

精液의 蛋白質含量과 酵素活性도에 관한 研究

Studies on protein contents and enzyme activities of human seminal plasma

서울大學校 醫科大學 泌尿器科學教室 및 서울大學校 人口醫學研究所

朴圭鎡·李熙永

서론

사람의 정액은 정자의 모유와 같은 것으로 남성 생식기인 정낭, 전립선, 정관, 부고환과 같은 부성선과 고환인 성선등에서 분비되는 복합액체이며 1회 사정에 3ml 전후의 양이 배출된다. 그 구성은 수분, 유기질, 단백질, 염류 및 지질등으로 이루어져 있다. 따라서 이 정액의 구성 성분인 화학 성분이나 효소의 활성도를 정량적으로 측정하면, 그 분비 양상이나 분비 이상을 알아낼 수 있다. 또한 정액의 화학 성분이 정자의 농도에 따라 변하기 때문에 정상인, 과정자증 및 정관절제술 후의 정액을 비교 검토하면 불임의 원인을 찾아내는 데 도움을 줄 수 있다.

Masaki와 Hartree (1962)는 정상 황소의 정자효소인 hyaluronidase가 상온에서 정자로 부터 정액으로 흘러 나오게 됨을 관찰하였다. 한편 Swyer (1947)는 이 효소가 정자에만 존재하고 정액에는 존재하지 않는다고 하였다. Gutman (1941)과 Mann (1964)은 사람의 정액속에 존재하는 acid 및 alkaline phosphatase의 양은 정자의 양이 많아짐에 따라 증가한다고 하였다. 이 밖에도 사람의 정액에서 lactic dehydrogenase나 glucose phosphate isomerase 등의 활성도가 정관절제술 전후해서 전히 변화가 없음도 관찰되었다. Eliasson (1966)은 사람의 정액에서 많은 양의 glutamic oxalo acetic transaminase의 활성도가 사정의 첫 부분에서 나타남을 관찰하고, 그는 이것이 주로 전립선에서 분비된다고 추정하였다. 또 Guerin (1981) 등은 무정자증 정액에서 유일하게 결핍된 효소인 α -glucosidase가 부고환에서 유래한다고 하였으며, 따라서 무정자증 정액이 부고환의 기능에 중요한 관련이 있을 것이라고 주장하였다.

본 연구에서는 정자의 acrosome에 존재하여 난자의 방사선충막 침투에 필수적 역할을 하는 어떤 효소들이

정액에도 존재하여 점액성을 낮추므로 정자의 여성 생식기내 운송에 영향을 주고 있는 바 이들 효소의 활성도를 각종 정액에서 측정 비교함으로써 생식능에 미치는 영향을 알아 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 대상

본 연구에서는 정상인 남자와 과정자증, 무정자증 및 정관절제술을 받은 자등, 도합 66예의 정액을 사용하였다. 전체대상자의 정액검사 결과에 따라 실험군을 다음과 같이 6군으로 분류하였다.

제 1군(group I): 16예. 정자수가 $40 \times 10^6/ml$ 이상에, 운동성이 40% 이상, 정상형이 70% 이상인 자.

제 2군(group II): 7예. 정자수는 정상($40 \times 10^6/ml$ 이상)이나, 정자의 운동성이 40% 이하인 자.

제 3군(group III): 15예. 정자수가 $40 \times 10^6/ml$ 이하인 과정자증 환자.

제 4군(group IV): 14예. 무정자증 환자.

제 5군(group V): 10예. 정관절제술을 받은 자.

제 6군(group VI): 4예. 발육부전 고환 2예, Klinefelter씨 증후군 1예 및 고환종양 환자 1예.

대상자는 30세 전후의 청년층이 대부분으로 제 1군에서 제 6군까지 모두 평균 나이가 27~33세 사이의 연령층으로 구성되어 있다(표 1). 간이 표준 고환 측정기로 잰 고환의 평균 크기는 제 1군이 20.4ml, 제 2군이 18.6ml, 제 3군이 19.1ml, 제 4군이 11.2ml, 제 5군이 20.5ml, 그리고 제 6군이 7.5ml가 된다(표 2).

2. 시약

이 연구에서 효소의 기질로 사용된 hyaluronic acid, benzoyl arginine ethyl ester, p-nitrocatechol sulfate, p-nitrophenyl- β -glucuronide 및 p-nitrophenyl- β -N-acetyl-D glucosaminide등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구득한 것이다. 또 일반적인 단백질 분해효소의 기질인 azocoll은 Calbiochem.

† 접수일자 : 1983. 5. 7.

Table 1. Age distribution of subjects (No. of subjects)

Age	Group I (Normospermia)	Group II (Asthenospermia)	Group III (Oligospermia)	Group IV (Azoospermia)	Group V (Postvasectomy)	Group VI (Hypoplasia)
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
25(-)	2	0	1	1	0	0
26~30	6	2	5	7	2	4
31~35	5	5	6	5	6	0
36~40	2	0	2	1	2	0
41(+)	1	0	1	0	0	0
Mean	30.5	32.0	31.5	30.8	33.4	27.8

Table 2. Testicular size of subjects (No. of subjects)

Testis size (ml)	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
5						3
6						
8				4		
10				4		
12	1		1	5		
15	2	3	5	1	2	1*
20	8	3	5		5	
25	5	1	4		3	
Mean	20.4	18.6	19.1	11.2	20.5	7.5

* testis tumor patient

Table 3. Results of semen analysis

Parameters	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
Volume (ml)	* 3.2 (1.8~5.0)	3.6 (2.0~5.0)	3.2 (1.8~6.0)	3.1 (1.8~5.0)	3.0 (2.0~4.0)	2.9 (2.0~4.3)
Number ($\times 10^6$ /ml)	95.7 (34~385)	137.6 (59~250)	18.9 (1.0~40)	0	0	5.0** (0~5.0)
Motility (%)	65.4 (40~98)	23.7 (0.0~38)	36.1 (0.0~82)	0	0	15** (0~15)
Morphology (%)	81.9 (70~95)	72.7 (63~80)	66.1 (3.0~85)	0	0	75.0** (0~75)
pH	7.3 (6.8~8.0)	7.2 (7.0~7.5)	7.2 (6.0~8.0)	7.2 (6.5~7.6)	7.4 (7.0~7.6)	7.2 (7.0~7.5)

* Mean
(Range)

** 1 patient with testis tumor

(Los Angeles, CA, U.S.A.)로부터 구독하였다. 단백질 측정의 표준물질로 사용한 결정화된 황소의 혈청 albumin은 Miles Laboratories (Elkhart, ID, U.S.A.)로부터 구독하였다. p-dimethyl-amino benzaldehyde 등 화학약품은 순도가 알려진 외국 유명 약품회사의 것을 사용하였다.

3. 실험 방법

1) 정액상태검사 : 효소의 활성도를 측정하기 위해서는 정액을 채취한 후 정액의 양, 정자의 수, 운동성, 정상형태 및 pH등을 검사하였다(표 3).

