

## P-13 Streptozotocin으로 유도된 당뇨병성 Wistar Rat 정자의 특성: Calcium Ionophore을 이용한 침체반응 유도 및 정자수의 변화

전용필, 김정훈, 강병문, 장윤석, 목정은, 계명찬,<sup>1</sup> 김문규<sup>2</sup>, 김길수<sup>3</sup>  
울산의대 산부인과, 경기대학교 생물학과<sup>1</sup>,  
한양대학교 생물학과<sup>2</sup>, 아산생명과학연구소 실험동물 연구실<sup>3</sup>

### 서 론

당뇨병은 가장 일반적인 내분비 질환으로 시각계, 신경계, 비뇨계, 맥관계 등과 같은 여러 장기에 병변을 일으킨다. 당뇨병은 주로 2가지 형태로 구분할 수 있는데 베타세포의 자가면역반응이 원인이 되는 제 1형과 병인이 명확하지 않으나 인슐린 저항상의 증가가 중요한 요인으로 작용하는 제 2형으로 구별된다.

한편 임상적으로 당뇨병과 응성생식기능 저하와의 관계는 많이 알려져 있으나 사람이나 실험동물을 대상으로한 견해가 연구자에 따라 다양하다. 정자가 인위적인 도움없이 자연적으로 수정을 하기 위해서는 온전한 성숙이 필요하다. 불완전한 침체반응은 유전적 요인, 성숙과정시 면역학적인 이상, 그리고 생식수관의 이상 등에 기인한다. 불완전한 침체반응은 체외수정시 수정의 실패원인 이므로 침체반응이 자발적으로 된 정자는 수정에 참여하지 못하고, 투명대내 수용체와 결합하여 침체반응이 유도된 정자만이 수정에 참여할 수 있게 된다. 따라서 침체반응은 수정이 될 수 있는가를 판단하는 기준으로 사용되고 있다. 한편 정액내 정자수는 성관계를 통한 임신의 가능성을 예측하는 인자로 사용되고 있으며 사람의 경우에 있어서는 세계보건기구에서 그 기준을 정하여 판단하고 있다.

쥐의 부정소는 정소에서 형성된 정자의 성숙이 진행되는 부위로서 정자의 기능형성에 중요하다. 또한 부정소미는 성숙과정을 거친 정자를 저장하여 사정시 배출하는 저장의 기능이 있고, 수정관은 사정시 배출통로로 사정하지 않고 잔 류할 경우 정자를 재흡수하는 기능을 갖고 있다. 따라서 부정소미내 정자수의 감소는 교미를 통한 생식의 실패 원인으로 작용할 수 있다. 응성 불임에 있어서 당뇨병의 직접적인 영향은 많이 밝혀져 있지 않으며 특히 정자의 생리학적인 변화에 대한 연구는 미진한 상태이다.

본 연구에서는 쥐(Wistar)에 streptozotocin(STZ)을 처리하여 당뇨병을 유발시키고 당뇨병에 따른 부정소와 수정관내 정자수의 변화와 각 부위내 정자의 침체반응 정도를 판단하여 당뇨병이 정자의 성숙과 개체의 수정능력에 미치는 영향을 알

아보고자 한다.

### 재료 및 방법

각 군을 10두씩으로 하여 3개군으로 분류하였다. 제 1군은 정상대조군으로 생리식염수를 주사하였고, 제 2군은 STZ(70mg/kg)를 1mL의 citrate buffer(pH 4.5)에 용해시켜 복강내로 투여하여 3일 후에 희생시켰고(3일군), 제 3군은 제 2군과 동일하게 STZ를 복강내로 단회 투여하고 14일 후에 희생시켰다(14일군). STZ 투여후 매일 요당을 Combur urine test strip으로 측정하여 당뇨병 유발을 확인하였고, 각 실험군의 혈당은 Glucose analyzer (Beckman Model 6517, USA)를, 혈장 인슐린치는 방사면역측정법을 이용하였다. 각 실험군의 쥐를 ether로 마취시킨 후 좌심실에서 혈변을 채취하고 부정소와 수정관을 적출하였다. 적출한 부정소와 수정관은 PBS용액 내에서 혈액과 기타 조직을 제거하였으며 해부현미경하에서 두부, 체부, 미부, 그리고 수정관으로 나누었다. 이후 각 쥐의 혈변에 2mL: BWW배양액을 첨가한 후 세절하고 일정시간 실온에 방치하여 정자가 유출되도록 하여 정자수를 측정하였다. 침체반응을 유도하기 위하여 Calcium ionophore를 10 $\mu$ M 농도로 처리하고 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated pisum sativum lectin을 이용하여 현광현미경하에서 침체반응 여부를 확인하였다.

