

Nitroprusside가 인간정자의 생존력, 운동성, Reactive Oxygen Species 발생에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 산부인과학교실

민부기 · 이희민 · 김기석 · 이희섭 · 김홍곤 · 홍기연 · 이봉주

The Effect of Nitroprusside on the Sperm Motility, Viability, and Reactive Oxygen Species Generation

Bukie Min, Heemin Lee, Kiseok Kim, Heesup Lee, Heunggon Kim, Giyoun Hong
and Bongju Lee

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

=Abstract=

Objective: To analyze the direct effect of nitric oxide, generated from sodium nitroprusside, on sperm motility and reactive oxygen species.

Design: Human sperm samples were treated to allow swim-up and washing. And the samples were divided into four aliquots. Each aliquot was incubated with either concentration at 0, 100nM, 10 μ M, 1mM of nitroprusside.

Intervention: Samples were measured chemiluminescence for reactive oxygen species of each aliquot with concentrations at 0, 100nM, 10 μ M, 1mM of nitroprusside at allowing swim-up and washing of sperm.

Main Outcome Measures: Percent motion parameters and viability were assessed at 0, 3, 6, 12, 24 hours incubation.

Results: The percent viability was lower slightly in control group (50.2%) than that in sperm treated with 100nM of nitroprusside(57.5%) at 24 hours after incubation, while was reduced significantly in sperm with concentration of 10 μ M(42.1%) and 1mM(21.3%)of nitroprusside at 6 hours after incubation. And the sperm treated with 1mM of nitroprusside was immotile totally at 6 hours after incubation. The straight line(35.3 \pm 5.6%), the rapid forward(37.2 \pm 6.4%) and the weak curvilinear velocity(9.6 \pm 2.4%)were more favorable comparing with those (32.4 \pm 4.2%, 30.0 \pm 7.8% and 18.0 \pm 4.6% respectively) in control group at 3 hours after incubation, but reduced significantly in sperm treated with 10 μ M and 1mM of nitroprusside. The levels of reactive oxygen species in control(700 c.p.m.) is lower significantly than that in each experimental groups of sperm treated with nitroprusside. And the levels of reactive oxygen species were 2200 c.p.m. in 100nM, 6200c.p.m. in 1 μ M and 12800c.p.m. in 1mM respectively.

Conclusion: These results suggested that the concentration of 100nM of nitroprusside on sperm is beneficial to the maintenance of viability and motile velocity, but detriment in high concentration of 10 μ M or 1mM of nitroprusside.

Key Words: Nitroprusside, Sperm, Reactive oxygen species.

* 이 연구는 96년도 원광대학교 지원 연구비로 이루어졌음.

서 론

생물학적 활성매체로서 포유동물의 체내에서 생성되는 NO(nitric oxide)는 세포 전달매체로서 작용하며 면역계에서는 neutrophil의 기능을 항진시켜 세포의 증식을 억제하거나 세포에 대해 독성을 나타낸다. 또한 NO는 부신 뇌하수체 고환 등에서 주로 생성되며 심 혈관계 조직에서 소정 맥내 leucocytes가 침착하는 것을 방지하고 platelet aggregation을 억제하는 작용이 있으며 평활근 이완과 혈관확장으로 남성의 성기를 확대시키며 testosterone 분비에 영향을 미친다^(1,2,3)고 한다.

생식기의 염증 또는 손상이 있을 때 seminal plasma에서 macrophage, leucocyte의 수가 증가하고 면역반응으로 인해 NO의 생성이 계속적으로 증가하면 다량의 NO가 sperm에 대해 독성을 나타내어 운동성과 생존에 악영향을 주어 남성 불임의 원인이 된다^(4,5,6,7)고 한다.

