

Fertilization Promoting Peptide가 사람 정자의 운동양태, 수정능력획득 및 침체반응에 미치는 영향

한양대학교 자연과학대학 생명과학과¹, 을지병원 의학연구소²,
을지대학교 의과대학 비뇨기과교실³, 생리학교실⁴

강희규^{1,2} · 김묘경² · 김동훈² · 한성원² · 최도연³ · 이호준^{2,4} · 김문규¹

Effect of Fertilization Promoting Peptide on Kinematic Parameters, Capacitation and Acrosome Reaction in Human Spermatozoa

Hee-Gyoo Kang^{1,2}, Myo Kyung Kim², Dong Hoon Kim², Sung Won Han²,
Do Hyun Choi³, Ho Joon Lee^{2,4}, Moon Kyoo Kim¹

¹Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University,
Seoul 133-791; ²Eulji Medical Science Institute, Eulji Medical Center,
Seoul 139-711; ³Department of Urology, and ⁴Physiology, School of Medicine,
Eulji University, Taejon 301-726, Korea

Objective: This study has been carried out to evaluation the effect of fertilization promoting peptide (FPP) on the kinematic parameters, capacitation and acrosome reaction of the frozen-thawed human spermatozoa.

Methods: After FPP treatment, we examined kinematic parameters, capacitation and acrosome reaction, using the methods of computer-aided sperm analysis (CASA) and chlortetracycline (CTC) fluorescence analysis.

Results: We have obtained the evidence that FPP can promote the capacitation and inhibit the spontaneous acrosome reaction of frozen-thawed human spermatozoa *in vitro*. FPP (25~100 nM) induced a significant increase in the proportion of B-pattern capacitated spermatozoa, and a significant decrease in the proportion of F-pattern uncapacitated ones without significant stimulation of acrosomal exocytosis. In the kinematic parameters treatment, FPP treated groups maintained higher LIN, BCF and STR than those of control. The VAP, VSL, VCL and ALH were not different. Therefore it is suggested that FPP in human seminal plasma may play a positive role in promoting human sperm function.

Key Words: Fertilization promoting peptide, Acrosome reaction, Capacitation, Kinematic parameter, Human spermatozoa

Fertilization promoting peptide (FPP; pGlu-Glu-ProNH₂)는 구조적으로 thyrotrophin releasing hormone (TRH; pGlu-His-ProNH₂)와 유사하며,³ 포유

류의 전립선과 정액에서 처음 검출된 후 조류와 사람에서도 검출되었다.¹ 토끼의 전립선 조직 내에서 처음으로 동정된,^{4,5} 후 사람과 토끼 그리고

연구대상 및 방법

1. FPP와 peptide 준비

FPP는 증류수에 녹여 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 용액을 만들어 100 μl 씩 분주하여 사용전까지 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 실험에 사용하기 전에 0.4% BSA가 들어 있는 Ham's F-10 용액에 희석하여 25, 50, 100 nM의 농도로 준비하였다. Progesterone (Sigma)은 DMSO와 0.9% NaCl를 1:1의 비율로 준비한 용액에 녹인 후 사용전까지 냉동 보관하였다. 실험에 사용하기 직전에 대조군을 제외한 모든 실험군에 Ham's F-10 용액에 희석하여 2 nM/ml의 농도로 준비하였다.

2. 정자의 처리

정액은 비뇨기과로 내원한 환자에게서 동의서를 받고 정액검사 후 남은 정액을 냉동 보관하여 두었다가 필요한 때 해빙하여 실험에 사용하였다. 해빙 후 정자를 얻기 위해 3개층으로 구성된 percoll방법으로 2회 원심분리하여 움직이는 정자를 획득하였다. 원심분리는 1400 rpm에서 20분간 1회, 1200 rpm에서 5분간 1회씩 시행하였다. 각각의 실험군에 5×10^6 개의 정자를 분주하여 실험에 사용하였다. 정자를 각각의 실험군에 분주한 후 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 배양기에 넣어 배양하였다.

3. 정자의 kinematic parameter 분석

각 실험군의 정자의 운동양상은 배양 후 0, 1, 3, 6, 24시간에 CASA를 이용하여 분석하였다. 정자의 운동양상은 curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity (LIN), straightness (STR), beat cross frequency (BCF) 그리고 총운동성 (total motility) 등을 조사하였다.

