

韓牛의 精子完成에 관한 電子顯微鏡의 研究

裴大植 · 金鍾旭

忠北大學校 農科大學

Electron Microscopic Studies on the Spermiogenesis of the Korean Cattle

D. S. Bae and J. W. Kim

College of Agriculture, Chungbuk National University

SUMMARY

In order to investigate the spermiogenesis of Korean cattle spermatozoa, the tissue obtained from the testis and the epididymis of six matured bull were conventionary prepared as thin sections and these sections were observed under a transmission electron microscope.

Based on the development of the various permanent organelles and certain transient structures, the spermiogenesis of the Korean cattle could be divided into four main phases: Golgi, cap, acrosome and maturation; and these phases had been further subdivided into a total of nine stages.

In the maturation phase, the condensation of the nuclear karyoplasm had progressed from the upper side to the lower side of the nucleus as the movement of the nuclear ring which would be disappeared after maturation.

I. 緒論

精子形成(Spermatogenesis)의 마지막 段階인 精子完成(Spermiogenesis)에 있어, 精子細胞가 精細管內에 連續적으로 출지어 있다는 것을 Brown (1885)이 처음으로 밝힌後, von Ebner(1888)는 連續적으로 발달하는 細胞의 완전한 一組를 精子形成週期(Spermatogenic Cycle)라 하였다.

Leblond과 Clermont (1952a)는 實驗動物의 精子細胞를 過沃素酸Schiff法으로 染色하여, Golgi 物質에 유래한 先體(acrosome)와 頭帽(head cap)의 발달에 따라 精子完成을 Golgi, 頭帽·先體·成熟의 4 段階로 大別하고, 이를 다시 細胞內의 一時的이거나 永久的構造物의 변화에 따라 쥐는 19期로 細分하였다.

Challice (1953)가 처음으로 電子顯微鏡에 의한 微細構造에 따른 区分을 試圖하고, dekretser(1969)는 光學顯微鏡에 의한 구분과의 關聯性을 검토하

였다. 그 후 사람(Holstein 1976, Holstein and Schirren 1979), 拂拂(Afzelius et al. 1982), 토끼(Plöen 1971), 뒤쥐(Sorex araneus l. Plöen et al. 1979), 靑여우(Andersen 1978)에 대한 研究는 있으나 소에 대한 것은 Courtens와 Loir(1981)의 核에 관한 것 밖에 없다. 이에 韓牛의 精子完成過程을 電子顯微鏡으로 觀察하여 報告한다.

本 研究를 遂行함에 있어 여러가지 便宜를 提供하여준 家畜衛生研究所 金憲源研究官, 農業技術研究所 李淳炯博士와 李峻星助務員, 本校農生物學科 在學生 張俊鳳君에게 깊은 謝意를 表한다.

II. 材料 및 方法

性的으로 成熟한 滿 2~3 歲의 韓牛 6 頭로부터 精巢를 채취하여, 保温器에 넣어 實驗室로 옮겨, 皮膜을 剝離한 後 精巢의 表層·深層·精巢上體頭部의 3 個部位에서 組織을 切取하여(圖 1), 곧 3%

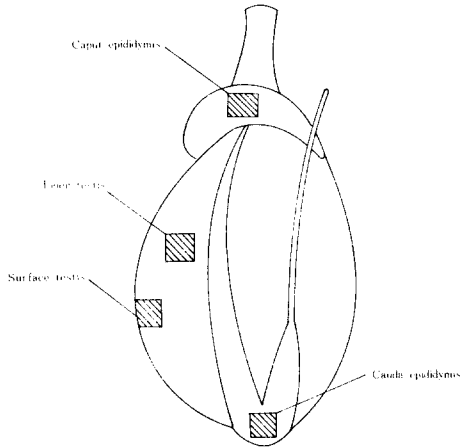


Fig. 1. Schematic drawing of a bull reproductive tract to show the position of the various parts (shaded regions)

glutaraldehyde cacodylate (Jones 1971)에浸漬하고細切하면서 常溫下에서 2時間 固定한 후, sucrose cacodylate로 30分間씩 4회 세척한 다음, 다시 2% Osmium tetroxide cacodylate로 4°C에서 後固定한 후 sucrose cacodylate로 3회 세척하였다. 이것을 alcohol系列과 propyleneoxide로 脫水한 후 Epon 812 (Luft 1961)에 包埋하여 硬化한 것을 Sorvall MT-2型 ultra-microtome으로 超薄切片을 만들어, 5% uranyl acetate와 lead citrate로 二重染色 (Venable and Coggeshall 1965) 한 다음 Hitachi HU-11E型 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