정자의 기능적 결함이 나타날 때 reactive oxygen species(ROS)등이 생성되며 생화학적 작용에 의해 정자의 원형질막에 손상을 주어^(8,9) 수정능력을 감소시킬수 있으며 NO는 정자의 기능에 손상을 주어 ROS의 생성을 자극한다. 그러나 Hellstrom(1994)등은 NO가 세포에 대해 독성을 나타내는 ROS의 superoxide free radicals와 반응하여 세포독성을 중화하여 세포를 보호할 뿐만 아니라 정자의 운동성 생존력을 향상시킨다⁽¹⁰⁾고 보고한바 있다.

sodium nitroprusside(SNP)는 세포내에서 NO를 생성하는 촉매역할을 하며 혈관 확장과 혈압 강하작용이 있으며 세포내의 SNP농도와 NO의 생성되는량은 비례한다⁽¹¹⁾고 한다. 따라서 고농도의 SNP는 다량의 다량의 NO를 발생시킨다.

NO는 NO synthase효소에 의해 epididymis, 고환 이외에 여러세포에서 생성되며⁽¹²⁾ 그역할이 다양할뿐만 아니라 정자 또는 여러형의 세포에 영향을 미칠것으로 추측된다.

불임여성의 치료를 위한 보조생식술에서 정자의 운동성 또는 생존력을 개선하기 위해 여러방면으로 시도되고 있으며 정자를 처리하는 과정에서 정자에 대해 손상을 줄수도 있다.

본 연구에서는 NO가 sperm에 미치는 영향을 알아내기 위해 인간정자를 swim-up시키는 과정에서 SNP를 농도별로 처리하여 NO의 정자에 대한

해독성 여부를 실험하였다.

재료 및 방법

1. 정자처리

10명의 건강한 남성으로부터 2일 이상 금욕시킴 후 수음에 의해 청결하게 정액을 채취하였다. 각각의 채취된 정액을 실온에서 한시간동안 방치하여 액화시킨다음 HAM's F-10 배양액을 첨가하여 4ml로 마춘후 다시 1ml씩 4개의 시험관에 담았다. 각 시험관은 대조군과 3개의 실험군을 정했으며 정자의 처리과정은 Ham's F-10 배양액을 넣어 부유시키고 400xG로 20분동안 원심분리 한후 상층액을 버리고 정자를 swim-up시키기 위해 정액 침전물이 분산되지 않도록 조심스럽게 1.5ml의 HAM's

F-10 배양액을 넣어 37℃, 5% CO₂ 배양기내에서 30분동안 보육하였다. swim-up으로 운동성 정자가 함유된 상층액을 취하여 다른 시험관에 옮겨 400x G로 20분동안 원심 분리한후 같은과정을 반복하여 정자를 세척하였다.

2. Sodium nitroprusside의 농도와 정자의 분석

각각 처리한 정자를 SNP를 첨가하지 않은 대조군과 SNP를 첨가한 3개의 실험군으로 분류하였는데 실험군에서 Nitroprusside(SIGMA: sodium nitroferrocyanide; dehydrate form)를 100nM, 10μM, 1mM의 농도로 첨가한 각각의 배양액에서 정자를 실험하였다.

대조군과 각각의 실험군은 37℃ 5% CO₂, 보육기에서 1, 3, 6, 12, 24시간 동안 보육하여 정자의 운동성, 정자의 유속을 관찰하였다. 정자분석은 WHO의 기준에 의해 판정하였고⁽¹³⁾ 7μl의 검체를 Makler counting chamber위에 떨어뜨린후 200배율의 현미경에 고정시키고 cell track sperm analyzer와 computer assisted videomicrography장치를 이용하여 정자의 운동성 유속을 분석하여 백분율로 표시하였다.

3. Reactive oxygen species의 측정

대조군과 실험군에서 처리된 각각의 정자를 500μl 취하여 eppen dorff tube에 넣고 형광물질인 luminol 1μl를 첨가하여 500μl BWW배지와 Ca⁺⁺와 Mg⁺⁺가 함유된 BWW 500μl를 넣어 3분동안 실온에서 방치하였다. Luminol과 반응하는 ROS

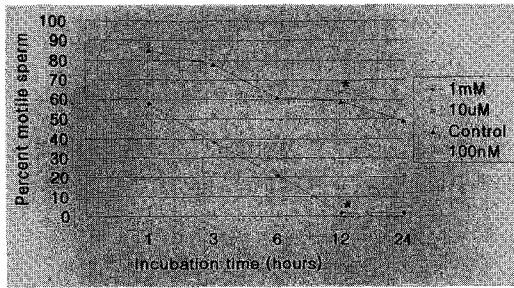


Fig. 1. The effect of S.N.P on sperm motility over-time at various times of incubation. Difference between each group of S.N.P is $P < 0.05$.