4. 수정능력획득 여부와 침체반응 조사

준비된 정자를 chlortetracycline (CTC)염색하기 전에 정자의 생존성을 확인하기 위해서 100 mg/ml의 Hoechst 33258를 단백질이 제거된 배양액으로 1:1000비율로 희석한 후 정자와 1:100으로 섞은 후 약 2분간 실온에서 염색하였다. 염색되어진 정자를 2% PVP가 들어 있는 배양액으로 세척하여 남아 있는 염색성분을 제거한 후 CTC염색과정을 아래와 같이 수행하였다. 정자와 CTC용액을 1:1

설치류의 전립선, 시상하부 그리고 정액 내에서도 검출되었다.⁶ 시상하부에서 분비되는 FPP의 기능은 아직까지 확실히 밝혀진 바가 없다. 지금까지 정액 내에서 밝혀진 TRH-like peptide는 pyroglutamylglutamineprolineamide (pGlu-Glu-ProNH₂)와 pyroglutamylphenylalanyl-prolineamide (pGlu-Phe-ProNH₂) 두 종류이다 (Cockle *et al.*, 1992).¹⁰

전립선에서 FPP가 존재하는 것으로 밝혀진 후, FPP와 전혀 접촉이 없는 부위인 부정소의 생쥐정자를 이용한 초기 연구들에서 uncapacitated 정자를 FPP (25 nM)를 첨가한 배양액 내에서 배양한 결과 수정능력획득이 유의하게 증가되는 것을 관찰하였고 수정능력획득 뿐 아니라 FPP를 처리한 정자가 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 수준의 수정률 향상이 있음을 확인하였다.⁹ 토끼에서는 발정기에 FPP의 농도가 증가되는 것이 확인되었으며, 수컷의 수정능력과 관계 있음이 보고되었다.¹² 이러한 결과들로 인하여 pyroglutamylglutamineprolineamide (pGlu-Glu-ProNH₂)를 fertilization promoting peptide (FPP)라 명명하게 되었다.

FPP는 인간 정액 내에서 상대적으로 다른 조직에서 보다 많은 양이 (~50 nM) 존재하는 것으로 확인되었으나,⁶ 정자의 수정능력획득에 미치는 영향에 관하여는 잘 알려져 있지 않다. 일반적으로 인공수정시술을 시행하는 과정에서, 사정된 정자를 원심분리를 이용하여 운동성이 좋은 정자만을 골라서 여성의 자궁 내에 넣어 주게 되는데, 이러한 시술은 대부분이 자궁경부 요인이거나 미미한 남성요인일 경우에 시행하게 된다. 즉, 정자의 능력을 향상시켜 주기만 하면 임신에 문제가 없다고 여겨지는 경우들인데, 지금까지의 임신 성공률은 시술당 9~12% 내외이다. 이와 같은 낮은 인공수정시술의 성공률이 정액 내에 존재하고, 수정에 영향을 미칠 수 있는 FPP와 같은 물질들이 사정 후 원심분리 등의 방법으로 인해 희석되거나 없어지게 되는 것이 그 원인이 아닌가 추측하고 있다. 수정이 일어나기 위해서는 정자가 난자와 만나기 전에 운동능력 상실¹⁶이나 때 이른 침체반응이 일어나지 않아야 하는 데, FPP가 난자와 수정되기 전까지 정자의 이러한 기능을 유지시키는 역할을 수행하는 것으로 추측된다.

이에 본 연구에서는 냉동 후 해빙한 사람 정자의 운동양태 및 수정능력획득과 침체반응에 미치는 FPP의 영향을 자동정자 분석기와 chlortetracycline (CTC) 염색방법을 통하여 알아보고자 하였다.

