

珍島犬의 精子完成과 精子에 관한 電子顯微鏡의 研究

鄭鎮漢 · 裴大植 · 金鍾旭

忠北大學校 農科大學

Electron-Microscopic Studies on the Spermiogenesis and the Spermatozoa of the Korean Native Jin-do Dog (*Canis familiaris*)

Chung, C. H. D. S. Bae and J. W. Kim

College of Agriculture, Chung-Buk University

Summary

In order to investigate the spermiogenesis of the Korean Native Jin-do dog, the tissue sampled from the testis and the epididymis of matured dog were conventionally prepared as thin sections. And then these sections were observed under a transmission electron microscope.

Based on the development of various permanent organelle and certain transient structures, the spermiogenesis of the dog could be divided into four major phases: Golgi, cap, acrosome and maturation; and these phases had been further subdivided into seven stages.

In the maturation phase, the karyoplasm has been condensed completely and the nucleus elongated as the movement of the unclear ring. The equatorial segment has notable waist-form at the late acrosomal stage.

In the cross section of the tail, it shows a typical 9+9+2 pattern of the axial fiber bundle consisting of the dense fibers, the inner fibers, and a central pair. The dense fiber number 1, 5, 6 and 9 were larger in diameter than the rest of the dense fibers.

I. 緒 論

家畜·家禽의 人工授精, 受精卵移植, 受精卵微細操作 및 遺傳工學的 應用을 위한 研究가 近年에 활발히 進行되어 많은 成果를 거두었으며, 특히 人工授精과 受精卵移植은 家畜繁殖分野에 있어서 지금까지 發見된 기술 中 획기적인 것으로서 앞으로 家畜繁殖分野 및 生物學研究分野에 크게 공헌하게 될 것이다.

精子는 成熟함에 따라 變態를 거치는 일련의 세포분열에 의해 精巢의 精細管內에서 形成된다. 그래서 精子形成은 精原細胞까지의 정세포 형성 (spermatocytogenesis)과 精細胞에서 成熟精子까지 變태를 거치는 精子完成 (spermiogenesis)의 두 過程으로 나누어 진다.

精巢內의 수많은 精子細胞는 일정한 위치에 일정

한 시기와 순서에 따라 連續적으로 配列되고 있음이 19세기에 이미 밝혀졌다 (Brown, 1985; Von Edner, 1988).

그 후 光學顯微鏡의 解像力이 向上되고 電子顯微鏡의 發達과 더불어 보다 正確한 哺乳動物의 精子完成과 微細構造가 여러 研究者에 의해 밝혀지게 되었다.

精子完成을 단계별로 區分한 研究者는 Leblond와 Clermont (1952a, b)로서 이들은 精細管의 性上皮內에서 精子形成이 되는 일련의 變化가 일어나며, 일정한 部位에서 細胞가 變態를 거치고, 같은 部位에서 그 세포와 같은 단계의 細胞가 나타나는 期間을 1 周期라 定義하였고, 쥐, 새앙쥐, 햄스터, 기니아 피그 등의 설치류로 精子完成을 研究함으로써 精子完成의 段階를 區分하였는데, 精子細胞를 過沃素酸 Schiff法 (periodic-acid-fuchsin sulfurous acid tech-

nique, 일명 PAS法)으로染色하여 Golgi 物質에서 油來하는 尖體(acrosome)와 頭帽의 發達水準에 따라 光學的으로 Golgi·頭帽·尖體·成熟의 네 단계로 大別하였다.

精子的 完成過程과 微細構造에 관한 研究는 正常 精子的 形成過程, 精子的 受精能獲得을 밝히는 基礎資料로서 家畜改良의 촉진수단으로 이용될 수 있을 것이다.

그동안 哺乳動物과 鳥類의 精子完成과 精子的 微細構造에 관해서는 비교적 많이 研究되어 왔으나 飼育犬에 대한 研究報告는 찾아볼 수 없었으므로 韓國固有의 珍島犬에 대한 研究를 통하여 다른 哺乳家畜과 比較하여 새로운 知見을 얻고자 本 實驗을 實施하였다.