2) 단백질 정량 및 효소의 활성도 측정 : 정액검사를 끝내고 4°C에 보관된 시료는 곧 3000rpm에서 15분간 원심분리하여서 정자(침전)와 정장(상층액)으로 분리시켰고, 그 정장(상층액)을 0.05M Tris-HCl 완충용액(pH=7.2)으로 1/5로 희석시켜서 단백질 정량과 효소의 활성도 측정에 사용하였다.

(1) 단백질 정량법 : 단백질 정량은 Lowry (1951) 등의 방법에 따랐다(그림 1). 20gm Na₂CO₃와 0.5gm Na-K tartarate를 0.1M NaOH 1l에 녹여 만든 용액을 A, 0.1% CuSO₄·5H₂O로 만든 용액을 B, 그리고 용액 A, 45ml와 용액 B, 5ml를 섞어서 용액 C를 준비하였다. 그리고 Folin Ciocalteu시약 1과 물 2의 비로 희석시켜 용액 D를 만들었다. Sample 1.0ml에 용액 C 5ml를 넣어 잘 섞고 실온에서 15분 이상 방치한 뒤 즉시 용액 D, 0.5ml를 넣고 잘 섞은 다음 30분간 실온에서 발색시켰다. 그 후 각각의 단백질 양의 정도에 따라 나타나는 파장을 달리해서 시료 1ml내의 단백질의 양이 0~100μgm 범위의 것은 optical density(흡광도)가 0~0.100범위에 오게 하여 750nm에서 측정했고, 100~200μgm범위의 것은 흡광도의 범위가 0.100~0.200에 오게 하여 660nm에서 측정했으며, 200~300μgm범위의 것은 흡광도가 0.200~0.450 범위에 들게하여 500nm에서 측정했다. 그리하여 단백질의 양은 standard curve(표준곡선)로부터 얻었다.

(2) 효소의 활성도 측정 : 위의 방법으로 얻은 희석된 시료를 사용하여 활성도를 측정하였는 바, 특히 효소의 활성도 측정은 반드시 두 시료를 동시에 시험하였다.

(가) Hyaluronidase의 활성도 측정 : 이 효소의 활성도는 Aronson과 Davidson (1967) 등이 발표한 발색 측정법의 변형법을 이용하였다. 이 반응은 hyaluronic acid 0.2ml (6mg/ml), 0.1M의 sodium acetate buffer (pH 3.8), 0.1ml와 2.0M의 NaCl 0.1ml에 시료 0.1ml를 넣어 전체양이 0.5ml인 반응용액을 만든 다음, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 4N-NaOH 0.01ml와 0.8M의 potassium-tetraborate (pH 9.0)

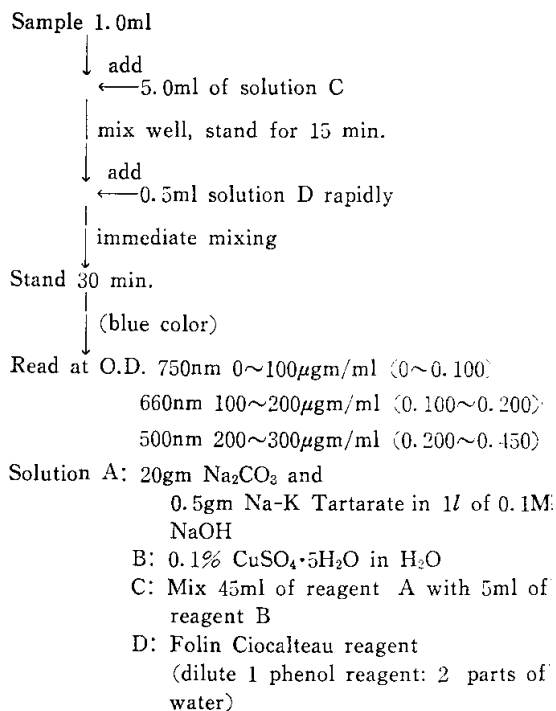
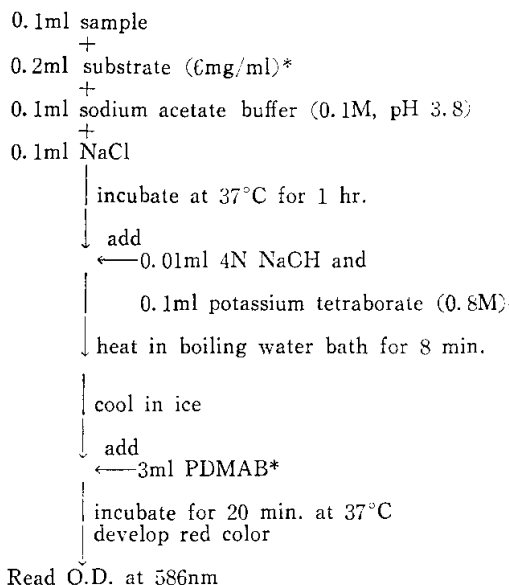


Fig. 1. Assay of protein in seminal plasma.



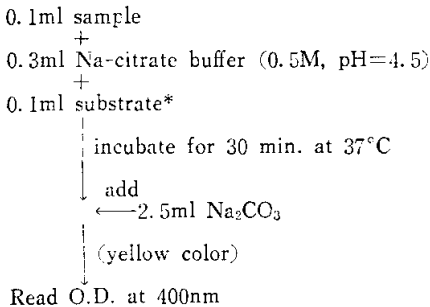
* Substrate: Hyaluronic acid
 * p-dimethyl-amino-benzaldehyde solution: 10gm D-MAB in 87.5ml CH₃COOH and 12.5ml 10N HCl
 * 1 unit: 1μ mole/ml/min.

Fig. 2. Assay of hyaluronidase in seminal plasma.

0.1ml를 넣어 전체 용액의 pH가 거의 중성이 되게 하고, 100°C에서 8분간 가열하여 반응을 종결시켰다. 이 반응을 통해 형성된 N-acetyl-hexosamine은 Reissig (1955) 등의 방법에 따라 N-acetyl-glucosamine을 표준 물질로 사용하여 그 색을 측정하였다. 이 때 최대량의 chromogen(발색원)이 형성되도록 37°C에서 20분간 반응시켜 발색시켰다. 이 때의 색의 강도는 586nm의 파장에서 흡광도를 읽음으로써 결정하였다. 1 unit는 1분간에 생성된 1 μ -mole의 N-acetyl-glucosamine을 의미한다(그림 2). 230N.F. units/mg 단백질과 표준물질 1mg의 단백질에 대한 hyaluronidase의 National Formulary Standard는 발색측정법으로 7.93 units이다. 따라서 이 방법에 의한 hyaluronidase의 1 unit의 활성도는 29.0 N.F. units와 같다.

(나) β -N-acetylglucosaminidase의 활성도 측정 : N-acetylglucosaminidase의 활성도 측정은 Tarentino와 Maley (1972)가 발표한 방법을 변형해서 사용하였다. 기질로서 p-nitrophenyl- β -D-glucosaminide (0.012M 수용액) 0.1ml와 Na-citrate buffer (0.5M, pH4.5) 0.3ml 및 시료 0.1ml를 넣어 전체양이 0.5ml가 되게 반응용액을 만든 후에 30분간 37°C에서 반응시키고 난 후 0.1M의 Na₂CO₃ 2.5ml를 넣고, 400nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 37°C에서 1분간에 1 μ -mole의 기질을 가수분해 시키는 데 필요한 효소의 양을 의미한다(그림 3). 표준물질은 p-nitrophenol을 사용하였다.