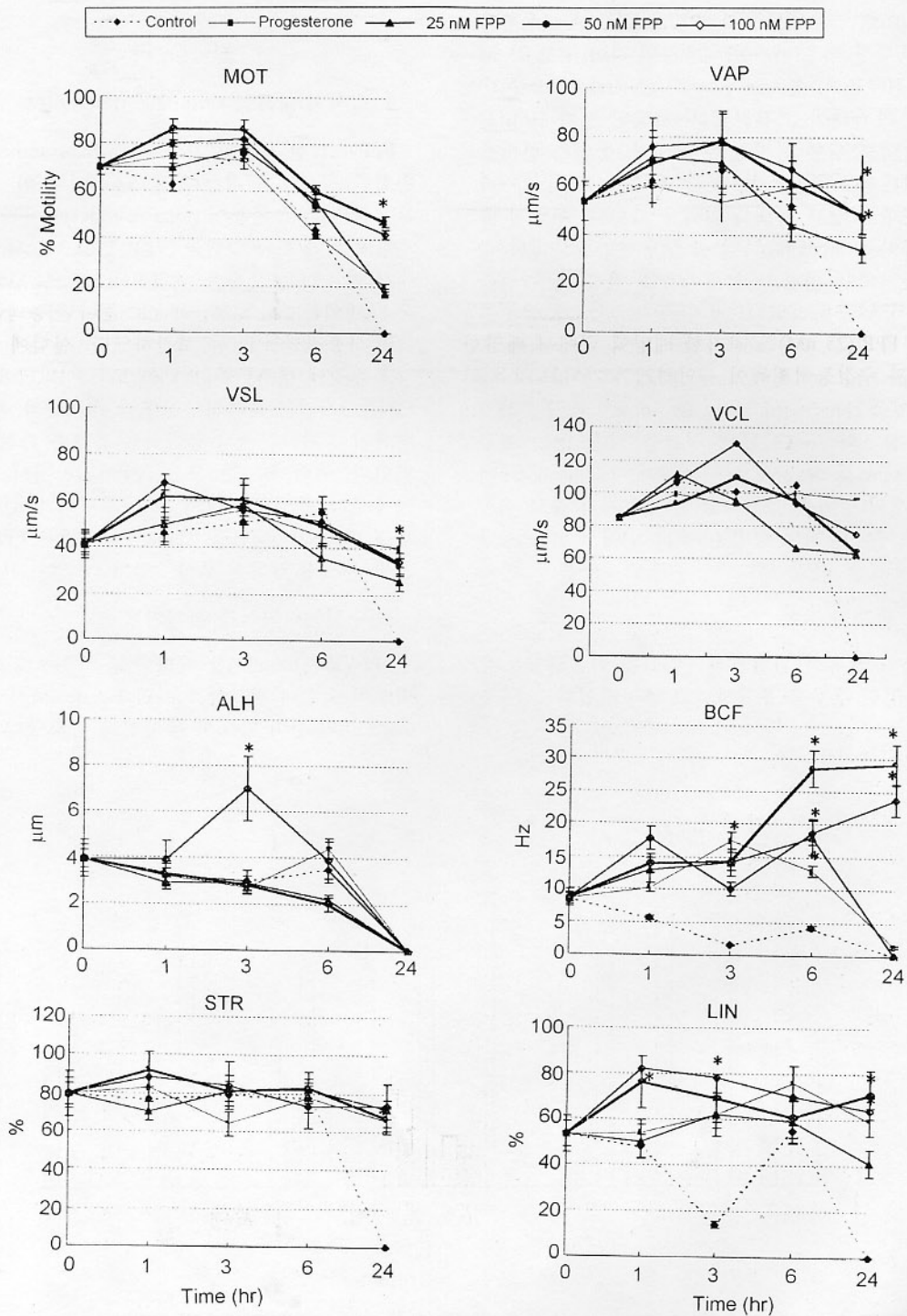


Figure 1. Changes in the kinematic parameters of human sperm suspension incubated for 1, 3, 6 and 24 hr in the presence of 25~100 nM FPP +/- 2 nM progesterone. Each abbreviated word means as MOT, total motility; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; LH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STA, straightness; LIN, linearity. Data are presented as means \pm SEM (n=5). (*) $p < 0.01$; compared with untreated control suspension.

(50 μ l)로 알루미늄호일로 빛을 차단한 실험관에
서 혼합한 후 교반기를 이용하여 섞어 주고 0.5 M
Tris-HCl용액 내 2.5% (w/v)의 glutaraldehyde를 10
 μ l를 첨가하여 고정하였다. 고정된 정자 10 μ l를
슬라이드 위에 정치한 후 antifade 용액을 한방울
떨어뜨리고 cover slip를 덮고 slide 위의 정자가
최대한 편평해 지도록 압력을 가한 후 투명한 매
니큐어로 mounting하였다. 형광현미경하에서 수
정능력획득 여부와 침체반응을 검경 한 결과를
3가지로 구분하였다. 정자 두부 전체가 골고루
형광을 띠는 것을 uncapacitated, intact acrosome으
로, post-equatorial region에 형광띠가 관찰되지 않
는 것을 capacitated, intact acrosome으로 구분하였
고, 정자의 두부전체에 형광을 띠지 않는 것을
acrosome reacted군으로 구분하여 각각의 slide에서
100개의 정자를 조사하였다. 세가지의 결과 판독
모두에서 정자의 중편 (mid piece)에서 밝은 형광
을 관찰할 수 있었다.

5. 통계적 분석

통계적 유의성 검정은 χ^2 -test를 이용하였으며,
 $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 정자의 활동성 kinematic parameter

FPP에 의한 사람 정자의 kinematic parameters의
변화를 알아보기 위하여 CASA장비를 이용하여
분석하였다. 총운동성 (total motility)은 시간이 경
과함에 따라 모든 실험군 (VAP, VSL, VCL과 ALH)
에서 감소하는 모습을 보였으며 50 nM FPP처리
군을 제외하고는 대조군과 유의한 차이는 없었다.
그러나 24시간 경과 후에 대조군의 운동성이 급
감하는 경향을 나타내었다. 그러나 BCF, STR과
LIN은 3시간이 경과하면서부터 대조군과 농도에
상관없이 처리군에서 증가하는 양태를 관찰할 수
있었다. 특히, BCF는 모든 FPP처리군에서 3시간
이후부터 유의한 증가를 보여주었다 (Figure 1).
한편 progesterone만을 처리한 실험군은 FPP처리
군과 유사한 양태를 보여주었다.