II. 材料 및 方法

性的으로 充分히 成熟한 珍島犬을 屠殺한 直後 그 精巢를 떼어 保溫器에 담아 곧 실험실로 옮겨, 精巢의 表層과 深層 및 精巢上體頭部에서 組織을 切取하여(Fig. 1) glutaraldehyde-cacodylate(Jones, 1971)에 담긴 채로 1mm³ 정도가 되게 細切하면서 常溫에서 120분간 前固定한 다음 완충용액인 sucrose cacodylate로 30分間 1회, 20分間 2회 세척하였다. 계속해서 osmium tetroxide cacodylate 로

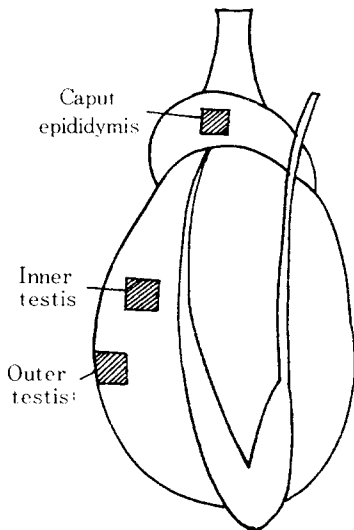


Fig. 1. Schematic drawing of dog reproductive tracts to show sampling parts (shaded region)

4°C에서 120분간 後固定한 다음 sucrose cacodylate로 20분간씩 3회 세척하고 alcohol係와 propylene oxide로 脫水시킨 것을 Spurr's resin(Spurr, 1969)에 包埋하여 70°C에서 9시간 동안 硬化한 다음 LKB Ultratome V로 超薄切片(60~90nm)을 만들어 grid에 올려 5% uranyl acetate와 lead citrate로 二重染色(Venable and Coggeshall, 1965)하여 Zeiss EM109型 電子顯微鏡으로 鏡檢하였다.

觀察된 精子細胞(spermatids)와 精子는 試料採取部位에 關係없이 그 形態에 따라 區分하였다.

III. 結果

電子顯微鏡으로 觀察한 珍島犬 精巢內에서의 精子完成過程은 Leblond와 Clermont(1952a, b)의 分類方法에 準하여 Golgi·頭帽·尖體·成熟의 4 단계로 大別하고, 다시 그 특징에 따라 Golgi, 頭帽, 尖體 段階는 前·後期로 細分하여, 成熟期를 포함해서 모두 7期로 나누었다(Fig. 2).

각 단계의 期別 구분은 ① Golgi 단계(Golgi phase)는 Golgi體의 相對의 位置 및 尖體小胞(acrosomal vesicle)가 核에 접근한 程度로, ② 頭帽段階(cap phase)는 尖體小胞안에 尖體顆粒(acrosomal granule)이 형성된 程度와 核(nucleus)表面에 퍼진 程度로, ③ 尖體段階(acrosome phase)는 核質(karyoplasm)의 濃縮程度와 尖體顆粒이 퍼진 程度 및 核輪(nuclear ring)의 位置와 만셋트(manchette)의 出現 여부로 각각 前·後期로 區分하였다.

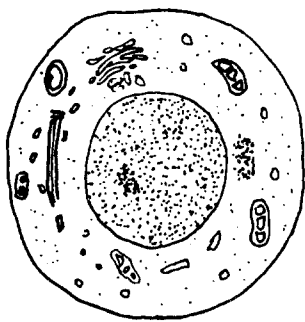
1. Golgi 前期(early Golgi stage)

圓形의 精子細胞 中心에 球形의 核이 있고, 세포 구성물질 중에서 尖體小胞滴들이 Golgi體에 둘러싸여 核의 주변으로 접근하고 아직 核과 접촉되지 않았다. 커다란 Golgi體가 核 가까이 보인(Fig. 3).

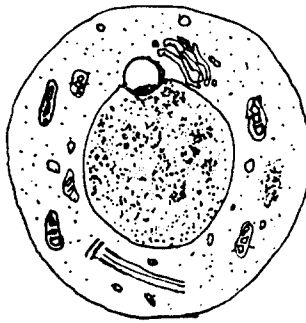
2. Golgi 後期(late Golgi stage)

커다란 尖體小胞가 核과 접촉하여 核을 약간 함몰시키고 尖體小胞內에 電子密度가 높은 물질(electron dense acrosomal granule material)이 생긴다(Fig. 4, 5). 尖體小胞가 核을 함몰시키면서 접촉하고, Golgi體와 小胞滴은 核의 側面으로 移動된다(Fig. 4, 5).