III. 研究結果

電子顯微鏡으로 관찰한 韓牛의 精子完成은 Leblond과 Clermont (1952 a, b)의 分類法에 따라 Golgi體와 先體小胞(acrosomal vesicle)의 相對的 位置, 核·先體·先體小胞·先體顆粒(acrosomal granule) 등의 形態, 核과 尾部의 接觸, manchette의 出現과 위치, 核質(Karyoplasm)의 濃縮程度, mitochondria의 配置등 精子各部의 形成 程度에 따라 圖2와 같이 Golgi·頭帽·先體·成熟의 4段階(phase)로 區分하고, 앞의 3段階는 각각 前後期로, 마지막 成熟段階는 前中後期로 細分하여 全過程을 9期(Stage)로 구분할 수 있다.

即 (i) Golgi體가 뚜렷하게 나타나고, 先體小胞가 핵에 접근하면서 小胞內의 透明質이 미세한 顆粒을 형성하고 이것이 融合하여 커다란 先體顆粒을 형성하는 Golgi段階를 前期(early stage)와 後期

(late stage)로, (ii) 先體小胞가 核위에 卍山모양으로 擴散하고 先體顆粒이 頭帽를 형성하는 頭帽段階를 前後期로, (iii) 核의 表面에 확산된 先體顆粒이 변화하여 先體를 형성하고, ranchette가 出現하면서 核의 모양이 球形에서 長小円形으로 차차 變形하는 先體段階도 前後期로, (iv) 先體와 核이 固有形態를 갖추고 頸部와 尾部가 완성되는 成熟段階를 前中·後期로 구분하였다.

1) Golgi 전기(early Golgi Stage)

円形인 精子細胞의 中心에 球形의 核이 있고, 細胞質內의 構成物(organelle)中 Golgi體·先體小胞 類染色體(Chromatoid body)·中心粒(centriole) 등이 세포의 한쪽엿에 모여 있다(圖3). mitochondria는 세포질내에 均일하게 分散되어있으나 세포막쪽으로 약간 치우쳐 있다. 先體小胞는 Golgi體에 싸여 핵에 접근하나 핵에는 닿지 않고 있다. 9+2構造인 軸(axoneme)가 세포막에 쌓이지 않은채로 관찰된다(圖3 右上隅).

2. Golgi 후기(late Golgi Stage)

하나의 큰 先體小胞가 핵에 접근하여 核의 표면을 陷入시키며 接觸한다. 이때 몇개의 작은 小胞가 핵에 접근한다. 큰 先體小胞의 中心에는 큰 先體顆粒이 形成되었다.(圖4)

3. 頭帽전기(early cap stage)

先體小胞가 核위에 扁平하게 퍼져서 頭帽를 形成한다. 진한 先體顆粒의 周圍를 小胞의 투명한 부분이 두텁게 싸고, 周圍는 비교적 얇다(圖5). Golgi體는 先體의 반대쪽으로 이동한다.

4. 頭帽後期(late cap stage)

精子細胞나 核의 모양은 아직도 円形에 가깝다. 先體小胞는 럭비공모양으로서, 中心部分의 電子密度가 높은 先體顆粒部分과 주위의 透明한 부분이 확실히 구분되고, 이들은 膜에 싸여 核과 接觸하고 있다. 核質의 凝集이 시작되고 核이 세포의 周圍에 치우친다(圖6)

5. 先體前期(early acrosome stage)

核이 細胞의 변두리로 옮겨 간다. 이 期의 특징은 先體의 後半部周緣에 manchette라는 微細管이 많이 나타나서 이 manchette의 起始部가 核輪(nuclear ring)을 만들어, 核의 윗쪽에서 아랫쪽으로 移動하며 조이므로써 円形의 核이 楕圓形으로 점차