의 형광도를 측정하기 위해 Lumino-meter를 이용하였다.

4. 통계처리

실험결과는 백분율의 중앙값을 구하여 표준편차로 가감하였고 student's t-test로 통계 분석하여 $P < 0.05$ 를 의미있는 신빙도로 판정하였다.

결 과

1. 정자의 운동성 생존력에 관한 SNP의 영향

여러농도의 SNP로 처리한 정자를 각각 1, 3, 6, 12, 24시간 보육시킨후 정자의 운동성 유속과 생존력을 비교 관찰하였다.

100nM농도의 SNP로 처리한 정자의 운동성 및 생존력은 SNP를 첨가하지 않은 비교군에 비해 우수하였고 24시간 보육후 정자의 운동성 생존력은 $57.5 \pm 7.2\%$ 로 비교군의 $50.2 \pm 6.7\%$ 보다 양호하였다.

또한 10 μ M과 1mM농도의 SNP로 처리한 정자를 3시간동안 보육한후 정자의 운동성은 각각 $53 \pm 8.3\%$, $38.0 \pm 7.1\%$ 로 저하되었고 6시간 보육후에는 $43.1 \pm 6.4\%$, $22.2 \pm 4.8\%$ 로 현저히 저하되었으며 특히 1mM농도로 처리하였을때 12시간 보육후 모든 정자가 운동성이 정지되었다(그림 1).

2. 정자의 운동 유속에 대한 SNP의 영향

실험군과 대조군에서 3, 6시간 보육후 운동성 정자의 직선유속(straight line velocity) 신속 전진유속(rapid straight velocity)와 미약 곡선유속(weak curvier velocity)을 분석하였다.

3시간 보육후 정자의 직선유속, 신속 전진유속과 미약 곡선유속은 대조군에서 각각 $32.4 \pm 5.2\%$,

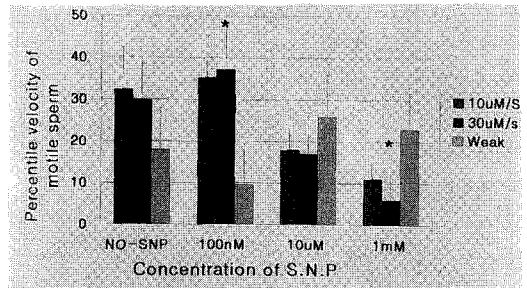


Fig. 2. The effect of S.N.P on velocity of motile sperm at 3hrs. after incubation. *Significant difference ($P < 0.05$).

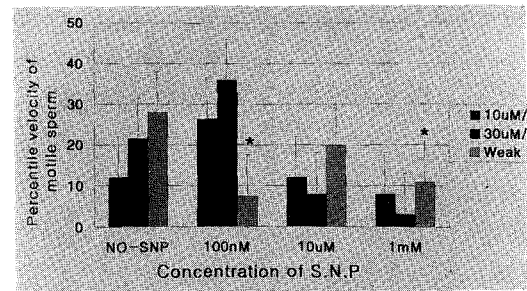


Fig. 3. The effect of S.N.P on velocity of motile sperm at 6hrs. after incubation. *Significant difference ($P < 0.05$).

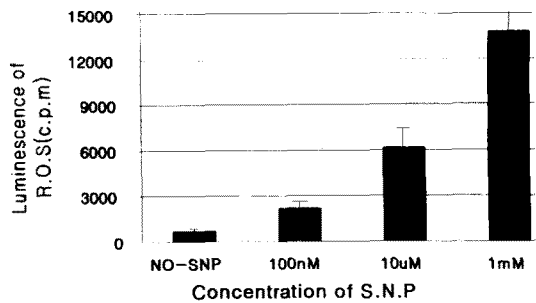


Fig. 4. The effect of S.N.P on R.O.S generation of sperm at 1hrs. after incubation.