(다) β -glucuronidase의 활성도 측정 : β -glucuronidase의 활성도의 측정은 Fishman (1948) 등이 발표한 방법을 변형해서 사용하였다. 이 반응은 기질로서 phenolphthalein-mono- β -glucuronic acid (0.01M, pH



* Substrate: 0.012M para-nitrophenyl- β -D-glucosaminide
 * 1 unit: 1 μ mole/ml/min.

Fig. 3. Assay of β -N-acetylglucosaminidase in seminal plasma.

7.0) 0.1ml와 sodium acetate buffer (0.1M, pH 5.2) 0.8ml, 효소가 들어 있는 시료 0.1ml를 더하여 전체 용액이 1ml가 되게 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시켜 생성된 phenolphthalein에 glycine-NaOH buffer (0.2M, pH 10.4) 5ml를 넣어 발색시켜 400nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 1 unit는 37°C에서 1분간에 phenolphthalein-mono- β -glucuronic acid로부터 생성된 1 μ -mole의 phenolphthalein으로 정했다(그림 4).

(4) Arylsulfatase의 활성도 측정 : 이 효소의 활성도의 측정은 Worword (1973) 등의 방법을 약간 변형한 방법을 사용하였다. 여기서 사용된 기질용액은 0.5M의 초산나트륨 완충용액(pH 5.2)에 녹인 0.2ml의 20mM potassium-2-hydroxy-5-nitrocatechol sulfate이며 여기에 0.2ml의 시료를 섞었다. 이 혼합물은 교반 용운조에서 57°C에서 10분간 반응시키고 2.5ml의 1M의 NaOH용액을 첨가하여서 반응을 종결시켰다. 효소의 작용으로 배출된 발색체인 p-nitrocatechol은 흡광도를 515nm의 파장에서 결정하였다. 형성된 p-nitro-

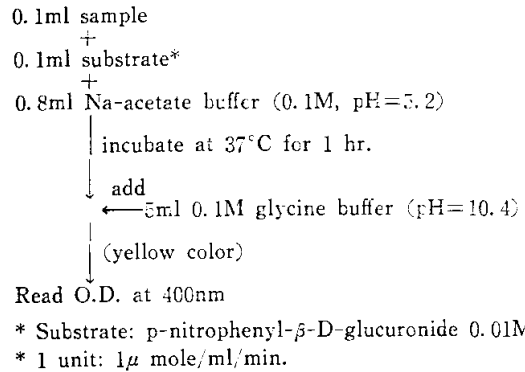
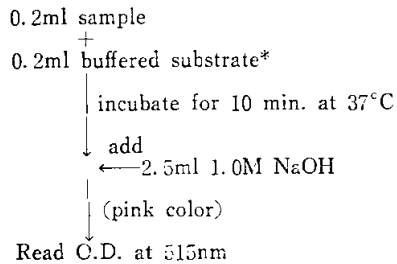


Fig. 4. Assay of β -glucuronidase in seminal plasma.



* Substrate: 20mM p-nitrocatechol sulfate in 0.5M acetate buffer (pH=5.2)
 * 1 unit: 1 μ mole/ml/min.

Fig. 5. Assay of arylsulfatase in seminal plasma.

0.1ml sample
 +
 2.9ml BAEE (Benzoyl arginine ethyl ester)
 ↓
 Read O.D. at 253nm
 * Unit: max. difference of O.D. per min.
 BAEE: 20mg BAEE/100ml of 0.05M Tris-HCl
 containing 0.05M CaCl₂, pH=8.0

Fig. 6. Assay of acrosin in seminal plasma.

0.2ml sample
 +
 2.3ml buffer (0.05M Tris-HCl containing
 0.05M Ca⁺⁺ pH=9.0)
 +
 10mg azocoll
 ↓
 incubate for 10min. at 37°C
 ↓
 filter with Wattman filter paper No. 3
 ↓
 Read O.D. at 520nm
 * Blank solution: 0.2ml sample
 +
 2.3ml buffer
 +
 10mg azocoll
 * 1 unit: 0.001 O.D./min.

Fig. 7. Assay of azocoll proteinase in seminal plasma.

catechol의 양은 표준곡선으로부터 얻었다. 효소의 활성도 1 unit는 위에 기술한 효소 측정 방법에서 1분동안 *p*-nitrocatechol sulfate로부터 1 μ-mole의 *p*-nitrocatechol을 배출하는 효소의 양으로 표시하였다(그림 5).

(5) Acrosin의 활성도 측정 : Acrosin의 활성도는 Schwert와 Takenaka (1955)가 발표한 분광광도 측정법에 의해 BAEE (Mann Co.)를 사용하여 측정하였다. 이 활성도 측정의 반응 용액은 0.05M의 CaCl₂를 함유하는 0.05M Tris-HCl buffer (pH 8.0)를 사용하였다. Acrosin의 활성도 1 unit는 임의로 253nm의 파장에서 1분간에 변화한 1.0의 흡광도를 받고, 고유활성도 (specific activity)는 단백질 1mg당의 acrosin의 활성도를 의미한다(그림 6).

(6) Azocoll proteinase의 활성도 측정 : Jackson과 Matsueda (1970)에 의해서 고안된 방법을 변형하여 사용하였다. 이 변형은 Calbiochem. Document No. 3805 (catalog No. 19493)에 따라 시행하였다. 0.05M의 CaCl₂를 함유하는 0.05M Tris-HCl buffer (pH 9.0)에 10mg의 azocoll과 0.2ml의 시료(100~300μg protein)를 넣어 전체량이 3ml가 되게 한 후에 10분간 37°C에서 반응시킨 다음 여과하였다. 부과액은 기질을 blank로 하여 520nm에서의 흡광도를 측정 하였다. 기질로서 azocoll을 사용했을 때 1 unit의 활성도는 1분간에 0.001의 흡광도를 증가시키는데 필요한 효소의 양으로 정했다(그림 7).