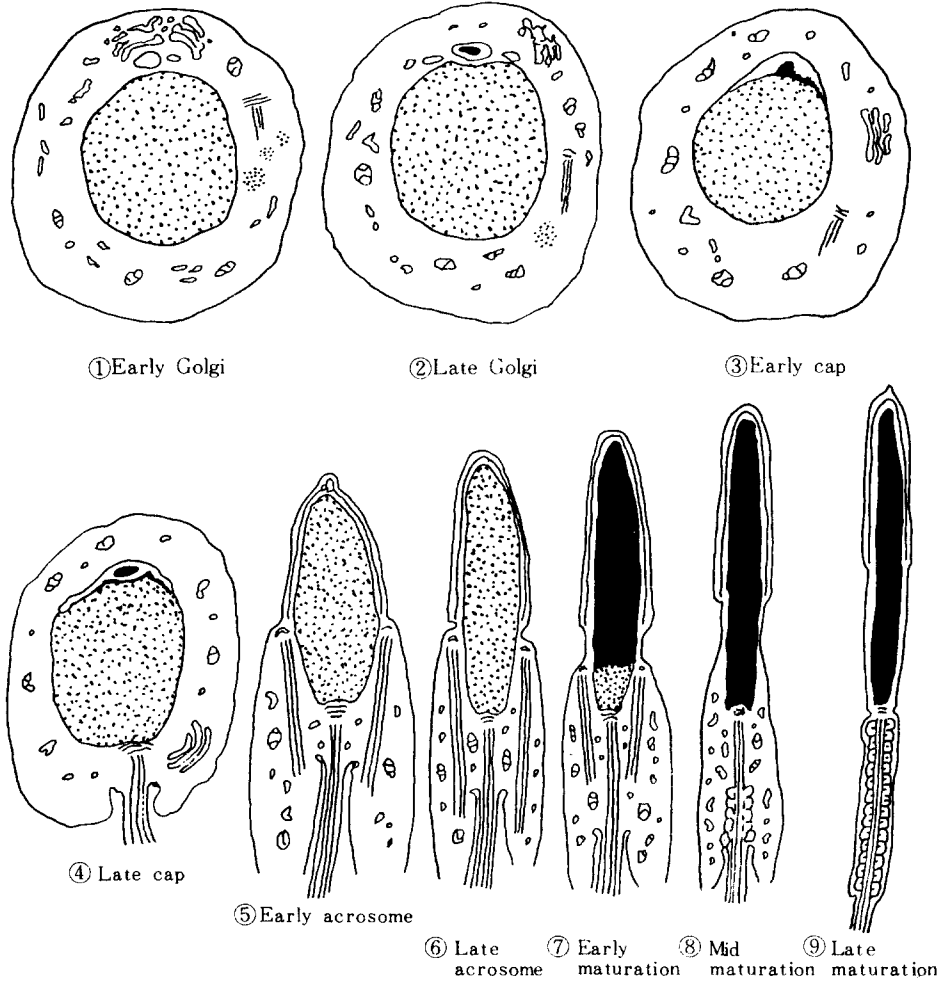


Fig. 2. Schematic drawings summarizing the major stages during spermiogenesis in the bull

細長하게 되고, 核質이 濃縮되면서 余分の 核膜이 생긴다(圖8).

先体の 반대편에 近位中心粒(Proximal centriole)과 遠位中心粒(distal centriole), 그리고 終輪(annulus)의 前軀체가 나타나고, 近位中心粒이 核에 파고 들어 着床窩(implantation fossa)의 기초가 형성된다(圖8). 遠位中心粒에서 발달한 軸系가 細胞 밖으로 떨어 나간다.

6. 先体 後期(late acrosome stage)

核이 더욱 細長하게 되고 核質이 엉글게 凝縮한다. 電子密度가 높은 核輪이 뚜렷이 생겨 核의 주위를 둘러감고, 여기에서 manchette가 길게 뻗는다. (圖9, 10, 11). 核質의 濃縮으로 생긴 剩餘 核膜이 核의 下端에 봉투같이 매달린다. (圖11).

7. 成熟 前期(early maturation stage)

核質은 거의 凝縮이 完了되었으나 一部는 아직 凝縮中이다(圖12, 13). 核輪이 核의 下端으로 移動함에 따라 核輪을 경계로 核質의 응축이 진행되고, 이 核輪은 核의 下端部에서 manchette와 같이 消失된다.

이 核輪의 이동에 따라 核膜肥厚部(postacrosomal dense lamina)가 形成되고, 頸部の 關節 頭部位에서는 橫紋構造로된 頸部小板(neck plate)이 겹쳐 支柱(segmented Column)를 形成한다(圖12).

8. 成熟 中期(mid maturation stage)

先体는 核의 끝으로 길게 뻗고, 核質은 완전히 濃縮되며, 頭部가 거의 完熟한 상태로 된다(圖14). 終輪이 中片部の 아래로 이동함에 따라 mitochon-

dria가 軸纖維束(axial fiber bundle)의 주위에 집결하여 中片部の mitochondria를 形成하기 시작한다.

9. 成熟後期(late maturation stage)

精子完成의 最終期로서 核과 先体が 種特有의 형태가 된다. 頭部는 先体が 核膜肥厚部가 区分되고 原形質小滴(Cytoplasmic droplet)이 中片部に 붙어 있는 未熟精子가 많이 觀察된다(圖15). 軸糸의 주위에는 外側纖維(dense fiber)가 있고, 中片部에서는 이것을 mitochondria가 둘러 싸고 있다(圖22) 꼬리의 主部는 纖維鞘(fibrous sheath)가 背面과 腹面의 縱支柱(longitudinal column) 사이를 半月形으로 둘러 싸고, 主部の 末端에 이르면 外側纖維는 점차 가늘어져 結局 消失된다(圖 22).

