

## 생쥐 정자의 운동성에 미치는 Calcium과 dbcAMP의 영향

한양대학교 자연과학대학 생물학과 · 충북대학교 자연과학대학 생물학과\*

김문규 · 오승훈 · 계명찬 · 윤현수 · 이준영\*

### Effects of Calcium and dbcAMP on Sperm Motility in Mouse

Moon K. Kim, Seung H. Oh, Myung C. Gye, Hyun S. Yoon and Joon Y. Lee\*

*Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea*

*Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungbuk University, Chungju 360-763, Korea*

#### = Abstract =

In order to study the effects of  $Ca^{++}$  and dbcAMP on sperm motility, cauda epididymal spermatozoa of mouse were incubated in the media containing the various concentrations of  $Ca^{++}$  and dbcAMP, and its motility were observed and analyzed.

The rate(%) of the sperm with forward motility which may be fertile, reached at the equilibrium state in 30-60 min. after the beginning of incubation.  $Ca^{++}$  requirement for the maintenance of sperm motility obviously appeared in 3hrs. after the beginning of incubation. In the medium containing 0.01mM  $Ca^{++}$ , the rate of sperm forward motility was highest(30.6-40.6%), whereas in 10mM  $Ca^{++}$  medium, the rate was rather reduced because of a severe agglutination phenomenon.

On the other hand, 1mM dbcAMP in the medium was significantly effective for the maintenance of sperm forward motility.

#### 서 론

포유동물의 정자는 부정소에서 성숙됨에 따라 운동 능력을 얻게 되며(Hoskins et al., 1978), 수정시까지 수정능력 획득과 첨체반응의 과정을 거치면서 정자의 운동성이 변화하게 된다(Johnson et al., 1981; Yanagimachi, 1981; Suarez et al., 1983, 1984). 즉 부정소의 기부에서 운동능력을 얻게된 정자는(Bedford, 1975; Hoskins et al., 1979; Yeung, 1984) 정자 자체내에 존재하는 물질들에 의해서 운동성이 조절되기도 하나 정자가 처한 자성, 융성생식 수관내의 환경이 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다(Overstreet et al., 1980; Johnson et al., 1981).

일정한 자극에 의해서 정자의 운동성이 변화되는 현상을 정자운동의 재활성화(reactivation)

\*본 연구는 1988년도 문교부 기초과학 육성 연구비와 교내연구비 지원에 의한 것임.

또는 고탈성화(hyperactivation)라고 보고하였고(Overstreet et al., 1980; Yanagimachi, 1981; Suarez et al., 1983, 1984), 이때 운동양상을 forward, whiplash, progressive 및 biphasic pattern으로 정의하였다(Yanagimachi, 1970; Yanagimachi and Usui, 1974; Fraser, 1977, 1981; Johnson et al., 1981). 이러한 현상에 대한 의미성은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 수정 능력 획득(Yanagimachi, 1981; Suarez et al., 1983, 1984)과 첨체 반응(Brokaw, 1979; Okuno and Brokaw, 1981)시 수반되는 현상으로 추론하고 있으며 이는 특히 난자의 투명대 관입에 중요한 것으로 보고하였다(Fleming, 1980; Fraser, 1981).

Calcium과 dbcAMP가 정자의 운동성을 조절하는데 관여한다고 보고하였다. 즉, 운동성이 없는 hamster의 부정소 두부 정자는 calcium에 의해 운동성이 유발되며(Mohri and Yanagimachi, 1980) 또한 성계의 정자도 고탈성화 시킨다고 보고하였다(Brokaw, 1981). 그리고 dbcAMP는

