n=5. * $p<0.05$ compared with the control.

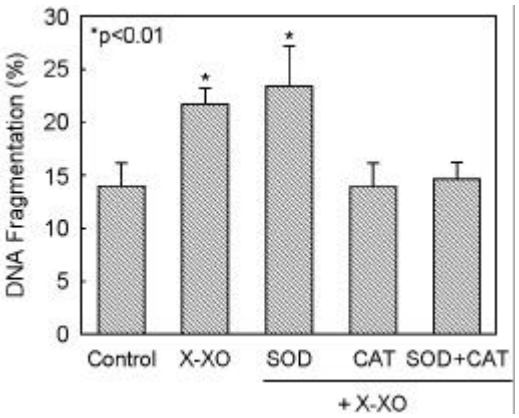

Figure 7. Effects of superoxidsmutase (SOD) and catalase (CAT) on DNA fragmentation assessed by TUNEL and flow cytometry in bovine spermatozoa after 2 h of incubation with the xanthine (X) and xanthine oxidase (XO). Values are mean±SEM, n=5. * $p<0.01$ compared with the control.

었다 ($p<0.05$).

ROS가 소 정자의 기능에 미치는 영향으로서 ionophore에 반응하여 야기된 첨체반응 정도를 분석한 결과 첨체반응률은 X-XO 처리군에서 대조군과 비교하였을 때 유의하게 감소 ($p<0.01$) (Figure 4) 되었으며, 저장액 내 팽창 검사 (HOST)에서도 정자 미부가 변화된 정자의 비율이 유의하게 감소되었다 ($p<0.05$) (Figure 5). 항산화제의 처리 효과에 있어서 catalase 또는 catalase와 SOD의 병행 처리는 첨체반응률과 HOST 모두에서 ROS에 대한 악영향을 효과적으로 완화시켰으나, SOD의 단독 처리에서는 완화 효과가 나타나지 않았다 (Figure 4, 5). ROS 발생이 소 정자의 lipid peroxidation에 미치는 영향에 있어서 malondialdehyde의 생성 정도는 X-XO 단일 처리군과 비교하여 SOD 처리군에서는 유의한 차이가 없었으나, catalase 또는 catalase와 SOD 병행 처리군에서는 유의하게 낮은 결과를 나타내었다 ($p<0.05$) (Figure 6). Catalase의 처리는 ROS의 악영향으로 발생되는 lipid peroxidation을 효과적으로 완화하는 것으로 나타났다.

ROS가 소 정자의 DNA fragmentation에 미치는 영향을 관찰한 결과 DNA fragmentation 정도는 대조군과 비교하여 X-XO 단일 처리군에서 유의하게 증가되었다 ($p<0.01$) (Figure 7). 항산화제 처리 효과에 있어서는 DNA fragmentation이 catalase 또는 catalase와 SOD의 병행 처리군에서는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었으나, SOD 단독 처리군에서는 유의하게 증가되었다 ($p<0.01$) (Figure 7). ROS의 발생은 소 정자의 DNA 수준까지 악영향을 끼치는 결과를 초래하며, 항산화제의 처리 효과에 있어서는 catalase가 ROS에 의한 정자 DNA의 손상을 효과적으로 완화하는 것으로 나타났다.

고 찰

ROS는 산화 작용이 강력한 제재로서 생식계에 영향을 미치는 ROS의 종류로는 superoxide anions ($\cdot O_2^-$), peroxyl radical (ROO $\cdot$), hydroxyl radicals ($\cdot$OH), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 알려지고 있다. ROS가 정자에 미치는 영향은 오래 전부터 관심의 대상으로 연구되어 왔으며, 1973년 Jones와 Mann이 남성불임의 원인에 있어서 ROS와 lipid peroxidation이 밀접한 연관이 있다는 보고 이후 여러 연구자들에 의하여 ROS가 정자의 운동성과 수정능력에 유해한 작용을 미친다는 결과가 확인되었다.[17~18] 인간 정자의 연구에서 Iwasaki와 Gagnon[19]은 불임 환자의 정자에서 정상인의 정자와 비교하여 ROS 발생이 유의하게 높게 나타났으며, ROS의 발생과 운동성 감소간에 유의적인 상관관계가 있다고 보고하

였다.