IV. 考 察

韓牛의 精子細胞를 電子顯微鏡으로 관찰하여 精子完成過程을 4段階로 나눈 다음 이를 다시 9期로 細分하였다. 사람(Holstein 1976, Holstein and Schirren 1979)과 뒤쥐(Plöen et al. 1979)는 8期로, 토끼(Plöen 1971), 靑여우(Andersen 1978), 拂拂(Afzelius et al. 1982)는 10期로 나눈 것으로 보아 韓牛는 大体로 이들과 비슷하다.

精子의 完成過程을 区分하는 指標로 精子細胞의 一時的 或은 永久的構造物의 出現과 變化를 관찰하여 Golgi·頭帽·先体·成熟의 4段階는 明確히 区分할 수 있으나, 이 4단계를 어떻게 細分할 것인가에 대해서는 電子顯微鏡的 研究에서와 같이 관찰한 試料의 數가 적은 경우에는 어느程度 主觀에 依存할 수 밖에 없다. 이런 觀點에서 보면 動物의 種에 따른 精子完成期數의 差는 그렇게 큰 意義가 있다고는 볼 수 없다.

韓牛는 Golgi前期에 있어 先体小胞가 Golgi体에 싸여 核에 近하고, 先体小胞의 核은 비교적 두텁고, 그 속에 작은 顆粒과 少數의 微細管을 含有하고 있다. 그러나 靑여우(Andersen 1978)와 拂拂(Afzelius et al. 1982)는 같은 段階의 先体小胞는 크고, 膜은 그다지 두텁지 않으며, 前先体顆粒(preacrosomal granule)을 1개만 가지고 있다. 韓牛에 있어서도 Golgi後期에는 큰 先体顆粒이 하나만 先体小胞내에 있는 것으로 보아, Golgi前期에 先体小胞내에 작은 顆粒과 微細管을

가지고 있는 것은 一時的現象으로서, 소에 있어서도 結局 하나의 先体顆粒으로 融合되는 것으로 추측된다.

韓牛는 Golgi前期에 있어 軸糸가 膜에 싸여 있지 않은 狀態로 관찰되었는데, 이것은 뒤쥐(Plöen et al. 1979)와 拂拂(Afzelius et al. 1982)에 있어서도 관찰되었다. 이것은 Afzelius 등(1982)에 의하여 軸糸가 세포질 내부에 있는 경우에, 軸糸는 細胞膜은 무관한 狀態로 길게 뻗어, 세포의 周邊으로 이동하여 細胞膜에 接하여, 細胞膜이 軸糸를 둘러 싸는 것으로 推察하였다.

頭帽 前期에 있어서 韓牛의 先体顆粒은 周圍의 小胞로 비교적 두텁게 싸여 있으나, 拂拂(Afzelius et al. 1982)에서는 비교적 얇고 均一하게 싸여있다. 이것은 本 研究에서의 韓牛쪽이 拂拂보다 조금 빠른 단계에서 관찰한 결과로서, 韓牛에서도 完成段階가 진행됨에 따라 顆粒周圍의 先体小胞가 均一한 두께가 될 것으로 생각된다.

核内の 染色質은 頭帽前期까지는 그 凝集狀態가 비교적 작고 均一하나, 頭帽後期에서 先体 前期에 걸쳐서는 덩어리로 凝結하고, 成熟前期에 이르러서는 核輪이 核의 下端으로 이동함에 따라 核質의 濃縮이 進行되는 것을 明確하게 관찰할 수 있었다. Susi와 Clermont(1970)은 電子를 투과시키지 않는 농후한 물질로 된 類染色體는 가는 單纖維狀物質과 같은 小胞로 되어 있고, 頸部和 核輪이 형성되는 시기에는 核이 길어질뿐 아니라 여러가지 形態變化가 활발하게 이루어진다고 하였다.

이런 核質의 形態의 變化는 쥐(Susi and Clermont 1970), 뒤쥐(Plowen et al. 1979), 토끼(Plöen 1971), 拂拂(Afzelius et al. 1982), 소·염소·돼지·말·새앙쥐·쥐(Courtens and Loir 1981) 등에서도 관찰되었다. Courtens와 Loir(1981)는 核質의 濃축이 核의 先端에서 下端으로 향하여 進行되는 것을 확인하였으나, 核輪과의 관련성은 言及하지 않았다. 그러나 本 研究에서는 核質의 濃축이 核輪의 移動과 함께 進行되는 것이 확인되었다.

manchette는 先体後期에 나타나 円形의 核을 가늘고 길게 變形시키는 역할을 하고, 成熟 中期에는 消失된다. (Fawcett et al. 1971). 이 manchette의 존재는 精子完成段階를 区别하는데 있어 좋은 指標가 된다.