성 적

1. 정액 검사 : 정사실에서 일상 수행하는 방법으로 얻은 정액검사치의 결과는 실험군의 분류의 기초가 되었다(표 3). 제 I군에서 제 III군까지는 수에 차이는 있으나 많은 정자를 가지고 있는 군이고, 제 IV군에서 제 VI군은 정자가 없는 군이므로 정자로 부터 기인하는 효소의 양의 비교에 도움이 되었다. 즉 정액에 있는 효소들의 원천을 추적하는데 도움이 되고 있다. 정액

Table 4. Protein contents in seminal plasma

Parameters	Groups					
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
Volume (ml)	3.2	3.6	3.2	3.1	3.0	2.9
Protein (mg/ml)	*33.4±14.74	35.0±7.38 ^a	29.4±8.37	33.2±18.36	25.1±10.32 ^b	28.2±1.82 ^c
Percentage	100	104.8	88.0	99.4	75.1	84.4
Total protein (mg)	106.9±52.65	126.0±41.22	94.1±46.03	102.9±55.39	75.3±31.83	81.8±26.96
Percentage	100	117.9	88.0	96.3	70.4	76.5

* Mean±S.D.

a: Group I vs Group II t=0.35, p>0.1

b: Group I vs Group V t=1.69, p>0.1

c: Group I vs Group VI t=1.37, p>0.1

의 양은 개인에 따라 차이는 있으나 실험군의 평균치에서는 큰 변화가 없이 3.2ml의 값을 나타냈다. 정자의 수에 있어서는 제 I 군과 제 II 군에서 $96 \sim 138 \times 10^6 / \text{ml}$ 의 정자를 가지고 있고, 제 IV 군 및 제 V 군은 무정자 증군으로 정자를 가지고 있지 않다. 정자의 운동성에 있어서는 정상군(제 I 군)을 제외하면 다른 군에서는 모두 낮은 값을 가지고 있다. 정자의 정상형태에서는 제 I 군에서 제 III 군까지 큰 차이를 나타내지 않았다. 나머지 군은 대단히 낮은 값을 나타냈다. 정액의 pH는 전군에 걸쳐 큰 변화없이 7.2 전후를 나타내고 있다. 결과적으로 개인차가 있기는 하나 각 군간에 정자의 유무가 분명하고, 정액의 양이나 pH가 같은 값을 나타냄으로 효소의 활성도를 비교 관찰하는데 적당한 실험군이라 하겠다.

2. 단백질 농도의 비교 : 단백질의 함유량은 정액의 구성 성분 중에서도 단백질로 구성된 효소의 존재를 확인하는 데 중요한 비교치를 나타낸다(표 4). 정상군(제 I 군)의 정장내 단백질의 농도는 그 평균치가 33.4 mg/ml이었다. 정자의 운동성이 떨어진 제 II 군에서 단위 부피당 많은 단백질을 나타내는 것은 정자가 파괴됨으로 파생된 단백질의 양을 나타냈다고 볼 수 있으나 통계적인 의미는 없었다($p > 0.1$). 정관절제술을 받은 제 V 군에서 단위 부피당 단백질의 양은 25.1 mg/ml로서 정상군에 비해 떨어져 있음으로써 정관의 폐쇄에 의한 일부 분비물의 유출 제한으로 단백질의 양도 감소현상이 있을 것으로 추측되나 통계적으로 유의할 만한 차이는 없었다($p > 0.1$). 비정상군(제 II 군)의 정액에서도 낮은 단백질의 양을 나타냈으나 유의할 만한 차이는 아니었다.

3. Hyaluronidase의 활성도 : 점액성 다당류(muco-polysaccharide)의 단백질로 구성된 정액에서 그 점성을 완화시키는데 필수적으로 필요한 효소인 hyaluronidase의 분포는 오랫동안 많은 관심의 대상이 되어 왔다. 먼저 고유활성도를 비교해 보면 정자가 없는 군 중에서도 고환성 무정자 환자의 경우(제 IV 군), 단위 단백질 mg당 갖는 활성도가 정자수가 정상인 제 I 군과 제 II 군에 비교해서 낮은 값을 나타내고 있으나 유의한 차이는 없었다($p > 0.1$)(표 5). 한편 정관절제의 고환 후성 무정자환자(제 V 군)에서는 높은 고유활성도를 나타낸다($0.05 < p < 0.1$). 이로써 이 효소가 정자 이외의 다른 부위에서도 유래할 것이라고 추정할 수 있다. 또한 고환의 작용이 결핍된 제 II 군에서도 높은 hyaluronidase의 고유활성도를 나타내고 있었다. 전체활성도는 제 II 군에서 가장 높은 값을 나타내고 있다. 과정자 증군(제 IV 군)에서는 정상에 비해 낮은 전체활성도를 나타내고 있다.

4. β -N-acetylglucosaminidase의 활성도 : 다당류의 가수분해 효소인 β -N-acetylglucosaminidase 역시 hyaluronidase와 같이 정액에서 점성의 완화에 도움을 주는 것으로 알려진 효소이다. 그러나 hyaluronidase와 비교하면 서로 상반된 소견을 보이고 있다. 고유활성도는 정상군에 비해 제 III 군인 과정자증 환자 군에서 높지만 정관절제술을 한 제 V 군에서 적은 값을 나타내고 있다(표 6). 전체활성도에 있어서는 hyaluronidase와 비교해 보면 반대로 정상군에 비해서 제 V 군에서 낮은 값을 나타내고 있다. 비정상군(제 II 군)에서는 낮은 전체활성도를 나타내고 있으나 다른군 즉 정상군, 과정자증군, 무정자군에서 높은 전체활성도를 나타내는 것은 흥미있는 결과이다.

Table 5. Activity of hyaluronidase in seminal plasma

Parameters	Groups					
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
Volume (ml)	3.2	3.6	3.2	3.1	3.0	2.9
Specific activity (unit $\times 10^{-3}$ /mg protein)	*1.94 \pm 1.19	2.69 \pm 1.58	1.96 \pm 1.39	1.72 \pm 1.30 ^a	2.90 \pm 1.21 ^b	2.63 \pm 0.98 ^c
Percentage	100	138.7	101.0	88.7	149.5	135.6
Total units	207.4	338.9	184.4	177.0	218.4	215.1
Percentage	100	163.4	88.9	85.3	105.3	103.7

* Mean \pm S.D.

a: Group I vs Group IV $t=0.48$, $p > 0.1$

b: Group I vs Group V $t=1.98$, $0.05 < p < 0.1$

c: Group I vs Group VI $t=1.2$, $p > 0.1$

Table 6. Activity of β -N-acetylglucosaminidase in seminal plasma

Parameters	Groups					
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
Specific activity (unit $\times 10^{-1}$ /mg protein)	*3.62 \pm 1.94	3.58 \pm 2.06	4.20 \pm 3.23 ^a	3.52 \pm 2.56	3.16 \pm 1.39 ^b	3.46 \pm 2.49 ^c
Percentage	100	98.9	116.0	97.2	87.3	95.6
Total units	387.0	451.1	395.2	362.2	237.9	283.0
Percentage	100	116.6	102.1	93.6	61.5	73.1

* Mean \pm S.D.

a: Group I vs Group III $t=0.60$, $p>0.1$

b: Group I vs Group V $t=0.70$, $p>0.1$

c: Group I vs Group VI $t=0.12$, $p>0.1$

Table 7. Activity of β -glucuronidase in seminal plasma

Parameters	Groups					
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
Volume (ml)	3.2	3.6	3.2	3.1	3.0	2.9
Specific activity (unit $\times 10^{-3}$ /mg protein)	*1.53 \pm 1.36	1.29 \pm 0.68	1.14 \pm 0.36 ^a	1.39 \pm 0.43	1.38 \pm 0.80 ^b	1.39 \pm 0.21 ^c
Percentage	100	84.3	74.5	90.8	90.2	90.8
Total units	163.6	162.5	107.3	143.0	103.9	113.7
Percentage	100	99.3	65.6	87.4	63.5	69.5

* Mean \pm S.D.

a: Group I vs Group III $t=1.10$, $p>0.1$

b: Group I vs Group V $t=0.36$, $p>0.1$

c: Group I vs Group VI $t=0.39$, $p>0.1$

5. β -glucuronidase의 활성도: 위에 기술한 두 효소와 마찬가지로 β -glucuronidase도 다당류 가수분해 효소로 정액의 점액성을 낮출 것으로 예상되는 효소이나 그동안 여러 연구자들의 연구결과에 의하면 정자의 capacitation에 필수적인 역할을 하는 효소로 알려져 있다. 고유활성도에 있어서 과정자중군(제 III군)에서 좀 낮은 값을 나타내고 있으나 전체군에서 일반적으로 비등한 값을 나타내고 있다(표 7). 전체활성도에서 과정자중군(제 III군)과 정관절제군(제 V군)에서 상당히 낮은 값을 나타내고 있다.