hamster의 경우, 부정소 미부 정자와 사출된 정자의 운동성을 재활성화시켰으며 (Mohri and Yanagimachi, 1980), 소와 양의 정자에서도 동일한 결과를 나타낸 것으로 보고하였다(Hoskins et al., 1971; Amann et al., 1982). 생쥐의 정자도 수정능력 획득시 운동성이 활발하게 되며, dbcAMP가 수정능력을 획득하는 시간을 단축시켰으며(Fraser, 1977, 1981), calcium도 수정능력을 획득하는데 필요하고(Fraser, 1982) 이때의 운동성을 유지하는데 작용한다(Heffner et al., 1981)고 보고하였다. 그러나 이들 calcium과 dbcAMP가 정자의 운동 양상의 변화와 직진 운동성에 어떻게 관여하는가에 대한 보고는 아직 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구는 calcium과 dbcAMP가 생쥐 부정소 미부정자의 운동성에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 동물은 한양대학교 생물학과에서 사육된 생후 3개월 된 생쥐(ICR Strain)의 수컷으로 체중이 30g 내외인 건강한 것을 택하였다. 정자의 채취는 생쥐를 경추파괴로 도살한 후 부정소미부를 적출하여 배양액(BWW, Biggers et al., 1970)이 담긴 해부접시에 옮겨 몇 군데 가위질 한 후 핀셋으로 짜내어 정자를 수확하였다.

수확된 정자를 시험관(Pyrex, 12×75mm)에

넣어 배양기내(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air)에서 15분간 정치하여 현탁 상태로 만든 후 상등액만을 취하여 400 G에서 10분간 원심분리하였다. 세척된 정자는 여러가지 농도의 calcium(0.01, 0.1, 1.71, 10mM)와 dbcAMP(0.001, 0.01, 0.1, 1mM)가 첨가된 배양액으로 재현탁시키고 앞서와 같이 세척하였다. 침전된 정자는 각각의 농도별 배양액으로 현탁액(1~1.5×10<sup>6</sup> 정자/ml)을 만들어 Brinster(1963)의 방법을 이용하여 정자를 배양하였다.

일정한 시간간격(0, 30, 60, 90, 120분)으로 정자현탁액을 취해 광학현미경하(400배)에서 haemocytometer를 사용하여 정자수를 계수하고, 운동성을 관찰하여 의미적으로 직진(forward), 회전(spiral) 및 비(non)운동성으로 분류하였다. 직진과 회전운동성을 합하여 총운동성이라 정의하였으며 모든 운동성은 백분율로 표시하였다. 그리고 유의성 검정은 Student's t test로 하였으며 P<0.05인 경우를 유의하다고 보았다.

## 결 과

### 1. 정자의 운동성에 미치는 calcium의 영향

대조군과 10mM calcium을 처리한 실험군에서 정자의 총운동성은 시간이 경과함에 따라 현저하게 감소하였으나 그 외의 실험군(0.01, 0.1, 1.71mM)에서는 유의한 변화가 없었다. 그리고 대조군의 총운동성에 비해서, 1.71mM과 10mM calcium을 처리한 실험군의 총운동성은

Table 1. Percentage of forward and total motility of the mouse epididymal spermatozoa incubated in the media(BWW) containing various concentrations of Ca<sup>2+</sup>

Patterns of Motility	Incubation Time(Min)	Ca <sup>2+</sup> Concentration (mM)				
		Control	0.01	0.1	1.71	10
Forward	0	*48.4±6.9	36.0±3.0	45.2±6.9	37.2±5.8	38.8±4.8
	30	32.4±7.1	39.8±4.4	26.6±5.8	26.2±1.2	18.2±3.7
	60	19.4±5.9	39.8±5.4 <sup>a</sup>	22.6±4.9	17.2±1.8	12.4±3.1
	90	16.8±3.6	40.6±4.8 <sup>a</sup>	21.8±3.9	14.4±1.4	8.4±3.0
	120	11.4±2.0	33.2±5.6 <sup>a</sup>	13.4±4.2	14.4±4.0	8.2±2.1
	150	18.6±3.6	33.8±5.9 <sup>a</sup>	25.6±5.7	13.4±2.7	5.2±3.2
Total	180	4.8±3.1	30.6±3.4 <sup>a</sup>	14.6±5.1	15.2±3.2	1.4±1.3
	0	83.0±2.8	71.4±3.8	61.0±6.1	62.8±3.2	59.4±2.4
	30	61.0±5.0	68.2±6.2	55.4±3.0	55.4±5.6	49.2±6.1
	60	61.6±5.4	68.2±4.4	57.4±6.4	40.6±5.3	37.8±1.3 <sup>a</sup>
	90	58.4±6.8	67.2±4.5	55.6±7.8	52.6±5.7	28.6±3.1 <sup>a</sup>
	120	58.0±1.6	59.8±3.0	52.2±9.9	44.8±6.1	27.4±2.5 <sup>a</sup>
	150	66.6±3.9	70.6±2.2	52.6±6.5	56.0±8.3	25.2±4.7 <sup>a</sup>
	180	52.8±7.7	68.8±4.0	56.2±8.4	55.8±2.3	20.2±4.8 <sup>a</sup>