韓牛에 있어서는 成熟中期에 先体가 상당히 크나,

토끼(Plöen 1971)에 있어서는 先体 后期부터 成熟 前期에 걸쳐, 拂拂(Afzelius et al. 1982)에서는 先体 中期에 커지므로, 韓牛와는 조금 다르나, 뒤쥐(Plöen 1979)에서는 先体后期에서 成熟中期에 걸쳐 커지므로 韓牛와 같은 傾向을 보인다.

成熟 后期의 尾部에는 原形質小滴이 있다. 原形質小滴은 頸部나 中片部에 存在하고 그 内部에는 구부러진 微細管과 小胞가 있고 細胞質이 充滿되어 있다(Bloom and Nicander 1961). 이것은 精子가 精巢 上体 頭部에서 体部로 移動하는 동안에 없어진다. Amann과 Almquist (1962)는 보고하였으나, Kojima와 Ishikawa (1963)는 射精后의 精子에도 존재한다고 하였다.

以上과 같이 韓牛의 精子完成은 拂拂와 가장 비슷하다고 생각된다.

V. 摘要

成熟한 韓牛 6 頭의 精巢의 表層과 深層 및 精巢 上体의 頭部에서 組織을 採取하여 試料를 만들어 電子顯微鏡으로 精子完成過程을 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 細胞構造物의 一時的 및 永久的變化에 따라 Golgi · 頭帽 · 先体 · 成熟의 4 段階로 구분하고, 앞의 3 段階는 각각 前后期로, 마지막 成熟段階는 前中后期로 細分하여 全過程은 9 期로 나누었다.

2. 頭部の 核質은 核의 先端部에서 後端部로 核輪의 移動에 따라 이를 境界로 凝縮이 進行되고, 核輪은 精子가 成熟된 다음 없어진다.

Figures 3 to 8. Changes in the head during the early phase of spermiogenesis.

Fig. 3. In the early Golgi stage, the acrosomal vesicle(A) surrounded by the Golgi apparatus(G) approaches to the nucleus(N). There are nucleus pores(arrow) and an axoneme without membrane (right corner). x 20,000.

Fig. 4. The acrosomal vesicle(A) containing a large acrosomal granule(AG) approaches to the nucleus(N) indenting the surface of the nucleus in the late Golgi stage. X 42,000.

Fig. 5. In the early cap stage, the acrosomal vesicle(A) spreads evenly on the nucleus. X 32,500

Fig. 6. The acrosomal granule(AG) attached to the nucleus has become Rugby-ball-type shape which has a central electron dense granule and less dense peripheral content in the late cap stage. X 42,000.

Fig. 7. The manchette(MA) is appearing on the opposite site of the acrosomal granule (AG) in the early acrosome stage. The acrosome attaches to the cell membrane. X 51,00.

Fig. 8. In the same stage, the nucleus(N) is lengthened and the chromatin(CH) is condensed. The proximal centriole(PC) indents to the nucleus forming the base of the implantation fossa. The precursor of the annulus(DB) is seen and the axoneme(AX) projects to outside of the cell. The nuclear memberane(NM) separated from the nucleus in accordance with condensation is clearly shown. X 60,000.

Figures 9 to 15. Changes in the head during the late phase of spermiogenesis.