6. Arylsulfatase의 활성도: Arylsulfatase는 수정 과정 중에서 그 역할이 불분명한 효소이나 정자에서의 이 효소의 양이 대단히 많아서, 그 역할을 규명하려는 노력이 계속되어 왔다. 특히 sulfate기가 붙은 mucopolysaccharide에서 sulfate기 때문에 다른 여러 가수

분해 효소들의 작용이 방해되는 것으로 알려진 점을 고려한다면 sulfate기를 제거하는 Arylsulfatase의 역할은 예상할 수 있으나 아직 구체적인 증명은 안된 상태이다. Arylsulfatase의 고유활성도나 전체활성도에서 고환중양 환자 및 고환 발육부전 환자군(제 VI군)에서 높은 값을 나타내고 있다(표 8). 이는 가장 낮은 고유활성도를 나타내는 제 II군(정상 정자수이나 운동성이 40%이하인 자)에 비해 두 배에 가까운 높은 값을 나타내고 전체활성도도 상당히 높은 값을 나타낼 수 있다.

7. Acrosin의 활성도: Acrosin은 정자의 acrosome의 내부막에 존재하며 정자가 난자의 zona pellucida(투명대)막을 침투하는 데 필수적인 효소로 trypsin과 같은 형의 단백질 가수분해 효소이다. 이것은 특유한 기질 선택성을 갖는 정자 특유의 효소이다. 이 효소의

Table 8. Activity of arylsulfatase in seminal plasma

Parameters	Groups					
	Group I	Group II	Group III	Group III	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
Specific activity (unit × 10 ⁻³ /mg protein)	*2.15 ± 1.01	1.92 ± 0.87	2.31 ± 1.23	2.92 ± 2.27 ^a	3.41 ± 2.30 ^b	3.81 ± 1.27 ^c
Percentage	100	89.3	107.4	135.8	158.6	177.2
Total units	229.8	241.9	217.4	300.5	256.8	311.7
Percentage	100	105.3	94.6	130.8	111.7	135.6

* Mean ± S.D.
 a: Group I vs Group IV t=1.17, p>0.1
 b: Group I vs Group V t=1.64, p>0.1
 c: Group I vs Group II t=2.42, p<0.05

Table 9. Activity of azocoll proteinase in seminal plasma

Parameters	Groups					
	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V	Group VI
No. of subjects	16	7	15	14	10	4
Volume (ml)	3.2	3.6	3.2	3.1	3.0	2.9
Specific activity (unit × 10 ⁻¹ /mg protein)	*1.31 ± 0.71	1.36 ± 0.82	1.38 ± 0.61	1.34 ± 0.56	1.30 ± 0.60	1.23 ± 0.12
Percentage	100	103.8	105.3	102.3	99.2	93.9
Total units	140.0	171.4	129.9	137.9	97.9	100.6
Percentage	100	122.4	92.8	98.5	69.9	71.9

* Mean ± S.D.

측정은 정자의 acrosome막의 파손여부를 알아 보는데 좋은 표시가 되는 효소이다. 지금까지 시험한 모든 정액의 시료에서 전혀 그 활성도를 측정하지 못하고 있다. 다시 말해서 정자의 acrosome막이 전혀 손상되지 않은 상태의 정액을 시험하였다고 할 수 있다.

8. Azocoll proteinase의 활성도: 기질 선택성을 갖지 않은(non-specific) 단백질 가수분해 효소의 측정에는 asocasein을 기질로 사용하여 가수분해한 다음 유리되는 발색물질의 농도를 측정함으로써 그 활성도를 알 수 있다. 이 효소는 정자나 정액에 두루 존재한다고 알려져 있다. 이 효소는 모든 군에 걸쳐 고유활성도나 전체활성도가 거의 비등한 값을 나타내고 있다(표 9).

고 안

사람의 정액 정장은 남성 부생식기관인 부고환, 정관, 정관담낭대부, 정낭, 전립선, 구요도부선(Cowper's gland) 및 요도선에서 배출된 세포의 찌과 같은

액체로서 정자의 모유와 같은 배양액으로 또는 운반체로 작용하고 있다. 수정과정에서 미치는 중요한 역할 때문에 그동안 여러 측면에서 이 정액이 연구되어 왔다. 그러나 정액의 화학성분이나 효소들에 관해서는 단편적으로 발표되고 있으나 구체적인 연구결과는 별로 없는 상태이다. 특히 우리나라에서는 더욱 그러하다. 본 연구에서 얻은 여러 조건하에서의 정액의 단백질 분포는 흥미 있는 결과를 나타내고 있다. 정관절제군(제 V군)에서 다른 군들에서 보다 적은 단백질의 양을 나타냄으로써 정액의 분비물 중 고환에서 유래되는 단백질의 양을 정량적으로 추정할 수 있다. 그러나 대부분 각 군들 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 다른 저자들의 보고에 따르면 제반 조건에서 정액내 단백질의 양은 대체로 대동소이한 소견을 보였다. Mann (1964)이 우려했듯이 정액에서의 효소의 측정이 예외적으로 높은 투과성을 갖는 정자세포로부터 원심분리 중에 세포내 정자 단백질이 배출될 것이라 했는데, 본 실험에서는 정관절제후의 고환후성과 고

환성 무정자균에서 효소의 환성도를 비교함으로써 정액 내의 순수한 효소만의 양을 비교할 수 있었다.