2. 수정능력획득과 침체반응

FPP (25~100 nM)를 처리한 경우에는 대조군에
비하여 시간이 경과함에 따라 F-pattern에서 B-pat-
tern으로의 전이 양상이 뚜렷하게 나타났다. 특히

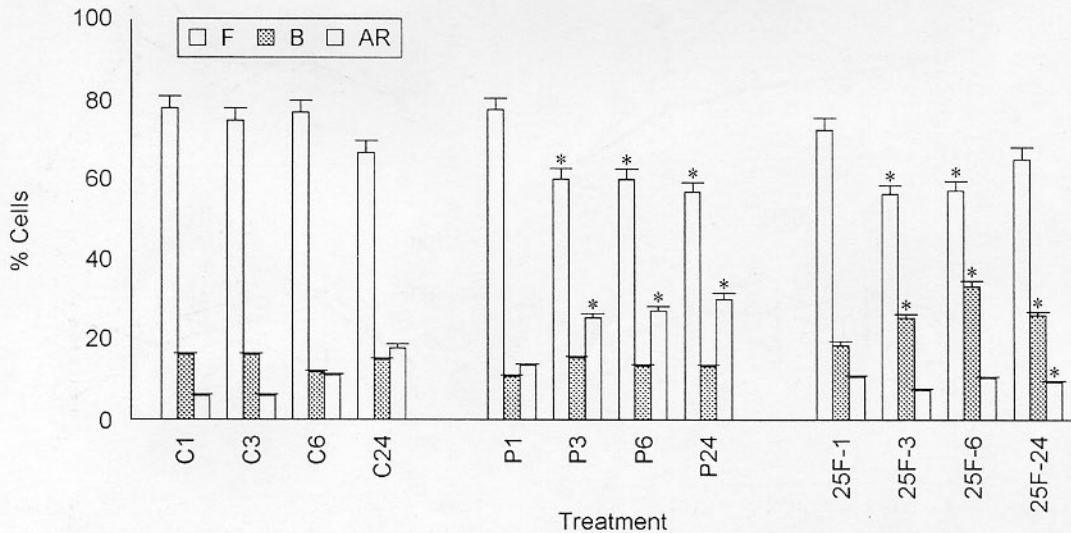


Figure 2. Changes in chlortetracycline (CTC) patterns of human sperm suspension incubated for 1, 3, 6 and 24 hr in the presence of 25 nM FPP +/- 2 nM progesterone. F, with uniform fluorescence over the sperm head, characteristics of uncapacitated, acrosome-intact cells; B, with a fluorescence - free band in the post-acrosomal region, characteristics of capacitated, acrosome-intact cells; AR, dull or absent fluorescence in the head region, characteristics of capacitated, acrosome-reacted cells. Data are presented as means \pm SEM (n=5). (*) $p < 0.01$; compared with untreated control suspension.

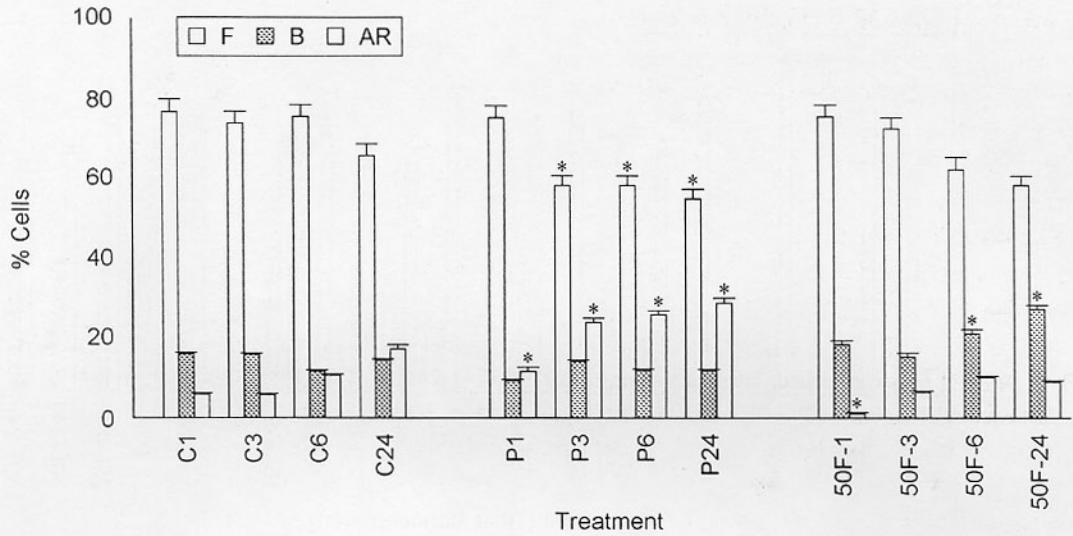


Figure 3. Changes in chlortetracycline (CTC) patterns of human sperm suspension incubated for 1, 3, 6 and 24 hr in the presence of 50 nM FPP +/- 2 nM progesterone. F, with uniform fluorescence over the sperm head, characteristics of uncapacitated, acrosome-intact cells; B, with a fluorescence - free band in the post- acrosomal region, characteristics of capacitated, acrosome-intact cells; AR, dull or absent fluorescence in the head region, characteristics of capacitated, acrosome-reacted cells. Data are presented as means \pm SEM (n=5). (*) p<0.01; compared with untreated control suspension.