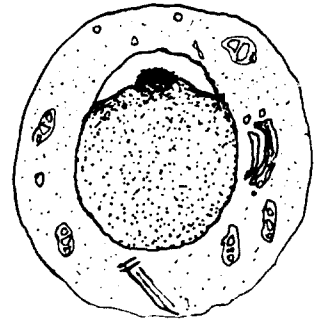
3. 頭帽 前期(early cap stage)



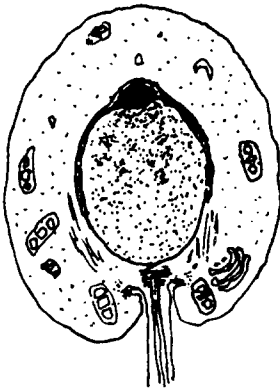
Early Golgi



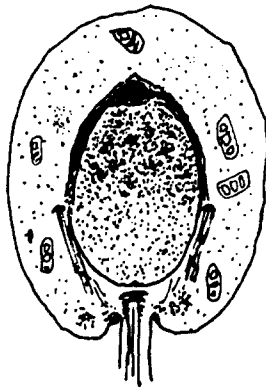
Late Golgi



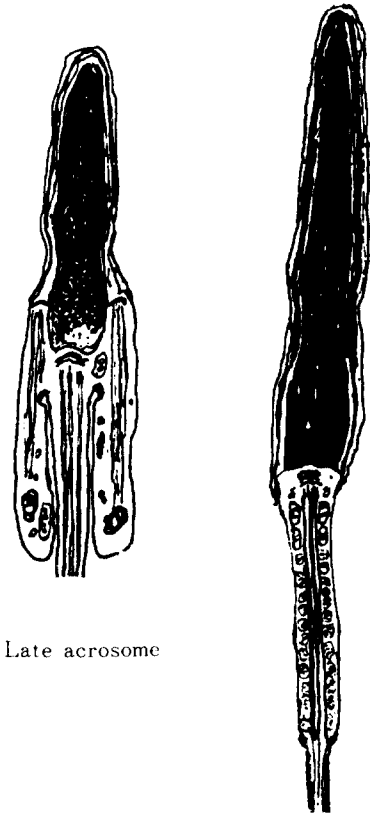
Early cap



Late cap



Early acrosome



Late acrosome

Maturation

Fig. 2. Schematic drawings summarizing the major stage during spermiogenesis in the dog

核에 접촉한 커다란 尖體小胞는 核에 더욱 陷入하고, 電子密度가 높은 물질인 보닛(bonnet) 모양의 尖體顆粒이 核에 接하여 形成되었다(Fig. 6, 7). 또한 尖體顆粒을 둘러싸고 있는 尖體小胞는 퍼지지

않은 상태로 남아 있다(Fig. 7).

4. 頭帽 後期(late cap stage)

尖體小胞 内の 尖體顆粒은 電子密度가 높은 물질

로 되어 있고, 이를 둘러싸고 있는 電子密度가 약간 낮은 부분인 尖體帽(acrosome cap)는 核의 아래쪽으로 모자를 의우듯 퍼져 내려와 核의 中間에 이른다(Fig. 8, 9).

5. 尖體 前期(early acrosome stage)

尖體前期에는 圓形이던 核이 타원형으로 變形하면서 核質의 濃縮이 시작된다. 尖體顆粒은 核의 中間 이하에까지 퍼진 상태이다(Fig. 10).

6. 尖體 後期(late acrosome stage)

核質은 아래쪽의 일부를 제외하고 거의 濃縮이 완료되었으며, 核輪과 만펫트가 核의 아래 부분으로 移動함에 따라 核을 細長化시켰고, 核의 아래쪽에 近位中心粒(proximal centriole), 遠位中心粒(distal centriole), 終輪(annulus) 등이 形成되었다(Fig. 17). 이때 核의 中間부분이 잘록하게 들어가 赤道帶(equatorial segment)가 형성되며 核輪은 核의 中間 이하로 내려가고 終輪이 형성된다(Fig. 12). 또한 核質의 濃縮이 완성됨에 따라 頸部를 수용할 床窩(implantation fossa)의 형태를 갖추었다(Fig. 11, 12, 13, 17).

7. 成熟期(maturation stage)

이 시기에는 完成된 精子의 모양을 갖춘다. 核膜肥厚部가 형성되고 여분의 核膜은 봉부(nuclear envelop)처럼 매달려 있고, 頸部에 原形質滴(cytoplasmic droplets)이 남아 있다(Fig. 14). 또한 終輪이 中片部の 아래쪽으로 移動하면서 미토콘드리아가 軸索(axoneme)과 外側纖維를 나선상으로 감싸며 미토콘드리아鞘을 形成하였다(Fig. 15).