Dott와 Dingle (1968)은 황소의 정자의 cytoplasmic droplet(세포 원형질 소적)로 부터 어떤 lysosome의 탄수화물 분해효소들이 pH나 삼투압의 변화 때문에 정액으로 배출되어 나감을 관찰하였다. 특히 hyaluronidase는 성숙한 고환의 정세관 상피(seminiferous epithelium)로 부터 유래되고, 이 효소는 정자에 연합되어 있고, 정액에 들어 있지 않은 효소로 알려져 있다. 또한 Mancini (1964)는 고환에서 hyaluronidase는 정자의 acrosome에 위치하고 있음을 세포 자체를 이용한 면역형광염색법으로 증명하였다. 이 hyaluronidase는 난자막 중 난구층(cumulus oophorus)을 분산시키는데 필수적인 효소로서 McClean과 Rowland (1942)는 난자막을 용해시키는데 충분히 높은 농도의 hyaluronidase를 유지하기 위해서는 어떤 수 이상의 정자가 존재해야 함을 주장하였다. 그러나 본 연구에서 얻은 결과에 의하면 무정자증군에서 정상군에 비해 이 효소의 고유활성도가 별로 낮지 않음 뿐 아니라 정관결제군에서는 높은 고유활성도를 나타내고 있다. 이 결과는 고환이외의 남성생식 부속기관에서 hyaluronidase의 분비가 있음을 추정케 한다. 정관의 절제로 오히려 이 효소의 고유활성도가 더 증가하는지는 미지이다. 지금까지 이 효소는 정자에서만 유래되는 것으로 알고 있었으나 다른 어느 부분의 기관에서 정자의 운송을 돕기 위해 배출되는 것이 아닌가 생각되며 이는 앞으로 더 연구되어야 할 중요한 문제로 본다. 정상군이나 40% 이하의 운동성을 갖는 제 2군에서 높은 전체활성도를 나타내는 것은 정자의 원형질막(plasma membrane)에 부착되어 있는 효소와 다른 부속기관에서 유래되는 효소가 합해서 나타나기 때문일 것으로 본다. 그래서 두 원천에서 일어나는 효소가 실제로 같은 효소인지 또는 부속기관에서 배출되는 효소가 수정과정에서 난자외막 침투에 도움이 되는지는 명확치 않다. McClean과 Rowland (1942)가 주장했듯이 과정자증군에서 낮은 hyaluronidase의 전체활성도를 나타내는 결과는 흥미 있는 일이다. 따라서 이 효소의 부족 때문에 오는 불임의 가능성도 배제할 수 없는 일이다. 고환발육부전 및 고환종양 환자군(제 II군)에서 왜 높은 hyaluronidase의 고유활성도를 나타내는지는 의문이다.

포유동물의 부고환은 β -N-acetylglucosaminidase가 가장 많이 존재하는 기관이고 그 중에서도 부고환의 두부에서 가장 높은 효소의 환성도를 나타내고 있다 (Reissig et al., 1955). 특히 부고환이 정자정숙 및 수

송에 중요한 몫을 하는 것으로 보아 이런 효소들의 역할과 어떤 관계가 있을 것으로 간주된다. 이 효소 역시 정자의 완충용액 세척액에서 그 환성도를 발견하고 있으며 acrosome 분리시 양이은 계면활성제 처리로 얻어질 수 있다. 이 효소는 높은 점액성 탄수화물의 분해가 왕성히 요구되는 비장이나 부고환에 많고 hyaluronidase에 의해 분해된 과다당류의 그 다음 단계의 가수분해를 β -glucuronidase와 함께 진행시키는 것으로 알려져 있다. 특히 본 연구결과에서 과정자증(제 III군)에서 높은 고유활성도를 나타내고, 정관결제군(제 V군)에서 낮은 고유활성도를 나타내어 hyaluronidase에서 얻은 결과와 상반되는 것을 볼 수 있다. 이는 두 가지 가능성으로 설명할 수 있다. 즉 하나는 과정자증에서 높은 고유활성도를 나타내는 것은 이 효소가 부고환이외에도 고환에서 유래하는 많은 양의 효소로 구성되어 있음을 말해 주고 있다. 또한 정관결제에 의해 낮은 고유활성도를 나타내는 것은 고환에서 유래되는 효소의 감소도 있기는 하지만 정자가 부고환에 존재하여야 많은 β -N-acetylglucosaminidase를 부고환에서 배출시킨다고도 설명할 수 있다. 정관결제군(제 V군)에서 정상보다 40%가 낮은 전체활성도를 나타내고 있다. 비정상군(제 II군)에서 낮은 전체활성도를 나타내는 것은 흥미있는 사실이다. 아마도 고환 발육부전으로 효소의 배출이 감소된 때문일 것으로 추측된다. 정관결제군(제 V군) 및 비정상군(제 II군)을 제외한 정상군, 과정자증군, 무정자증군에서 높은 고유활성도를 나타내고 있다. 이러한 결과로 보아 위에 언급한 두 효소 즉, hyaluronidase와 β -N-acetylglucosaminidase는 서로 같은 원천 즉 고환이나 부고환 및 그의 기관에서 배출되는 효소들로 존재하지만 두 효소가 각기 다른 원천에서 유래되는 효소들로 존재할 것이라는 점을 제시해 주고 있다.

Gwatkin (1972) 등은 흰 쥐의 정자의 capacitation 이 β -N-acetylglucosaminidase와 β -glucuronidase의 특수 억제제에 의해서 방해됨을 발표하였다. 정자가 수정되기 전에 여성생식관에서 난자를 침투할 수 있는 능력을 갖게 되는 과정인 capacitation과정에 이 두 효소가 관여될 것으로 예측하고 있으나 아직 어떤 역할을 하는지는 생화학적으로 해결되지 않고 있다. β -glucuronidase는 lysosome과 microsome 두곳에 존재하는 효소로 Levy (1958) 등은 쥐의 포피선(preputial gland)에서 이 효소를 분리했으며 이곳은 가장 많은 양의 β -glucuronidase를 갖는 기관이라고 했다. Dott와 Dingle (1968)은 역시 이 효소를 황소나 양의 정자의 cytoplasmic droplet에서 확인하였다. 그는 이 효소

결 론

가 다른 lysosome 효소들과 같이 정자의 성숙 단계나 사정기간 중에 정자로 부터 분리되어 나옴을 밝혔다. 본 연구 결과에 의하면 과정자균(제 III 군)과 정관절제균(제 V 군)에서 상당히 낮은 β -glucuronidase의 전체 활성도를 나타내는 사실을 주목할만 하다. 이 효소의 수정과정에서의 그 중요성을 생각하면 과정자증의 수정능력의 원인을 연구하는 한 가지 방법이 될 수 있다. Arylsulfatase는 전형적인 lysosome 효소로서 정자 acrosome에서 전자 현미경에 의해 그 존재가 확인되었다. Allison과 Hartree (1970)는 정자 acrosome을 변형된 형태의 lysosome이라 불렀다. 이 효소의 수정과정에서의 역할은 아직 불분명한데 Farooqui와 Bachhwart (1972)는 이 효소가 점액성 다당류의 신진대사에 중요한 역할을 한다고 하였다. 정액에서 이 효소의 역할은 점액다당류의 sulfate기의 제거로 다른 탄수화물 가수분해 효소의 활성화에 기여할 것으로 본다. 또 이 효소는 사람의 결장직장 종양(colorectal tumor) 세포에서 특수한 형의 효소의 활성도가 현저히 증가하는 사실로 보아서(Tarentino and Maley, 1972) 고환종양을 갖는 제 VI 군에서 대단히 높은 고유활성도 및 전체활성도를 나타낸 흥미있는 관찰인 것으로 풀이 된다. 이 효소는 비정상군(제 VII 군)에서 뿐만 아니라 무정자군(제 IV 군) 및 정관절제균(제 V 군)에서 높은 고유활성도를 나타내는 것으로 보아서 정자에 관련되지 않은 효소가 고환이외의 기관에서 배출됨을 추정할 수 있다. Stambaugh와 Buckley (1970)는 사람, 토끼, 원숭이의 사정된 정자의 acrosome에서 trypsin과 같은 단백질 가수분해 효소를 발견하였는데, 이 효소는 난자의 투명막(zona pellucida)을 용해시켜 정자의 침투를 가능케 하는 수정과정에 필수적인 효소로 알려져 있다. 그 후 이 효소를 acrosin이라 불렀다. 이 효소는 정자 acrosome의 순서적인 추출법에 의해서 외부 acrosome 막이나 내부 acrosome막에 존재함을 확인하였다. 이 효소의 확인으로 정자가 원심분리 중에 파괴되었는지의 여부를 확인할 수 있다. 또한 이 효소는 방해제와 복합물로 존재하고 있는데 산 처리에 의해서 방해제와 분리됨으로 큰 활성도를 얻을 수 있으나 본 연구에서 산 처리 후에도 전 시료에 걸쳐 활성도를 나타내지 않고 있었다. 정액에 존재하는 단백질 가수분해효소는 아주 낮은 산성(pH 3.0)에서 작용하는 acid protease를 사람의 정액에서 확인하였고, azocoll proteinase는 acrosome에서 확인되었다. 본 연구 결과에 의하면 이 효소는 여러 실험군에 걸쳐 끝고루 그 활성도를 확인할 수 있는데, 아마도 고환이외의 기관에서 배출되고 있음을 예측할 수 있다.