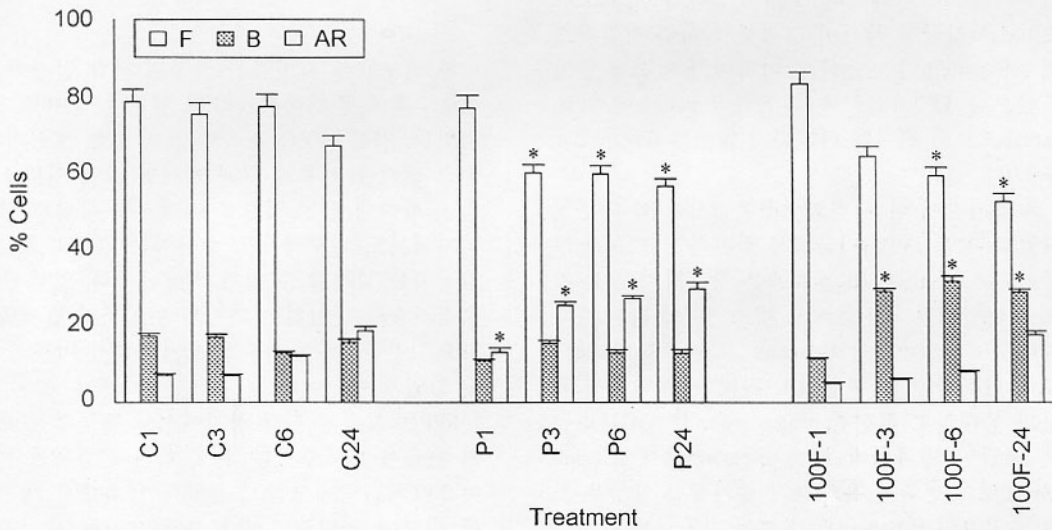


Figure 4. Changes in chlortetracycline (CTC) patterns of human sperm suspension incubated for 1, 3, 6 and 24 hr in the presence of 100 nM FPP +/- 2 nM progesterone. F, with uniform fluorescence over the sperm head, characteristics of uncapacitated, acrosome-intact cells; B, with a fluorescence - free band in the post- acrosomal region, characteristics of capacitated, acrosome-intact cells; AR, dull or absent fluorescence in the head region, characteristics of capacitated, acrosome-reacted cells. Data are presented as means \pm SEM (n=5). (*) p<0.01; compared with untreated control suspension.

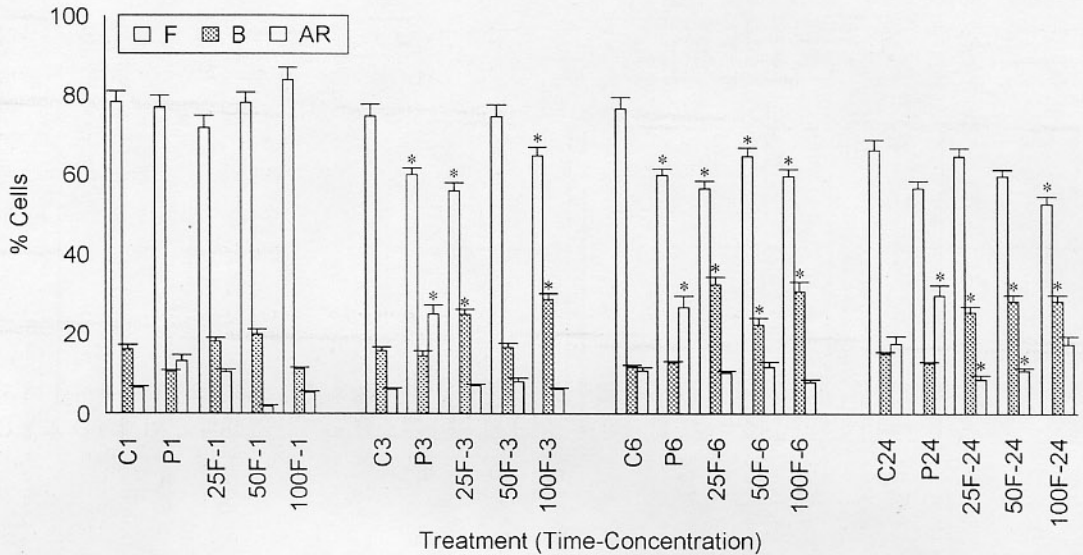


Figure 5. Changes in chlortetracycline (CTC) patterns of human sperm suspension incubated for 1, 3, 6 and 24 hr in the presence of 25~100 nM FPP +/- 2 nM progesterone. F, with uniform fluorescence over the sperm head, characteristics of uncapacitated, acrosome-intact cells; B, with a fluorescence - free band in the post- acrosomal region, characteristics of capacitated, acrosome-intact cells; AR, dull or absent fluorescence in the head region, characteristics of capacitated, acrosome-reacted cells. Data are presented as means \pm SEM (n=5). (*) $p < 0.01$; compared with untreated control suspension.