포유류 정자의 원형질막은 60% 정도가 불포화 지방산으로 구성되어 있으며, 불포화 지방산의 50% 이상이 불포화도가 높은 docosahexaenoic acid로 구성되어 있기 때문에 수정 과정에 있어서 첨체반응과 같은 막의 변화를 원활하게 수행할 수 있지만, 반면 ROS와 같은 자극제에도 민감한 반응을 나타낸다.[1,20] 정자막의 lipid peroxidation은 ROS에 의하여 발생되는 정자 손상의 주요한 기전으로 알려져 있다.[17] 일반적으로 lipid peroxidation이 정자 세포에 미치는 가장 중요한 작용은 정자막의 다중 불포화 지방산 변성에 따른 막 구조와 기능의 변화를 초래하는 것이다.[21,22] 정자는 수정 과정 중 첨체반응과 같은 다양한 막 변화 과정을 이상 없이 수행해야 하는데 lipid peroxidation에 따른 정자막의 유동성 변화는 첨체반응 과정에 이상을 초래할 수 있으며, 결과적으로 수정 실패의 원인으로 작용될 수 있다.[9] 또한 lipid peroxidation으로 생성된 malondialdehyde는 공유 결합을 통하여 세포의 DNA 수준에까지 손상을 일으키는 것으로 보고되고 있다.[23]

최근에는 ROS나 lipid peroxidation의 악영향을 완화시킬 수 있는 다양한 생물학적, 화학적 항산화제들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이론적으로, 정자의 ROS에 대한 손상 정도는 정액 내에 존재하는 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 효소와 발생된 ROS 농도간의 균형에 따라 달라진다. 가장 대표적인 효소계 항산화제로서 알려진 SOD와 catalase의 작용에 있어서 SOD는 $\cdot O_2^-$를 O_2와 H_2O_2로, catalase는 H_2O_2를 H_2O와 O_2로 환원한다.

인위적인 ROS의 발생을 위하여 적절한 농도의 X와 XO를 이용한 반응이 대표적으로 이용되고 있다. X-XO 반응을 통하여 이론적으로 $\cdot O_2^-$와 H_2O_2와 같은 ROS가 발생되는 것으로 알려져 있다. 또한 발생된 H_2O_2는 2차 반응으로서 Haber-Weiss cycle을 통하여 $\cdot OH$를 발생시킬 수 있는데[24] 본 실험에서 catalase의 처리에서 ROS에 대한 악영향이 완전히 완화된 결과를 고려한다면, 배양액 내에 철(iron) 이온이 첨가되지 않을 경우 $\cdot OH$가 발생되지 않거나 발생되더라도 세포에 독성 작용을 일으키는 정도는 아닌 것으로 생각된다. 본 연구에서 생성된 ROS의 종류에 따른 정자에 미치는 악영향을 알아보기 위하여 각각의 ROS를 완화시킬 수 있는 항산화 효소를 처리한 결과 SOD 단독 처리에서는 정자 기능과 lipid peroxidation에 대한 완화 효과가 나타나지 않았으나 catalase의 단독 처리 혹은 SOD와의 병행처리 모두에서 정자 기능과 특성 변화에 대한 완화 효과를 보인 결과를 고려해 보면, 소 정자에 미치는 유해성에 있어서 $\cdot O_2^-$ 보다는 H_2O_2의 영향이 더 주요한 것으로 생각된다. Aitken 등[9]은 X-XO system을 통하여 생성된 ROS가 인간 정자의 기능에 미치는 연구에서 본 연구 결과와 유사하게 ROS의 발생 초기부터 정자의 운동성과 모든 운동 양상이 감소되는 경향을 보였으며 투명대가 제거된 햄스터 난자와의 수정 실험에서도 정자의 난자 내 침투율이 유의하게 낮게 나타남에 따라 ROS가 정자 기능에 악영향을 미친다고 보고하였다. 이들은 발생된 ROS의 종류에 따른 정자 기능의 손상과 lipid peroxidation 정도에서 $\cdot O_2^-$를 완화할 수 있는 SOD 처리에서는 정자 기능의 손상과 lipid peroxidation 정도가 완화되지 않았으나 H_2O_2를 완화할 수 있는 catalase 처리 시에는 정자의 기능이 온전하게 유지되었으며, lipid peroxidation 정도도 효과적으로 감소되는 결과를 보고하였다. Griveau 등[25]도 X-XO system을 이용한 인간 정자의 연구에서 ROS가 발생됨에 따라 정자의 운동성과 ionophore에 반응하는 첨체반응률이 감소하였으며, lipid peroxidation의 증거인 lipid hydroperoxide 농도의 증가와 정자막 내의 불포화 지방산이 감소됨을 보고하였다. 이들의 연구에서도 본 연구 결과와 유사하게 H_2O_2가 정자에 미치는 악영향이 주요했으며, X-XO 혹은 H_2O_2를 직접 처리하였을 때 glutathione peroxidase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 같은 항산화 효소들의 활성이 저하됨을 보고하였다. Blondin 등[26]도 본 연구 재료와 같은 소 동결 융해 정자를 이용한 연구에서 hypoxanthine과 xanthine oxidase를 전 처리하여 정자를 ROS에 노출시킨 후 성숙난포란과의 체외수정률에 있어서 ROS에 노출되지 않은 정자에 비하여 ROS에 노출된 정자에서 수정률이 유의하게 감소함을 보고하였다. 이들의 연구에서 항산화제의 처리 효과를 검증하였는데 SOD 처리에서는 개선 효과가 없었으나, catalase를 처리에서는 유의한 개선 효과가 나타났던 결과로서 소 정자의 수정률과

의 상관관계에 있어서 H_2O_2의 악영향이 더한 것으로 보고하였다.