$30.0 \pm 7.8\%$, $18.0 \pm 4.6\%$ 이었고 100nM농도에서는 $35.3 \pm 5.6\%$, $37.2 \pm 6.4\%$, $9.6 \pm 2.4\%$ 로 대조군에 비해 약간 양호 한편이었다. 10 μ M과 1mM농도에서는 운동성 정자의 유속이 저조하였고 특히 1mM농도에서는 대조군이나 100nM농도에 비해 현저히 미약 곡선유속의 비율이 높았다($P < 0.05$) (그림 2).

또한 6시간 보육후 운동성 정자의 유속은 대조군에서 직선유속, 신속전진유속과 미약 곡선유속은 각각 $12.0 \pm 4.8\%$, $21.4 \pm 6.7\%$, $28.0 \pm 4.7\%$

로 보육시간이 길어질수록 미약곡선 유속운동정자의 비율이 증가 한 반면 100nM농도에서는 26.4±4.7%, 36.0±4.2%, 7.5±2.7%로 일정기간의 보육 시간에 대해 영향을 받지 않는것으로 관찰되었다.

그러나 10μM과 100mM농도에서는 미약 곡선 유속 운동정자의 비율이 증가하였다(그림 3).

3. ROS의 생성에 대한 SNP의 영향

대조군과 각각의 실험군에서 1시간 보육후 ROS의 생성량을 측정하였다.

대조군에서 ROS량은 700cpm(counts per minute) 이였고 100nM농도의 정자는 2200cpm , 10μM농도에서 6200cpm, 1mM농도에서 13800c.p.m으로 SNP가 첨가되지않은 대조군에서 제일 낮았고 SNP의 농도가 높을수록 ROS의 생성량은 증가하여 1mM농도에서 ROS의 양은 대조군의 약 20배 이고 100nM농도의 ROS양보다 약 3.3배 높았다(그림4).

고 찰

NO는 생체내에서 생물학적으로 특성을 나타내어 여러 생리적 과정에 신호 전달물질로 작용하며 세포내의 cGMP(guanosine-3',5'-cyclic monophosphate)를 생성시켜 sperm metabolism 관여하여 sperm의 운동성에 영향을 미친다⁽¹⁴⁾고하며 cGMP가 mitochondria내에서calcium을 유리시킬 때 ATP energy가 발생하여 sperm의 운동성이 나타난다^(15, 16)고 한다.

NO는 생체내에서 NO synthase 작용으로 L-arginine에 의해 합성되어 주로 neural cell, endothelial cell 등에서 세포내의 calcium 역가치가 증가할때 활성화되어 발생한다^(16, 17)고 한다.

SNP는 혈압 강하작용이 있는 제제로서 화학적 분해과정에 의해 NO를 발생시키는것으로 알려져 왔으며 최근에 세포 또는 세포막에서 SNP가 신진대사 과정을 촉매역할하여 NO를 발생시킨다^(18, 19)고 하는데 실제로 SNP가 세포내에서 NO를 발생시키는 기전은 확실히 밝혀지지 않았다.

병리학적 측면에서는 전신성 염증이나 자궁 내막증과 같은 국소적 염증이 있을때 감염인자로서 cytokines, endotoxin이 NO의 생성을 증가시키고 NO는 세포에서 mitochondrial respiration과 DNA생성을억제시켜 세포정지 또는 세포독성의

작용을 나타낸다^(16, 17)고 한다. Tomlinson 등(1992)에 의하면 SNP가 sperm의 motility를 저하 시킨다⁽¹⁸⁾고 하였고 Marinella(1995) 등도 SNP로 인간 정자를 처리하였을때 그농도가 증가함에 따라 정자의 운동성과 생존력이 감소하였으며 따라서 NO는 인간정자에 대해 독성을 나타낸다⁽¹⁹⁾고 보고하였다. 특히 ROS는 peroxid-ative 막에 손상을 주어서 lipid peroxidation을 증가시키며 이때 ATP가 유리되어 정자의 운동성을 저하시켜서 수정능력을 감소시킨다⁽²⁰⁾고 한다. 그러나 Hellstrom등⁽¹⁰⁾은 SNP로부터 발생한 NO가 정자의 운동성 생존력을 향상시켰으며 이러한 현상은 free sperm에서 세포독성을 나타내는 superoxide dismutase와NO가 서로 반응하여 중화작용을 일으키기 때문이라고 보고하였다.