처리 후 3시간이 경과하면서부터 pattern의 변화가 유의하게 나타났다 (Figure 2-4). Progesterone (2 nM) 처리군은 시간이 경과함에 따라 점진적으로 AR pattern이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였으나 FPP 처리군에서 처럼 F-pattern에서 B-pattern으로의 전이는 나타나지 않았다 (Figure 2-4, $p < 0.01$).

처리시간에 따른 변화양상은 3시간 이후 관찰되었다. 모든 FPP 처리군에서 점진적인 B-pattern의 증가가 나타났고, AR-pattern은 증가하지 않는 것으로 확인되었다 (Figure 5). 대조군은 시간이 경과되어도 F-pattern에서 B-pattern, 또는 AR-pattern으로의 변화가 거의 관찰되지 않았다. 체내에서 유사한 상태라고 설정한 progesterone (2 nM) 처리군은 시간이 경과함에 따라 F-pattern에서 AR-pattern으로의 변화가 유의하게 증가하는 양상을 보여 주었으나 B-pattern의 변화는 관찰되지 않았다 (Figure 4). FPP 처리 농도간의 차이는 크게 나타나지 않는 것으로 보였으나 50 nM 처리군이 다른 처리군보다 변화의 폭이 넓은 것으로 사료된다. 모든 실험군에서 죽은 정자로 인한 false positive는 Hoechst 33258로 염색한 결과 1% 이하로 확인되었다.

고 찰

본 연구에서 저자들은 사정된 사람 정자의 수정능력 획득에 있어서 FPP의 영향을 알아보려고 하였다. 이는 FPP와 접촉이 전혀 없는 생쥐의 부정소 정자를 이용한 결과⁹에서와 같이 이미 FPP의 영향하에 있는 것으로 여겨지는 사람의 사정 정자에서도 외부적으로 주어지는 FPP의 효과가 있을지는 확신할 수 없었기 때문이다. 또한 인공 수정술을 준비하는 과정의 원심분리 단계에서 FPP 일부분 또는 전부가 제거되는지 여부를 알 수 없었기 때문이다.

FPP는 사정된 사람 정자에서도 능동적인 효과가 있음을 보여주었다. 본 실험의 결과에서와 같이 FPP 처리군에서는 운동양태 변화에서 대조군에 비하여 전반적인 운동성의 유지를 보여주었다. 위의 kinematic parameters의 분석 결과에서와 같이 progesterone를 첨가해 주는 것은 정자의 운동성을 유지시켜 주는 기능이 있는 것으로 사료되나, 일반적인 인공 수정술시와 같은 방법으로 준비한 대조군은 24시간이 경과하면서 급격히 운동성을 상실하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1).

FPP처리군은 처리농도에 상관없이 시간이 경과함에 따라 BCF, STR과 LIN 등의 운동양태가 대조군에 비하여 향상 또는 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 정액 내에서 정자에 부착되는 것으로 사료되는 FPP의 기능이 최소한 정자의 수정능력을 유지한다는 것을 시사한다. 또한 대조군에서 운동양태가 24시간 이후 급격한 감소를 보이는 것으로 보아, 인공수정기술 준비과정에 시행하는 원심분리를 이용한 세척방법에서 일부 또는 많은 양의 FPP가 상실되는 것으로 추론된다.

정자의 수정능력획득과 침체반응은 모든 FPP (25~100 nM) 처리군에서 유의한 차이를 나타내었다. Uncapacitated, acrosome intacted 상태인 F-pattern군에서 capacitated, acrosome intacted 상태 B-pattern군으로의 유의한 ($p < 0.01$) 전이가 관찰되었다 (Figure 2-4). 이러한 반응은 초기 단계, 즉 처리 후 1~3시간에서 관찰되었으며 농도와 무관한 양태를 보여주었다 (Figure 5). 위와 같이 수정능력획득의 상태에서 침체반응 유기가 일어나지 않은 상태로 유지되는 것은 체내에서 일어나는 수정과정에 있어서는 매우 의미있는 것으로 사료된다. 즉, 체내에서 사정된 정자가 난자에 도달하기까지 수정능력을 유지할 수 있는 기능적인 뒷받침이 있기 때문이라 생각된다.¹⁴ 또한 progesterone (2 nM)이 함께 처리된 상태에서, 즉 배란기의 여성의 생식기관에 존재하고 있는 progesterone의 영향과 유사한 환경 속에서 대조군은 침체반응이 유의하게 진행된 반면에, FPP처리군에서는 침체반응이 억제된 상태로 유지된 것은 FPP의 생체내에서의 역할을 분명하게 보여주는 것으로 사료된다. 사람의 정액 내에 존재하는 FPP 50 nM 내외의 농도에서⁶ 위와 같은 결과를 얻은 것으로 보아, FPP를 인공수정기술 등에 적용할 수 있음을 시사한다. 실험 결과에서 FPP 농도간의 침체반응 유기율에서 기복이 나타나는 것은 실험에 참여한 환자들의 수정능력이 검증되지 않은 상태에서 전체 정자를 종합하여 분석에 사용하였기 때문이라고 생각된다.