\*Mean ± SE (%), n=5, a; p<0.05

크게 억제되었으나 0.01mM과 0.1mM calcium의 실험군에서는 유의한 차이가 없었다(Table 1, Fig. 1).

시간이 경과함에 따라 대조군과 실험군(0.1, 1.71, 10mM)의 직진 운동성은 크게 감소하였으나, 0.01mM의 실험군에서는 유지되는 경향을 보였으며 대조군에 비해서 직진 운동성은 유의하게 높았다(Table 1, Fig. 2).

## 2. 정자의 운동성에 미치는 dbcAMP의 영향

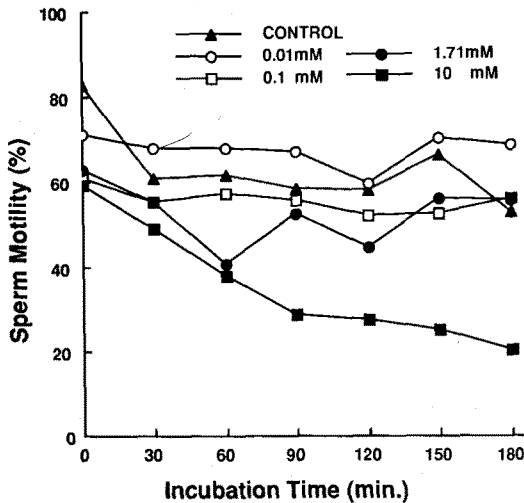


Fig. 1. The effect of  $Ca^{2+}$  on total motility of cauda epididymal spermatozoa in the mouse.

총운동성은 시간이 경과함에 따라서, 대조군과 실험군(0.001, 0.01mM)의 경우에는 크게 감소하였으나 0.1mM과 1mM의 dbcAMP를 처리한 실험군에서 나타난 총운동성은 대조군에 비해서 유의하게 높았다(Table 2, Fig. 3).

대조군과 실험군(0.001, 0.01, 0.1mM)의 직진 운동성은 시간이 경과함에 따라 현저히 감소하였으나 1mM의 dbcAMP를 처리한 실험군에서는 직진 운동성만이 유지되었다. 또한 대조군의 직진 운동성에 비해서도 1mM의 dbc-

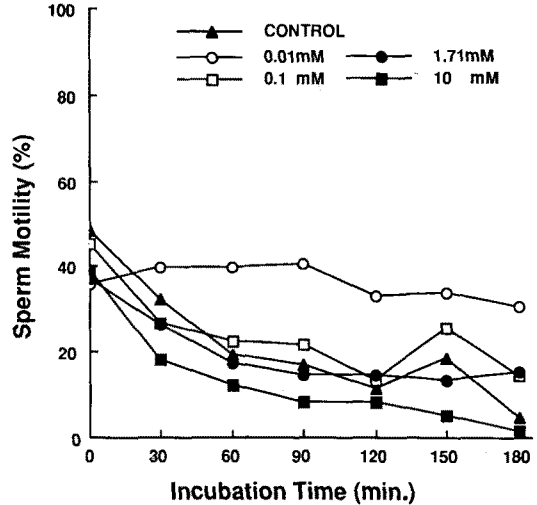


Fig. 2. The effect of  $Ca^{2+}$  on forward motility of cauda epididymal spermatozoa in the mouse.