결 론

정자를 SNP 100nM의 농도로 처리하였을때 대조군에 비해 생존력과 운동성 유속을 유지하는데 우수하였으며 10μM이나 1mM의 고농도에서 처리하였을때 정자의 생존력과 운동성유속은 현저하게 저하하였다. 따라서 저농도의 NO는 인간정자에 유익한 역할을 하지만 고농도의NO생성은 정자에 대해 독성을 나타냈다.

인 용 문 헌

- Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR: L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selctive metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138, 550-65, 1987.
- Adams MI, Nock B, Truong R, Cicero TJ: Nitric Oxide control of steroidogenesis: endocrine effect of N-nitro L-arginine and compar-isons to alcohol. *Life Scin* 50, PL35-40, 1992.
- McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR, Mocade S: Synthesis of Nitric Oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochem J* 261, 293-6, 1989.
- Baratt CLR, Bolton AE, Cook LD: Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Human Reproduction* 5, 639-48, 1990.

- Glezerman M, Bartoov B: Semen analysis. In Insler, V. and Lunenfeld B. (eds), *Infertility, Male and Female*, 2nd eds. *Churchill Livingstone, Edinburgh* 285-315, 1993.
- Nussler AK Billiar TR: Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leucocyte Biol* 54, 171-8, 1993.
- Marinella R, Raghendra KD, Bruno I, Ervin M, Paul JK: Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Human Reproduction* 10, 1786-90, 1995.
- Aitken RJ, Clakson JS: Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81, 459, 1987.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl Acad Sci USA* 88, 4651, 1991.
- Hellstrom WJG, Bell M, Wang R, Sikka SC: Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertil Steril* 61, 1117-1122, 1994.
- Mark GS, McLaughlin BE, Brown LB, Beaton DE, Nakatsu K, Brien JF: Interaction of glycerol trinitrate and sodium nitroprusside with bovine pulmonary vein homogenate and 10,000xg supernatant: biotransformation and nitric oxide formation. *Can. J. Physiol Pharmacol* 69, 889-92, 1991.
- Burnett AL, Ricker DD, Tillman SL, Crone JK, Bredt DS, Snyder SH et al: Histochemical distribution of nitric oxide synthase in the reproductive tissues of the male rat. *Biol Reproduction* In Press.
- World Health Organization: *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, 1992.
- Miller RL Sperm chemo-orientation in the metazoa. In: *Biology of fertilization*. New York: Academic press, 275-316, 1985.
- Huszar G, Corrales M, Vigue L: Correlation between sperm creatinine phosphokinase activity and sperm concentrations in normo-spermic and oligo-spermic men. *Gamete Res* 19, 67-75, 1988.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharma Rev* 19, 67-75, 1991.
- Hibbs JB Jr, Tanitor RR, Vavrin Z, Granger DL, Drapier JC, AqMBER J, Lancaster JR Jr: Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidine nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In Moncada S. and Higgs E. A.(eds.), *Nitric oxide from L-arginine: A Bioregulator System*. *Elsevier Amsterdam* 189-223, 1990.
- Kowulak EA Seth P, Fung HL: Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J Pharma Exp Ther* 262, 916-922, 1992.
- Tomlinson MJ, East SJ, Barrat CLR, Bolton AE, Cook ID: Preliminary communication: possible role of reactive nitrogen intermediates in leukocyte-mediated sperm dysfunction. *Am J Reprod. Immunol* 27, 89-92, 1992.
- Wu FCW, Aitken RJ, Fergusson A: Inflammatory bowel disease and male infertility: effects of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid on sperm-fertilizing capacity and reactive oxygen species generation. *Ferti Steril* 52, 842-5, 1989.