정자는 부정소 또는 정액에서 수정능력획득을 억제하는 decapacitation factor에 의해 사정되기 전에 정자의 수정능력획득이 억제되는 것으로 보고되고 있다.^{11,17,18} 이러한 물질은 사정 후 정자에서 분리되어 결과적으로 수정이 가능한 상태로 만들게 된다. 또한 FPP는 전립선에서 생성되어 정액에서 정자와 만나게 되며, 여성의 생식수관 내로 사

정된 후 decapacitation factor는 이때 정자와 분리되어지나, FPP는 남아 점진적인 수정능력획득을 돕고 침체반응 유기를 억제하여 주는 것으로 이해된다. 체내에서, 보다 더 높은 수정률을 위해서는 최종적으로 난자 주위에 많은 정자가 도달하여야만 할 뿐만 아니라 반드시 침체반응이 일어나지 않은 상태이어야만 한다. 이는 운동성을 유지하고 있다 하더라도 침체반응이 난자에 도달하기 전에 유발되면 수정할 수 없기 때문이다.^{15,19}

따라서 위의 결과에서 보면 FPP는 uncapacitated 정자를 자극하여 수정능력획득과 운동성을 유지시키고, 일련의 침체반응 유기를 억제하는 기능은 여성의 생식수관 내에서 정자의 수정능력을 유지하는 데 필수적이라고 사료된다. 따라서 지금까지 인공수정기술에서 보여준 낮은 임신률은 정액 내에 존재하는 FPP가 기술준비과정 중에서 상실됨으로 인하여 수정과정이 원활하지 못했던 것으로 사료되며, 전립선내 FPP생성과정의 문제로 인한 정액내 FPP의 양이 불충분하거나 결핍으로 지금까지 알려지지 못한 남성불임의 한 요인이 아닌가 생각된다. 따라서 원인불명의 불임요인으로 분류되는 환자에서 일반적인 정액검사 뿐 아니라 정액내 FPP양을 확인하는 것이 불임진단과정에 포함되어야 한다고 사료된다.

결 론

본 연구자들은 사람의 전립선, 시상하부 그리고 정액 내에서 그 존재가 확인된 FPP (fertilization promoting peptide; pGlu-Glu-ProNH₂)가 사정된 정자에 부착되어, 정자-난자간의 수정과정에서 정자의 수정능력을 유지 또는 향상시키는 역할을 수행하리라는 가설하에 FPP가 냉동 후 해빙한 사람 정자의 운동양태, 수정능력획득 및 침체반응에 미치는 영향을 CASA 장비와 CTC염색방법을 통하여 알아보고자 본 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CASA 장비를 이용한 운동양태변화를 분석하였다. 총운동성 (total motility)은 시간이 경과함에 따라 모든 실험군에서 감소하였고, 대조군과 통계적인 차이는 없었으나 24시간 경과 후에 대조군의 운동성이 급격히 감소하였다. VAP, VSL, VCL과 ALH도 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 BCF, STR과 LIN은 3시간이 경과하면서부터 대조군과 농도에 상관없이 처리군에

서 증가하는 양태를 관찰할 수 있었다. 특히, BCF는 모든 FPP처리군에서 3시간 이후부터 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다 (Figure 1). 한편 progesterone만을 처리한 군은 FPP처리군과 유사한 양태를 보여주었다.

2. FPP의 처리농도와 처리시간에 따른 F, B와 AR-pattern의 변화를 CTC염색방법을 이용하여 분석한 결과 FPP 25~100 nM을 처리한 경우에는 대조군에 비하여 시간이 경과함에 따라 F-pattern에서 B-pattern으로의 전이양상이 뚜렷하게 나타났다. 특히 처리 후 3시간이 경과하면서부터 pattern의 변화가 통계적으로 유의하게 나타났다. Progesterone처리군은 시간이 경과함에 따라 점차 AR-pattern이 유의하게 증가하였으나 FPP처리군에서와 같이 F-pattern에서 B-pattern으로의 전이는 나타나지 않았다.