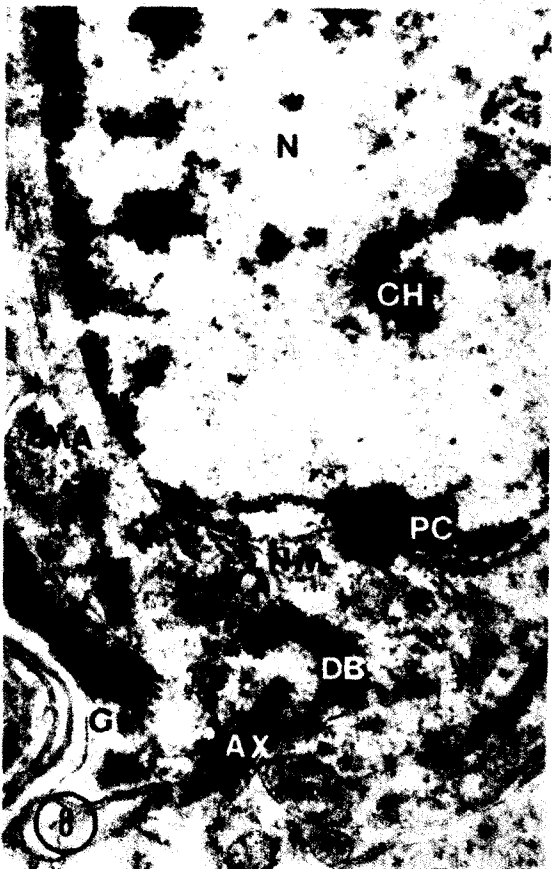
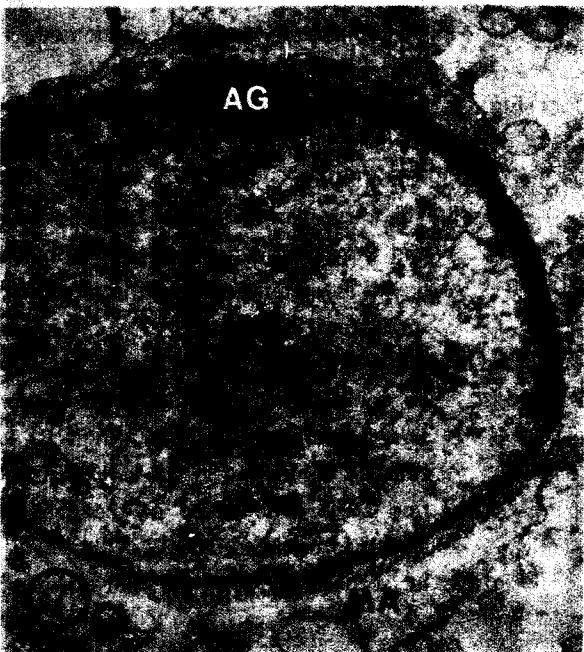
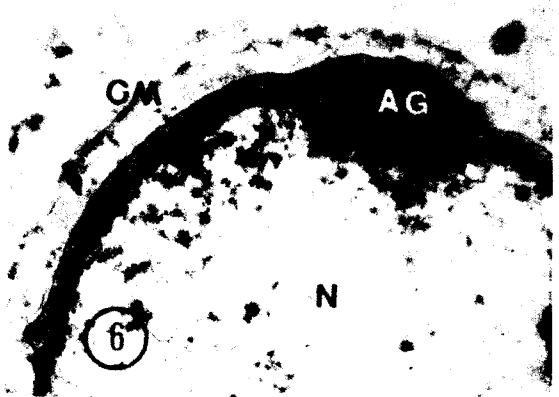
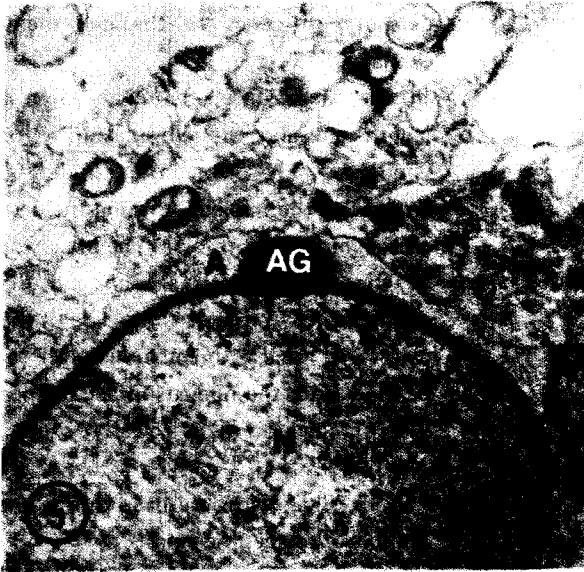
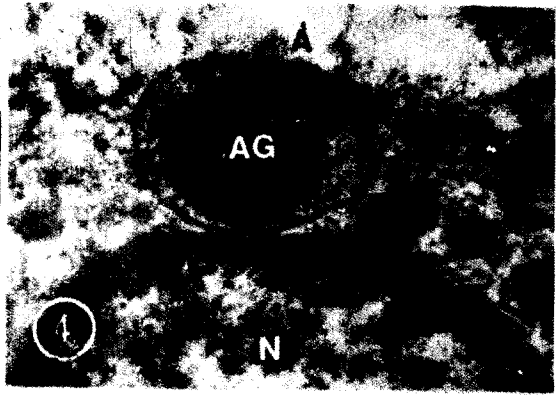
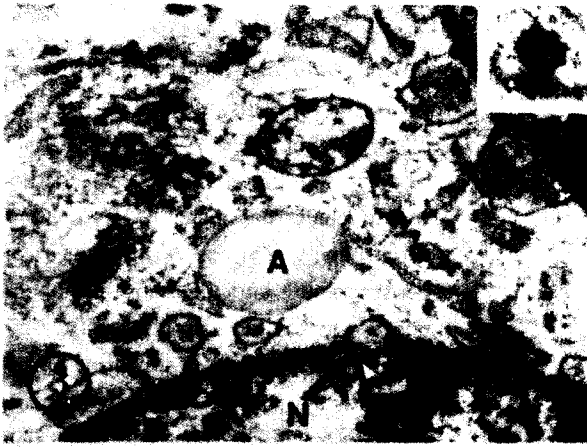
Fig. 9. While the nucleus(N) elongates, the karyoplasm is coarsely condensed in the late acrosome stage. X 36,000.