정상인 남자와 과정자증, 무정자증 및 정관절제술을 받은 자등 도한 66예의 정액 속에서 단백질의 양 및 정자의 성숙, 운송과 수정능력에 관련되리라고 예상되는 효소들의 활성도를 측정 비교하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상인의 정액 내 단백질의 양은 그 평균치가 33.4mg/ml이었다. 정관절제균에서 정상군에 비해 30%의 낮은 총단백질 양을 나타내고 있는 바, 이로써 정관절제 균위부의 단백질 양을 정량적으로 예측할 수 있다.
 2. 지금까지 정자에만 존재한다고 알려진 hyaluronidase는 무정자증 및 정관절제균에서도 정상인에 비해 높은 활성도를 나타냄으로써, 이 효소가 고환이외의 남성 생식기에도 많이 존재할 것으로 추정된다. 과정자증군에서 정상인에 비해 이 효소의 전체활성도가 감소되어 있는 것으로 보아 이 효소의 감소가 불임의 한 요인이 되는 것으로 생각된다.
 3. β -N-acetylglucosaminidase의 활성도는 과정자증군에서 증가하고 정관절제균에서 감소함으로써 hyaluronidase의 활성도와 상반된 소견을 보였다. 이로써 두 효소의 원천이 같은 경우도 있는 반면 서로 다른 원천에서도 유래되고 있음을 추정할 수 있다. 또한 이 효소는 정자가 부고환을 성숙, 통과하는 과정에서 증가한다고 볼 수 있다.
 4. β -glucuronidase의 활성도는 과정자증군에서 정상인에 비해 감소되어 있음으로써 이 효소의 감소 역시 불임의 한 요인이 되지 않을까 한다. 또한 정관절제균에서 이 효소가 감소되는 것으로 보아 이 효소도 역시 정자가 부고환을 성숙, 통과하는 과정에서 증가한다고 볼 수 있다.
 5. Arylsulfatase의 활성도는 고환종양이나 Klinefelter씨 증후군 등의 비정상적인 군에서 정상인 군에 비해 현저한 증가를 나타냄으로써 이러한 질환의 확진에 이 효소의 활성도 측정을 이용해 볼 수도 있다.
 6. Acrosin의 활성도는 전 실험군에서 측정할 수 없었다.
 7. Azocoll proteinase는 전 실험군에 걸쳐 비등한 활성도를 나타내어, 이 효소가 고환이외의 기관에서도 많이 분비됨을 추정할 수 있다.
- 이상의 성적은 한국인 남성의 생식능의 기전과 평가를 추구하고는데, 크게 도움을 줄 수 있는 자료가 될

것으로 생각되며 나아가서는 인간생식의학의 발전에
이바지할 것으로 믿는다.

(※ 본 연구에서 시종 지도편달을 아끼지 않으신 서울대학교 자연과학대학 화학과 梁喆學교수께 진심으로 감사드립니다.)

—ABSTRACT—

Studies on Protein Contents and Enzyme Activities of Human Seminal Plasma

Kyu Hong Park and Hee Yong Lee

*Department of Urology, College of Medicine, and
Institute of Reproductive Medicine &
Population, Seoul National University, Seoul, Korea*

On the basis of the semen analysis in 66 subjects, they were divided into six different groups: Group I consisted of 16 normal subjects with sperm counts of over $40 \times 10^6/\text{ml}$ and motility of over 40 percent, Group II, 7 subjects with normal sperm counts but motility of under 40 percent, Group III, 15 oligospermic patients with under $40 \times 10^6/\text{ml}$, Group IV, 14 azoospermic patients, Group V, 10 patients with vasectomy and Group VI, 4 abnormal patients with 2 hypoplastic testis, 1 klinefelter's syndrome and 1 testis tumor.

After separating sperm from seminal plasma by centrifugation, the protein contents and the activities of hyaluronidase, β -N-acetylglucosaminidase, β -glucuronidase, arylsulfatase, acrosin and azocoll proteinase were measured in the seminal plasma.

Vasectomized group has 30 percent less of total protein than normal group. For the comparison of enzyme activities of seminal plasma, it could be assumed that the enzymes in seminal plasma were not contaminated with enzymes of spermatozoa by testing the enzymes of the seminal plasma from the vasectomized and azoospermic groups.

It had been reported that hyaluronidase was only released from spermatozoa, however, the result obtained in this investigation showed that azoospermic and vasectomized group had high specific activities of hyaluronidase. The results indicated that hyaluronidase was not only from the testis but also

from the male accessory sexual glands. Oligospermic group (Group III) showed the lowest total activity of hyaluronidase among them.

The specific activities of β -N-acetylglucosaminidase was high in oligospermic group (Group III) and low in vasectomized group (Group V).

These results were contradictory with the pattern of hyaluronidase activities. This indicated that the spermatozoa which were stayed in epididymis would increase the activity of this enzyme.

The specific activity of β -glucuronidase was low in oligospermic and vasectomized groups. Group VI including testis tumor had remarkably high arylsulfatase activity. Arylsulfatase, a typical lysosomal enzyme, has been known to be released unusually large amounts from certain tumor cells. Arylsulfatase was also released with high activities from azoospermic and vasectomized groups. This results indicated that this enzyme also released from the sources other than testis.

Acrosin, a proteolytic enzyme locating in the sperm acrosome, was not found throughout all the samples of seminal plasma.

The activities of azocoll proteinase, a non-specific neutral proteinase was nearly identical in all the groups. This enzyme must have been released from the sources other than testis.