Table 2. Percentage of forward and total motility of the mouse epididymal spermatozoa incubated in the media(BWW) containing various concentrations of dbcAMP

Patterns of Motility	Incubation Time(Min)	dbcAMP Concentration (mM)				
		Control	0.001	0.01	0.1	1
Forward	0	*42.4 ± 5.0	38.6 ± 4.6	47.0 ± 5.1	38.2 ± 6.9	37.4 ± 7.4
	30	20.4 ± 4.9	11.0 ± 4.5	34.4 ± 8.5	22.6 ± 6.9	37.4 ± 3.8 <sup>a</sup>
	60	14.2 ± 4.3	7.6 ± 4.8	22.8 ± 4.6	16.4 ± 3.5	35.6 ± 2.9 <sup>a</sup>
	90	14.4 ± 2.6	17.0 ± 4.3	20.4 ± 3.7	16.8 ± 4.6	28.0 ± 7.6 <sup>a</sup>
	120	14.6 ± 3.2	12.6 ± 3.3	15.6 ± 6.2	18.4 ± 3.0	40.0 ± 6.2 <sup>a</sup>
	150	14.6 ± 2.8	12.6 ± 4.5	21.4 ± 3.4	16.4 ± 3.3	46.0 ± 4.4 <sup>a</sup>
	180	11.4 ± 3.1	11.0 ± 3.0	17.4 ± 1.7	17.0 ± 2.4	36.8 ± 4.3 <sup>a</sup>
Total	0	64.6 ± 5.7	60.8 ± 6.6	67.8 ± 4.4	59.8 ± 8.2	62.4 ± 6.0
	30	47.8 ± 6.7	46.8 ± 6.6	54.2 ± 6.5	52.4 ± 5.2	67.6 ± 2.8 <sup>a</sup>
	60	45.6 ± 5.5	38.2 ± 3.4	64.0 ± 1.7	59.0 ± 6.6	67.6 ± 5.9 <sup>a</sup>
	90	48.4 ± 8.7	41.8 ± 3.2	49.8 ± 5.0	56.0 ± 5.7	68.0 ± 5.0 <sup>a</sup>
	120	51.0 ± 8.7	41.8 ± 3.2	49.8 ± 5.0	56.0 ± 5.7	68.0 ± 5.0 <sup>a</sup>
	150	46.6 ± 5.3	44.0 ± 6.0	48.6 ± 8.4	53.8 ± 8.2	71.6 ± 4.2 <sup>a</sup>
	180	47.6 ± 5.1	38.0 ± 6.2	46.8 ± 6.1	49.0 ± 5.9	65.6 ± 4.5 <sup>a</sup>

\*Mean ± SE (%), n=5, a; p<0.05

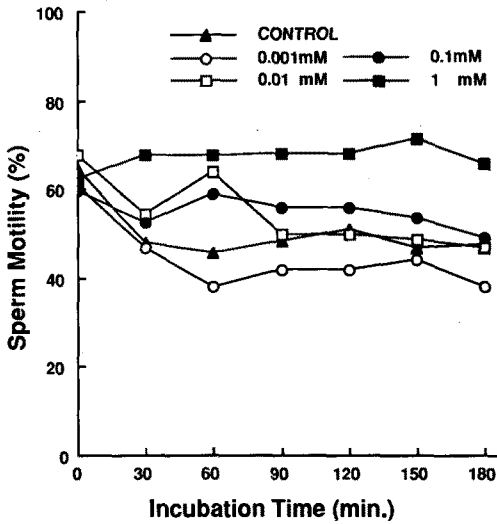


Fig. 3. The effect of dbcAMP on total motility of cauda epididymal spermatozoa in the mouse.

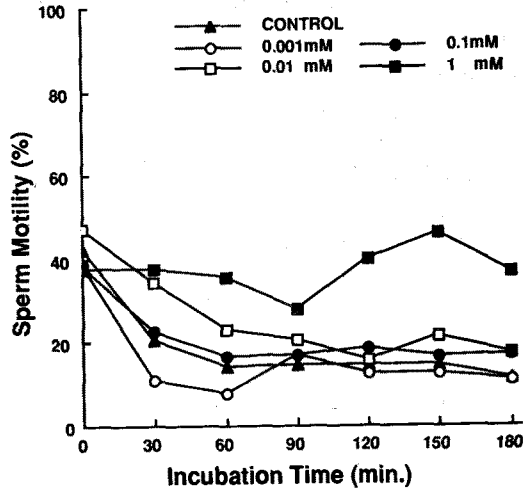


Fig. 4. The effect of dbcAMP on forward motility of cauda epididymal spermatozoa in the mouse.