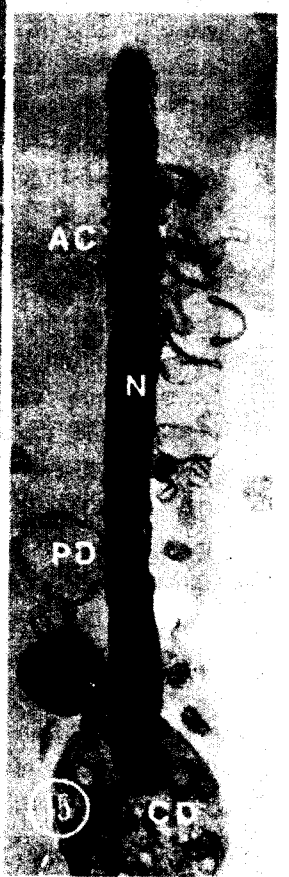
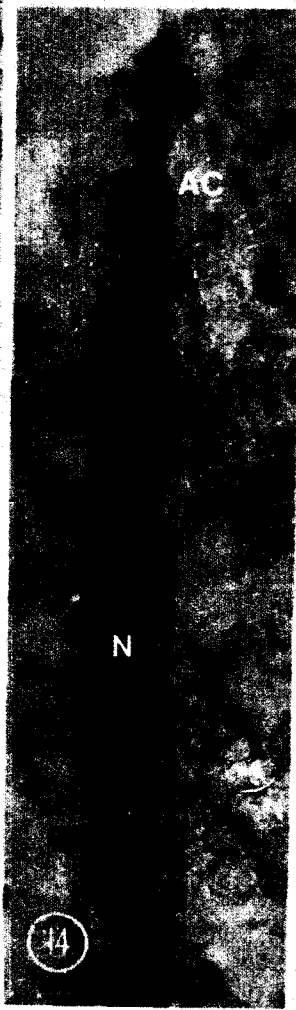
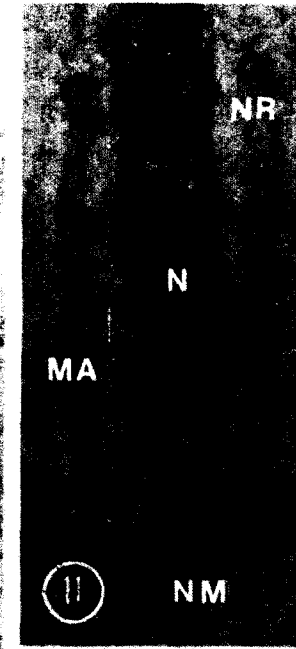
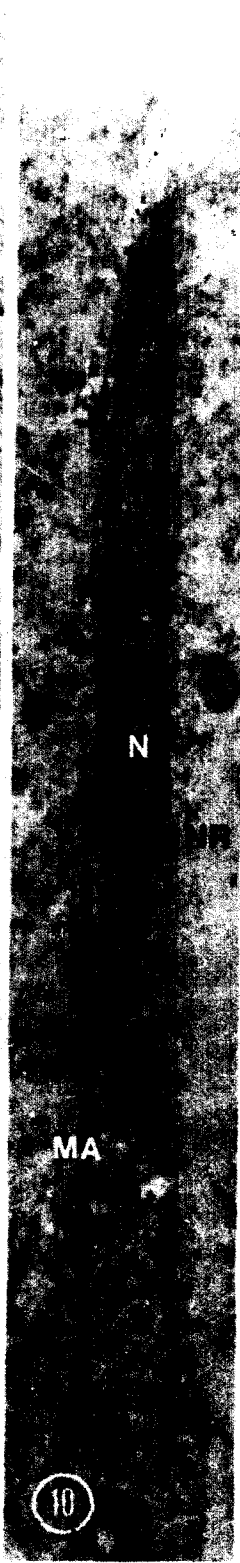
Fig. 10. In the same stage, the nuclear ring(NR) is followed by long manchette(MA). X 55,000.