REFERENCES

- Allison, A.C. and Hartree, E.F.: *Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. J. Reprod. Fertil.*, 21:501-515, 1970.
- Aronson, N.N., Jr. and Davidson, E.A.: *Lysosomal hyaluronidase from rat liver preparation. J. Biol. Chem.*, 242:487-490, 1967.
- Chang, M.C.: *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature (Lond.)*, 168:697-670, 1951.
- Dott, H.M. and Dingle, J.T.: *Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. Exp. Cell. Res.*, 52:523-540, 1968.
- Eliasson, R.: *Biochemical analysis of human semen in the study of the physiology and pathophysiology*

- of the male accessory genital tract. *Fertil. Steril.*, **19**:344-346, 1968.
- Eliasson, R.: *Origin of transaminase in human semen. J. Reprod. Fertil.*, **11**:281-282, 1966.
- Farooqui, A.A. and Bachhwart, B.K.: *Purification and properties of arylsulfatase-A from chicken brain. Biochem. J.*, **126**:1025-1033, 1972.
- Findlay, J. and Levvy, G.A.: *Purification of β -N-acetylglucosaminidase from the pig epididymis. Biochem. J.*, **77**:170-175, 1960.
- Fishman, W.H., Idle, H., and Ruf, R.: *Dual localization of acid hydrolases in endoplasmic reticulum and in lysosomes. I, β -glucuronidase staining reactions and cytochemical studies on kidney in androgenstimulated mice. Histochemie.*, **20**:287-289, 1969.
- Fishman, W.H., Springer, B., and Brunetti, R.: *Purification and properties of ox liver hexosaminidase. J. Biol. Chem.*, **173**:449-453, 1948.
- Gregoire, A.T. and Moran, H.J.: *The enzyme activity, protein and fructose content of normal, oligospermic, postvasectomy and infertile azoospermic men. Fertil. Steril.*, **24**:208-211, 1973.
- Gregoire, A.T. and Moran, M.J.: *The lactic dehydrogenase, glucose phosphate isomerase, fructose, and protein content of pre and post vasectomy necrospermic and azoospermic human seminal plasma. Fertil. Steril.*, **23**:708-710, 1972.
- Guerin, J.F., Rollet, J., Perrin, P., Menezo, Y., Crgiazzi, A., and Czyba, J.C.: *Enzymes in the seminal plasma from azoospermic men: Correlation with the origin of their azoospermia. Fertil. Steril.*, **36**:368-372, 1981.
- Gutman, A.B. and Gutman, E.B.: *Quantitative relations of a prostatic component (acid phosphatase) of human seminal fluid. Endocrinology*, **28**:115-119, 1941.
- Gwatkin, R.B.L., Anderson, O.E., and Hutchinson, C.F.: *Capacitation of hamster spermatozoa in vitro: The role of cumulus components. J. Reprod. Fertil.*, **30**:389-392, 1972.
- Jackson, R.L. and Matsueda, G.R.: *Myxobacter-AL-1-protease. In Methods in enzymology. Eds. G.E. Perlmann and L. Lorand. Academic Press, New York and London., Vol. 19:p.592, 1970.*
- Joel, C.A. and Herzberg, M.: *Glutamic-oxalacetic transaminase in human semen and reproductive organs. J. Reprod. Fertil.*, **10**:185-188, 1965.
- Kurzrock, R., Leonard, S.L., and Conrad, H.: *Role of hyaluronidase in human infertility. Amer. J. Med.*, **1**:491-495, 1946.
- Lakshmi, S. and Balasubramanian, A.S.: *Soluble arylsulfatases of human brain and some characteristics of the brain specific arylsulfatase. Bm. Biochem. Biophys. Acta.*, **614**:446-458, 1980.
- Levvy, G.A., McAllan, A., and Marsh, C.A.: *Purification of β -glucuronidase from the preputial gland of the female rat. Biochem. J.*, **69**:22-27, 1958.
- Linker, A., Meyer, K., and Weissmann, B.: *Study of N-acetyl-glucosaminidase specificity. J. Biol. Chem.*, **213**:237-240, 1955.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: *Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.*, **193**:265-275, 1951.
- MacLead, J. and Wroblewski, F.: *Lactic dehydrogenase activity in human semen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**:265-272, 1968.
- Mancini, R.E., Alonso, A., Barquet, J., Alvarez, B., and Nemirovsky, M.: *Histo-immunological localization of hyaluronidase in the bull testis. J. Reprod. Fertil.*, **8**:325-334, 1964.
- Mann, T.: *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.: Wiley, New York, p.37, 1964.*
- Mann, T.: *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract: Wiley, New York, p.161, 1964.*
- Masaki, J. and Hartree, E.F.: *Distribution of metabolic activity, phospholipid and hyaluronidase between the heads and tails of bull spermatozoa. Biochem. J.*, **84**:347-352, 1962.
- McClellan, D. and Rowland, I.W.: *Role of hyaluronidase in fertilization. Nature*, **150**:627-632, 1942.
- Moon, K.H. and Bunge, R.G.: *Observations on the biochemistry of human semen: 2, Alkaline phosphatase. Fertil. Steril.*, **19**:766-770, 1968.
- Polakoski, K.L., Zaneveld, L.J.D., and Williams, W.L.: *Purification of a proteolytic enzyme from rabbit acrosomes. Biol. Reprod.*, **6**:23-29, 1972.

- Reissig, J.L., Strominger, J.L., and Leloir, L.F.: *A modified colorimetric methods for the estimation of N-acetylamino sugars*. *J. Biol. Chem.*, 217:959-966, 1955.
- Ross, V., Moore, O.H., and Miller, E.G.: *Proteins of human seminal plasma*. *J. Biol. Chem.*, 144:667-669, 1942.
- Ruenworgsa, P. and Chulavatnatol, M.: *A new acidic protease in human seminal plasma*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59:44-50, 1974.
- Schirren, C.: *Relation between fructose content of semen and fertility in man*. *J. Reprod. Fertil.*, 5: 347, 1963.
- Schwert, G.W. and Takenaka, Y.: *A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 16:570-575, 1955.
- Seigner, A.C. and Castro, A.E.: *Electron microscopic demonstration of arylsulfatases activity during acrosome formation in the rat*. *Biol. Reprod.*, 7:31-38, 1972.
- Stambaugh, R. and Buckley, J.: *Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus, monkey and human spermatozoa*. *Biol. Reprod.*, 3:275-281, 1970.
- Strivostava, P.N., Munnell, J.F., Yang, C.H., and Foley, C.W.: *Sequential release of acrosomal membranes and acrosomal enzymes of ram spermatozoa*. *J. Reprod. Fertil.*, 36:363-372, 1974.
- Swyer, G.I.M.: *The release of hyaluronidase from spermatozoa*. *Biochem. J.*, 41:413-417, 1947.
- Tarentino A.L. and Maley F.: *N-acetyl-D-hexosaminidase assay: In Methods in Enzymology XXVIII: p.772, 1972.*
- Werthessen, N.T., Berman, S., Greenberg, B.E., and Gargill, S.L.: *A technique for the assay of hyaluronidase in human semen and its correlation with the sperm concentration*. *J. Urol.*, 54:565-568, 1945.
- Worwood, M., Dodgson, K.S., Hook, G.E.R., and Rose, F.A.: *Problems associated with the assay of arylsulphatases A and B of rat tissues*. *Biochem. J.*, 134:183-190, 1973.
- Zaneveld, L.J.D.: *Control of male fertility: The human ejaculate and its potential for fertility control*, Edited by J.J. Sciarra: Harper & Row, New York, pp.41-53, 1975.