### 결과 및 논의

각 실험군의 혈당변화는 정상대조군에 비하여 STZ 투여후 유의하게 혈당의 상승이 관찰되었으며 혈장내 인슐린 농도의 변화는 혈당의 변화에 반비례하게 대조군에 비하여 STZ 투여로 감소하였다.

정상대조군과 STZ로 당뇨병을 유발시킨 Wistar 쥐의 부정소를 머리, 몸통, 꼬리 그리고 정관으로 분리하여 각 부위에 존재하는 정자의 농도를 살펴보면 다음과 같다. 부정소두내 정자의 농도는 정상대조군에서 18.6 $\pm$ 1.8이었으며 제 2군과 제 3군에서는 각각 7.9 $\pm$ 1.1과 8.2 $\pm$ 1.8로 당뇨유발에

의해 유의한 변화를 보였다. 부정소체에서는 대조군이  $7.5 \pm 1.6$ , 제 2군이  $4.1 \pm 1.0$ , 그리고 제 3군이  $6.6 \pm 2.2$ 로 혈당에 따른 차이를 보이거나 감소하는 경향을 보였다. 부정소미내 정자의 농도는 대조군에서  $19.7 \pm 0.8$ , 제 2군은  $24.8 \pm 2.9$  그리고 제 3군은  $20.7 \pm 4.8$  이었다. 정관내 정자의 농도는 대조군이  $0.1 \pm 0.02$ , 제 2군에서  $0.06 \pm 0.04$ , 제 3군에서는  $0.1 \pm 0.06$  이었다. STZ를 처리한 Zucker쥐의 경우에 있어서는 당뇨병의 경과기간에 따라 부정소 각 부위의 정자수가 감소하는 결과를 보였으나 Wister에 있어서는 당뇨병의 경과기간에 의존적이기 보다는 혈당량에 의해 주로 영향을 받았다.

정자를 체외 배양할 경우 자발적 침체반응율은 쥐의 경우 30%를 약간 상회하는 것으로 보고되고 있으며 생식선 부위에 따라 다른 결과를 보였다. 부정소미에서 수획한 정자의 자발적 침체반응율은  $47.1 \pm 1.6$  이었다. 한편 수정관내 정자의 자발적 침체반응율은  $55.4 \pm 0.3$ 으로 체부 정자에 비해 유의하게 많이 되었다. 제 2군의 부고환 꼬리내 정자의 자발적 침체반응율은  $59.1 \pm 5.9$ 로 대조군에 비해 유의하게 많이 되는 것이 관찰되었다. 그러나 수정관내 정자의 자발적 침체반응율은  $64.2 \pm 4.5$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 한편 정관내 정자도 자발적 침체반응율이  $51.4 \pm 6.0$ 으로 대조군과 유사하였다.

당뇨병 환자에서 사정되는 정액의 양은 젊은 집단의 병력이 긴 사람에서 감소하는 것이 관찰되나, 다른 연령군에서는 정상군과 차이가 없고 정자의 농도는 환자의 연령 증가와 병력 기간이 길수록 감소하며, 제 1형 당뇨병 환자에서는 정자수나 운동성이 감소한다고 보고되어 있다. 이러한 결과는 STZ으로 당뇨병을 유발시킨 Zucker쥐에서 부고환 머리, 부고환 몸통, 부고환 꼬리, 그리고 정관내 정자의 농도가 병력이 길어짐에 따라 점진적으로 감소하였으며 특히 14일군의 부고환 몸통과 부고환 꼬리, 그리고 정관에서 그 수가 유의하게 감소하는 저자들의 보고와 같은 경향을 갖는다. 그러나 Wister를 재료로 하였을 경우에는 병력보다는 혈당에 따라 정자수 감소의 변화가 관찰되었다. 따라서 당뇨병은 정자형성을 억제하여, 부고환내 정자의 수적 감소에 영향이 나타나는 것으로 사료된다.

수정능력을 획득한 정자의 침체반응은 수정 가능성과 직접적인 상호관계를 가지며 수정에서 필요한 정확한 시간에 침체반응이 진행되어야 한다. 조숙한 침체반응은 투명대를 인식할 수 있는 수용체의 망실을 가져와 투명대를 인식하지 못하게 되며, 한편 인위적으로 투명대를 뚫어 수정을 유도할 경우 침체반응이 되지 않은 정자는 난자의 세포막과 융합할 수 없어 수정에 참여하지 못한다. ARIC test를 이용하여 SR insufficient와 AR prematurity의 두가지 AR pathology가 규명되었다.