Fig. 11. The karyoplasm is further concentrated, and the nuclear memberane(NM) hangs down as an envelope in the late acrosome stage. X 22,000.

Fig. 12. While the upper side of the karyoplasm is completely condensed, the lower side bordered by nuclear ring(NR) is coarsely condensed in the early maturation stage. The shape of the neck is almost formed. X 25,000.

Fig. 13. In accordance with the movement of





the nuclear ring(NR), the condensation of the karyoplasm is progressed, and the postacrosomal dense lamina(PD) is formed in the early maturation stage. X 25,000.

Fig. 14. The acrosome(AC) elongates from the tip of the nucleus(N), and the karyoplasm is almost completely condensed in the mid maturation stage. X 27,000.

Fig. 15. The acrosome can be distinguished from the postacrosomal dense lamina(PD) in the late maturation stage. Many spermatozoa have cytoplasmic droplets(CD) on the neck. X 20,000.

IV. 引用文献

1. Afzelius, B.A., R.E. Johnsonbaugh, J. W. Kim, L. Plöen and E.M. Ritzen. 1982. Spermogenesis and testicular spermatozoa of the olive baboon(*Papio anubis*). *J. Submicrosc. Cytol.* 14:627-639.
2. Amann, R.P. and J.O. Almquist. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VII. Morphology of epididymal sperm. *J. Dairy Sci.* 45:1516-1526.
3. Andersens, K. 1978. Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox(*Alopex lagopus*). *Acta Vet. Scand.* 19:229-242.
4. Bloom, G. and L. Nicander. 1961. On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. *Z. Zellf.* 55:833-844.
5. Brown, H.H. 1885. On spermatogenesis in the rat. *Quart. J. Micr. Sci.* 25:343. Cited by Swiestra and Foote, 1963.
6. Challice, C.E. 1953. Electron microscope studies of spermogenesis in some rodents. *J. Roy. Microscop. Soc.* 73:115-127.
7. Courtens, J.L. and M. Loir. 1981. A cytochemical study of nuclear changes in boar, bull, goat, mouse, rat, and stallion spermatozoa. *J. Ultrastr. Res.* 74:327-340.
8. de Kretser, D.M. 1969. Ultrastructural features of human spermogenesis. *Z. Zellf.* 98:477-505.
9. Fawcett, D.W., W.A. Anderson and D.M. Phillips. 1971. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Dev. Biol.* 26:220-251.
10. Holstein, A.F. 1976. Ultrastructural observations on the differentiation of spermatids in man. *Andrologia* 8:157-165.
11. Holstein A.F. and C. Schirren. 1979. Classification of abnormalities in human spermatids based on recent advances in ultrastructure research on spermatid differentiation. pp. 341-353 in D.W. Fawcett and T.M. Bedford(eds.). *The spermatozoon.* Urban & Schwarzenberg Inc. Baltimore.
12. Jones, R.C. 1971. Ultrastructure of mammalian spermatozoa: The effect of buffer concentration in fixatives for boar spermatozoa. *Micron*, 1971, 2:350-362.
13. Kojima, Y. and T. Ishikawa. 1963. Etude au microscope électronique de la gouttelette protoplasmique observée dans le spermatozoïde chez les taureaux. *Jap. J. Vet. Res.* 11:152-158.
14. Leblond, C.P. and Y. Clermont. 1952a. Spermogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfuric acid" technique. *Am. J. Anat.* 90:167-215.
15. Leblond, C.P. and Y. Clermont. 1952 b. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55:548-573.
16. Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Cell Biol.* 9:409-414.
17. Plöen, L. 1971. A scheme of rabbit spermatogenesis based upon electron microscopical observations. *Z. Zellf.* 115:553-564.

18. Plöen, L., H. Ekwall and B. Afzelius. 1979. Spermogenesis and the spermatozoa of the European common shrew (*Sorex araneus* L.) *J. Ultrastr. Res.* 68:149-159.
19. Susi, F.R. and Y. Clermont. 1970. Fine structural modifications of the rat chromatoid body during spermiogenesis. *Am. J. Anat.* 129:177-192.
20. Swierstra, E.E. and R.H. Foote. 1963. Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 5:309-322.
21. Venable, J.H. and R. Coggeshall. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408.
22. Von Ebner, V. 1888. Zur Spermatogenese bei den Säugethieren. *Arch. Mikrobiol. Anat.* 31:236-292. Cited by Leblond and Clermont, 1952 b.