AMP의 실험군만이 유의하게 높은 운동성을 보였다(Table 2, Fig. 4).

## 고찰

수정능력 획득시 생쥐 정자의 운동성은 고활성화되어 변화하게 되며(Fraser, 1981; Yanagimachi, 1981), 이러한 현상은 토끼(Johnson et al., 1981), hamster (Suarez et al., 1984) 그리고 guinea pig (Summers et al., 1976; Talbot et al., 1976)등에서도 동일한 현상이 보고되었다.

0.01mM calcium을 처리한 실험군의 직진 운동성이 대조군에 비해 유의하게 증가된 것은 calcium을 배양액에 처리하여 정자의 고활성화가 유발되고 지속되었다는 연구들(Summers et al., 1976; Talbot et al., 1976)과 일치하며, 고농도(1.71, 10mM)의 calcium처리한 실험군에서 오히려 총운동성이 감소하였던 것은 calcium과 albumin등이 사출된 토끼 정자의 agglutination을 촉진시켜 정자의 운동성을 감소시킨 것으로 사료된다. 또한 1mM dbcAMP를 처리한 실험군의 운동성이 대조군에 비해 유의하게 높은 것은 정자의 운동성을 활성화시키는 데에 cyclic nucleotide가 효과적이라는 보고 (Rosado et al., 1974; Toyoda and Chang, 1974; Mohri and Yanagimachi, 1980)와 일치한다. 그러나 0.1mM 농도 이하의 실험군에서 대조군에 비해 유의한 차이가 없었던 것은 운동성을 유지시키기 위해

서는 배양액내에 1mM이상의 dbcAMP가 첨가되어야 하는 것으로 사료된다.

수정능력 획득에 필요한 시간은 생쥐의 정자는 1시간(Fraser, 1977), 토끼와 원숭이의 경우는 5-6시간 (Rosado et al., 1974)으로 보고하였다. 이들 보고들과 동일하게 본 시험의 결과도 calcium을 처리한 실험군에서는 30분만에 정자의 운동성이 평형에 도달하였다. dbcAMP가 calcium보다 효과가 더 빠른것은 dbcAMP의 실험군이 정자를 배양하기 전까지 정자수확과 세척과정에서 이미 calcium의 영향을 받아 평형도달 시간이 단축되었던 것으로 추론된다.

본 연구를 통하여 calcium은 저농도(0.01mM)로 그리고 dbcAMP는 고농도(1mM)로 처리하였을 때 생쥐 정자의 운동성이 증가됨을 알 수 있었다. 아울러 정자의 운동성을 높이고 수정율을 높이기 위해서는 정자의 생존에 적합한 배양액과 운동성의 판정방법이 개발되어야 할 것이다.

## 결론

생쥐 부정소 미부 정자의 운동성에 미치는 calcium과 dbcAMP의 영향을 알아 보고자 calcium과 dbcAMP가 농도별로 첨가된 배양액(BWW)에서 생쥐 정자를 일정시간 배양하여 이의 운동성을 관찰하고 분석한 결과는 다음과 같다. 수정능력이 있는 직진 운동성 정자는 배양후

30-60분 내에 평형에 도달하였다. 정자의 직진 운동성의 유지에  $Ca^{++}$ 이온의 필요성은 배양 후 3시간에 이르러 뚜렷이 나타났고 배양액내  $Ca^{++}$ 이온 농도가 0.01mM 일때 가장 높은 (30.6-40.6%) 정자의 운동성을 유지한 반면, 10mM인 때에는 정자간의 응집현상이 심하여 오히려 정자의 운동성이 저하되었다.

한편 배양액내 1mM dbcAMP는 정자의 직진 운동성을 유지하는데 유의한 효과가 있었다.

### 참 고 문 헌

Aman, R.P., Hay, S.R. and Hammerstedt, R.H.: *Yield, Characteristics, motility and dbcAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. Biol. Reprod.* 27: 723-733, 1982.