ROS가 정자의 DNA fragmentation에 미치는 영향에 있어서 Lopes 등[27]은 X-XO를 처리하여 인위적으로 ROS를 발생시킨 후 인간 정자의 DNA 손상 정도를 알아본 연구에서 본 연구 결과와 유사하게 ROS에 노출됨에 따라 정자의 DNA fragmentation 정도가 유의하게 증가되었다고 보고하였다. 이들의 연구에서 ROS에 대한 DNA 손상 정도를 완화하기 위하여 항산화제를 병행 처리한 결과 glutathione과 hypotaurine의 처리에서 DNA 손상이 효과적으로 완화되었으나 catalase 처리에서는 DNA 손상이 완화되기는 하였지만 유의한 정도는 아니었다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 본 연구의 소 정자에서 catalase 처리 시 ROS에 대한 DNA fragmentation 정도가 효과적으로 완화되었던 것과는 일치되지 않는 결과인데 아마도 종간 특이성이 존재하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로서 ROS는 소 정자의 기능 및 성상 변화에 있어서 주요한 유해 요소로 작용하였으며, 적절한 항산화제의 처리법은 ROS에 대한 유해 영향으로부터 정자의 기능과 성상 변화를 최소화 할 수 있는 유용한 방법이라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Jones R, Mann T, Sherins RJ. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. Fertil Steril 1979; 31: 531-7.
2. Bennet PJ, Moatti JP, Mansat A, Ribbes H, Cayrac JC, Pontonnier F, et al. Evidence for the activation of phospholipase during acrosome reaction of human sperm elicited by calcium ionophore A23187. Biochim Biophys Acta 1987; 919: 255-65.
3. Goldman R, Ferber E, Zort U. Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. FEBS Lett 1992; 309: 190-2.
4. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa; a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum Reprod 1995; 12 Suppl 1: 15-21.
5. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. J Androl 1989; 10: 214-20.
6. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axoneme; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J Androl 1992; 13: 368-86.
7. Comporti M. Three models of free radical induced cell injury. Chem Biol Interactions 1989; 72: 1-56.
8. Hinshaw DB, Sklar LA, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Rossi MW, Spragg RG, et al. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. Am J Pathol 1986; 123: 454-64.
9. Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. J Reprod Fetil 1993; 97: 441-50.
10. Biggers JS, Whitten WK, Whittingham DG. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, editor. Method in mammalian embryology. San Francisco: Freeman; 1971. p.86-116.
11. Mortimer ST, Mortimer D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. J Androl 1990; 11: 195-203.
12. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fertil 1984; 70: 219-28.
13. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. J Androl 1991; 12: 98-103.
14. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human sperma-

tozoa. Mol Reprod Dev 1993; 35: 302-15.

15. Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative in rat liver fractions in vitro. Biochem J 1971; 123: 805-14.
16. Aitken RJ, Buckingham DW, Katrine MW. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Analysis of the cellular mechanism involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. J Cell Physiol 1992; 151: 466-77.
17. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J Androl 1987; 8: 338-48.
18. Aitken RJ, Irvine DS, WU FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. A J Ob & Gyn 1991; 164: 542-51.
19. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertility patients. Fertil Steril 1992; 57: 2409-16.
20. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased peroxidative damage and loss of super oxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. J Androl 1992; 13: 232-41.
21. Ohyashiki T, Tsuka T, Mohri T. Increase of the molecular rigidity of the protein conformation in the intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation. Biochim Biophys Acta 1988; 939: 383-92.
22. Block ER. Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. J Cell Physiol 1991; 20: 362-9.
23. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. Hum Reprod 1998; 13: 1429-36.
24. Terada LS, Leff JA, Guidot DM, Willingham IR, Repine JE. Inactivation of xanthine oxidase by hydrogen peroxide involves sites-directed hydroxyl radical formation. Free Radicals in Biol Med 1991; 10: 61-8.
25. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. J Reprod Fertil 1995; 103: 17-26.
26. Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. J Androl 1997; 18: 454-60.
27. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod 1998; 13: 896-900.