쥐의 경우에 있어서 ARIC test를 이용한 정자의 수정능력 평가는 아직 보고되지 않은 상태이나 쥐 부고환 꼬리내 정자를 체외에서 배양할 경우 자발적 침체반응율은 약 30% 정도로 보고되고 있어 자발적 침체반응율이 사람의 경우와 비교해 볼 때 매우 높은 것을 알 수 있다. 수정관내 정자의 침체반응에 대한 보고는 미진한 상태로 본 실험 결과 부정소미내 정자의 자발적 침체반응율보다 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 실험에 사용한 웅성 Wister 쥐는 교미를 하지 않았으므로 정관의 재흡수가 진행되었기 때문으로 판단된다. 당뇨병 유발후 기간의 경과에 따라서 부정소미내 정자의 자발적 침체반응율이 유의하게 증가하는 결과를 보였다. 한편 수정관내 정자도 부정소미내 정자와 같은 경향을 보였다.

이러한 결과는 당뇨로 인하여 정자의 자발적 침체반응율이 증가한 것으로 정자의 생리적 기능에 영향을 미치는 사실을 확인할 수 있었다. ARIC test 결과 수정관내 정자의 수정능력이 부정소미내 정자에 비해 감소해 있음을 알 수 있었다. 3일군과 14일 군의 부정소미내 정자의 ARIC test 결과는 대조군과 유사하였다. 수정관내 정자의 ARIC test 결과는 대조군에 비해 증가하였으나 부정소미내 정자에 비해서는 유의하게 감소된 반응율을 보였다. 이러한 결과는 당뇨병이 정자의 성숙에 영향을 주어 자발적 침체반응을 비정상적으로 증가하게 함으로서 수정율을 감소시키는 원인으로 판단된다.

당뇨병으로 인한 사정장애 환자의 경우 전기적인 자극으로 정자를 채취해 수정에 이용되어 왔으나 그 성공률이 사정에 의한 정자에 비해 낮다. 그러나 정관에서 정자를 인위적으로 흡입하여 정자주입법을 이용하여 수정을 유도할 경우 수정율이 정상인과 유사할 뿐만 아니라 수정이 정상적으로 되고 임신율이 높아지는 것으로 보고되었다. 따라서 당뇨병 환자의 정자는 수정되면 완전한 개체로 발생할 수 있는 능력을 갖고 있는 것을 알 수 있으나 인위적인 수정 방법이 아닌 경우 수정율이 감소한다. 이러한 이유는 본 실험의 결과에서 보듯이 수정에 필요한 정자의 기능 또한 정자의 수적 감소에 의한 것으로 판단된다. 이상의 결과에서 당뇨병은 정자의 수적인 감소와 정자의 자발적 침체반응율이 증가될 수 있는 조건을 형성함으로써 개체의 수정능력 저하 원인을 제공할 수 있는 것으로 사료된다.

## 요 약

STZ를 주사한 후 혈액내 인슐린 및 포도당 농도는 당뇨병 유발에 의해 반비례적인 관계를 보였다. 대조군의 부정소두와 체내 정자의 농도 그리고 부정소미내 정자의 수는 당뇨병 유발에 의한 혈당량의 변화에 민감하게 감소하였다. 자발적 침체반응율은 대조군의 부정소미와 수정관내 두

부위간 유의한 차이로 증가하였다. 3일군과 14일군의 부정소미내 정자의 자발적 침체반응율은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. ARIC test 결과 대조군, 3일군, 그리고 14일군에서 약 12%의 차이를 보였다. 결과적으로 당뇨병 유발에 의해 부정소미내 정자수의 감소와 자발적 침체반응율이 상대적으로 높아지나 ARIC test의 결과에서 부정소미내 정자는 수정능력이 있는 것으로 판단된다. 따라서 당뇨병은 정자의 수적인 감소를 유발하며 부정소내 기능의 이상을 초래하여 정자성숙을 방해하여 자발적 침체반응을 증가시킴으로서 개체의 수정율 감소를 초래할 수 있는 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

- Ali ST, Shaikh RN, Shiddiqi NA, and Shiddiqi PQ (1993) Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Arch Androl* 30: 47-54.
- Dinulovic D and Radonjic G (1990) Diabetes mellitus/male infertility. *Arch Androl* 25: 277-293.
- Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H, Richoilley G, and Labal B (1995) Variation in spontaneous and induced acrosome reaction: correlations with semen parameters and *in-vitro* fertilization results. *Hum Reprod* 10: 2085-2089.
- Hovatta O, Reima I, Foudila T, Butzow T, Johansson K, and von Smitten K (1996) Vas deferens aspiration and intracytoplasmic injection of frozen-thawed spermatozoa in a case of anejaculation in a diabetic man. *Hum Reprod* 11: 334-335.