Bedford, J.M.: *Maturation, transport and fate of spermatozoa. In: "Handbook of Physiology: Endocrinology." Green, R.O. and D.W. Hamilton(eds), American Physiology Society, Washington, D.C., pp. 303-317, 1975.*

Biggers, J.D., Whitten W.K. and Whittingham, D.G.: *The culture of mouse embryos in vitro. In: "Methods in Mammalian Embryology." Daniel Jr., J.C.(ed) Academic Press, New York, pp. 86-116, 1970.*

Brinster, R.L.: *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp. Cell Res.* 32: 205-208, 1963.

Brokaw, C.J.: *Calcium-induced quiescence in re-activated sea urchin spermatozoa. J. Cell Biol.* 82: 401-411, 1979.

Brown, D. J. and Senger, P. L.: *Influence of incubation in vitro on motility and head-to-head agglutination of ejaculated rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fert.* 66: 283-289, 1982.

Dudenhause, E. and Talbot, P.: *Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm. Game. Res.* 6: 257-265, 1982.

Fleming, A.D. and Yanagimachi, R.: *Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa. J. Exp. Zool.* 220: 439-444, 1982.

Hoskins, D.D., Stephens D.T. and Hall, M.L.: *Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine sperm-*

*atozoa. J. Reprod. Fert.* 37: 131-133, 1974.

Hoskins, D.D., Brandt H. and Acott, T.S.: *Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. Fed. Proc.* 37: 2534-2542, 1978.

Hoskins, D.D., Johnson, D., Bradat, H. and Acott, T.S.: *Evidence for a role for a forward motility protein in the epididymal development of sperm motility. In: "The Spermatozoon." Baltimore-Munich, Urban and Schwarzenberg, pp. 43-53, 1979.*

Johnson, L.L., Katz, D.F. and Overstreet, J.W.: *The movement characteristics of rabbit spermatozoa before and after activation. Game. Res.* 4: 275-282, 1981.

Mohri, H. and Yanagimachi, R.: *Characteristics of motor apparatus in testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa. Exp. Cell Res.* 127: 191-196, 1980.

Okuno, M. and Brokaw, C.J.: *Calcium-induced change in the demembrated sea urchin sperm flagella immobilized by vanadate. Cell Motil.* 1: 349-363, 1981.

Overstreet, J.W., Katz D.F. and Johnson, L.L.: *Motility of rabbit spermatozoa in secretion of the oviduct. Biol. Reprod.* 22: 1083-1088, 1980.

Rosado, A., Hicks, J.J., Reyes, A. and Blanco, I.: *Capacitation in vitro of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. Fertil. Steril.* 25: 821-824, 1974.

Suarez, S.S., Katz, D.F. and Overstreet, J.W.: *Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. Biol. Reprod.* 29: 1277-1287, 1983.

Suarez, S.S., Katz, D.F. and Meizel, S.: *Changes in motility that accompany the acrosome reaction in hyperactivated hamster spermatozoa. Game. Res.* 10: 153-265, 1984.

Summers, R.G., Talbot, P., Keough, E.M., Hylander B.L. and Franklin, L.E.: *Ionophore A 23187 induces acrosome reactions in sea urchin and guinea pig spermatozoa. J. Exp. Zool.* 196: 381-385, 1976.

Talbot, P., Summers, R.G., Hylander, B.L., Keough, E.M. and Franklin, L.E.: *The role of*

- calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A 23187. *J. Exp. Zool.* 198: 383-392, 1976.
- Toyoda, Y. and Chang, M.C.: Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 36:125-134, 1974.
- Yanagimachi, R.: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fert.* 23:193-196, 1970.
- Yanagimachi, R. and Usui, N.: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 89: 161-174, 1974.
- Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals. In: "Fertilization and Embryo Development In Vitro." Mastroianni, L. and J.D. Biggers (eds), New York, Plenum, pp. 81-182, 1981.
- Yeung, C.H.: Effects of cyclic AMP on the motility of mature and immature hamster epididymal spermatozoa studied by reactivation of the demembrated cells. *Game. Res.* 9:90-114, 1984.
-