3. FPP처리시간에 따른 변화양상은 3시간 이후 관찰되었다. 모든 FPP처리군에서 점진적인 B-pattern의 증가가 나타났고, AR-pattern은 증가하지 않는 것으로 확인되었다. Progesterone처리군은 시간이 경과함에 따라 F-pattern에서 AR-pattern으로의 변화가 유의하게 증가하는 양상을 보여주었으나 B-pattern의 변화는 관찰되지 않았다. FPP처리 농도간의 차이는 크게 나타나지 않았다.

이상의 결과로 보아, FPP가 정자의 수정능력 획득과 운동성을 유지시키고, 일련의 침체반응 유기를 억제함으로써, 여성의 생식수관 내에서 정자의 수정능력을 유지하는 데 필수적 역할을 수행한다고 사료된다. 따라서 인공수정시술과정에서 원심분리로 정자를 세척할 때 FPP 일부 또는 전부가 제거됨으로써 임신률에 영향을 미칠 수 있다고 사료되며, 또한 전립선내 FPP생성과정의 문제로 인한 정액 내 FPP의 양이 불충분하거나 결핍되었을 때 남성불임요인이 아닌가를 앞으로 더 연구해 보아야할 것이다. 또한 이러한 FPP의 기능을 불임치료에 응용한다면 보다 더 나은 임상적 결과를 도출할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ashworth RJ. Thyrotrophin-releasing hormone (TRH)-related peptides. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 101: C1-3.
2. Ashworth RJ, Visser TJ, Cockle SM. The TRH-like peptide pGlu-Glu-ProNH₂ is present in por-

cine pituitary but not in reproductive tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 181: 1557-63.

3. Ashworth RJ, Ham J, Cockle SM. The action of pGlu-Glu-ProNH₂ at the level of the pituitary gland. *J Endocrinol* 1993; 137 (Suppl): 122.
4. Cockle SM, Aitken A, Beg F, Smyth DG. A novel peptide, pyroglutamylglutamylprolineamide in the rabbit prostate complex, structurally related to TRH. *J Biol Chem* 1989a; 264: 7788-91.
5. Cockle SM, Aitken A, Beg F, Morrel JM, Smyth DG. The TRH-related peptide pyroglutamylglutamylprolineamide is present in human semen. *FEBS Lett* 1989b; 252: 113-7.
6. Cockle SM, Prater GV, Theford CR: Peptide related to thyrotrophin-releasing hormone (TRH) in human prostate and semen. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1227: 60-6.
7. DasGupta S, OToole C, Mills CL, Fraser LR. Effects of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosomal exocytosis. *Hum Reprod* 1994; 9: 2103-9.
8. Fraser LR, McDermott CA. Ca²⁺-related changes in the capacitation state: a possible role for Ca²⁺-ATPase. *J Reprod Fertil* 1992; 9: 363-77.
9. Green CM, Cockle SM, Watson PF, Fraser LR. Stimulating effect of pyroglutamylglutamylprolineamide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 215-21.
10. Khan Z, Aitken A, del Rio-Garcia J, Smyth DG. Isolation and identification of two neural thyrotrophin releasing hormone-like peptide, pyroglutamylphenylalanylprolineamide and pyroglutamylglutamylprolineamide, from human seminal fluid. *J Biol Chem* 1992; 267: 7464-9.
11. Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 1985; 174: 269-83.
12. Theford CR, Morrel JM, Cockle SM. TRH-related peptides in the rabbit prostate complex during development. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1115: 252-8.
13. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The

- use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1976; 15: 471-6.
14. 강희규, 김묘경, 김동훈, 한성원, 이호준, 김성례, 김문규. 반응성 산소종이 생쥐 정자의 침체반응과 지질 과산화 및 수정에 미치는 영향: (1) Superoxide Anion과 Hydroxideyl Radical의 영향. *발생과 생식* 1999; 3: 177-84.
 15. 계명찬, 김문규. 정자의 수정능력획득 과정동안 정자표면의 albumin의 이탈현상. *동물학회지* 1995; 38: 514-22.
 16. 계명찬, 김문규. 사람의 난포액에 의한 생쥐 정자의 침체반응 유발. *대한불임학회지* 1996; 23(2): 215-22.
 17. 계명찬, 김성례, 김문규. 생쥐 정자의 부정소 통과 과정 중 침체반응 능력의 변화. *발생과 생식* 1997a; 1(1): 57-65.
 18. 계명찬, 김성례, 김문규. 저정낭액이 생쥐 부정소 정자의 침체반응에 미치는 영향. *대한불임학회지* 1997b; 24(1): 27-34.
 19. 김문규, 계명찬, 최규완, 윤현수, 김종흡. 생쥐의 정자 추출물이 정자-난자의 결합에 미치는 영향. *대한불임학회지* 1991; 18(1): 23-34.
-