한편 主部에서 軸索을 섬유초가 둘러싸며 9 + 9 + 2의 典型的인 형태를 갖추는데(Fig. 16, 18, 19), 1, 5, 6, 9번의 외측섬유가 나머지보다 굵고 이들은 尾部の 末端에 이르면서 없어진다(Fig. 19).

성숙정자의 머리는 尖體가 덮은 상태로 보아 세 부분으로 나눌 수 있는데, 前半部(anterior one-half of nucleus)는 두터운 尖體로 덮여 있고, 核의 中間부분(waist-formregion)은 얇은 尖體의 赤道帶로 싸였으며 나머지 부분은 核膜肥厚部로 덮여 있어 개 특유의 精子形態를 갖춘다(Fig. 14).

IV. 考 察

각 動物의 精子完成 區分을 보면 사람은 6기 또는 8기로, 青어우, 狒狒는 10기로, 汗우, 산양, 돼지, 쟁겨우우는 9기로 細分하였는데, 珍島犬의 경우 7기로 나눌 수 있어 사람의 경우와 가장 비슷하였다.

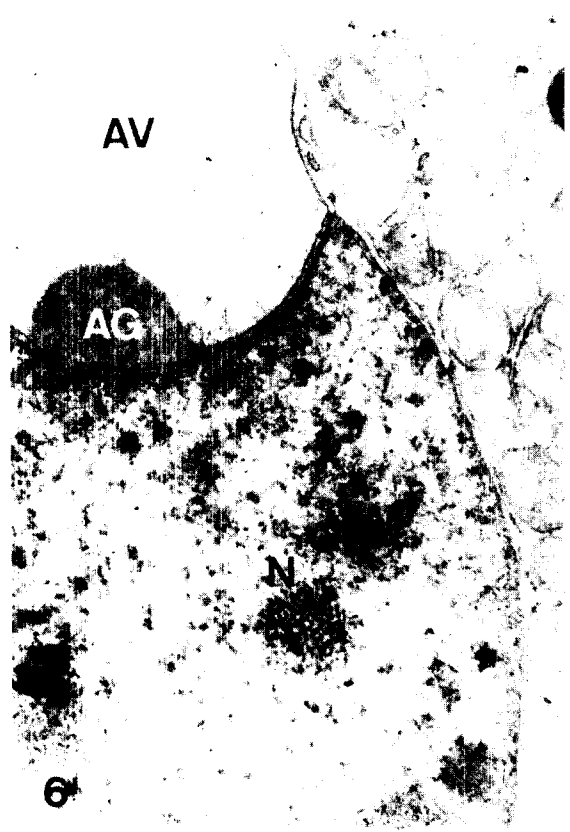
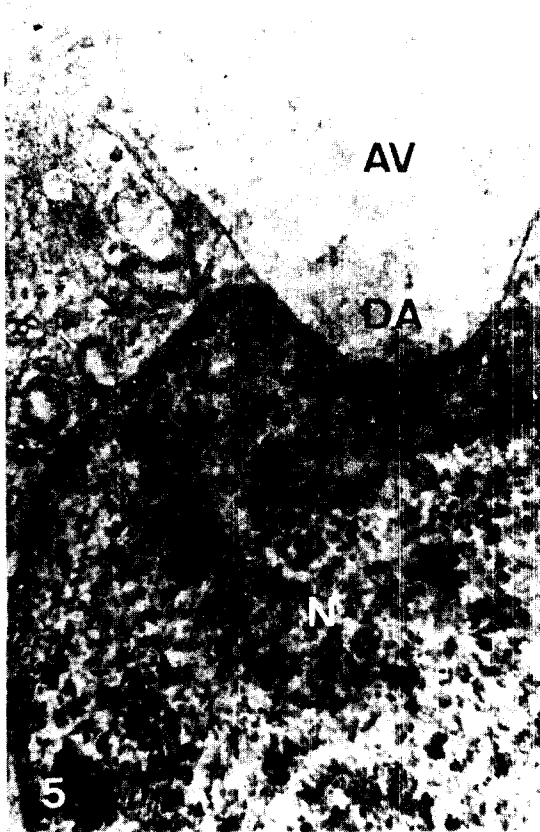
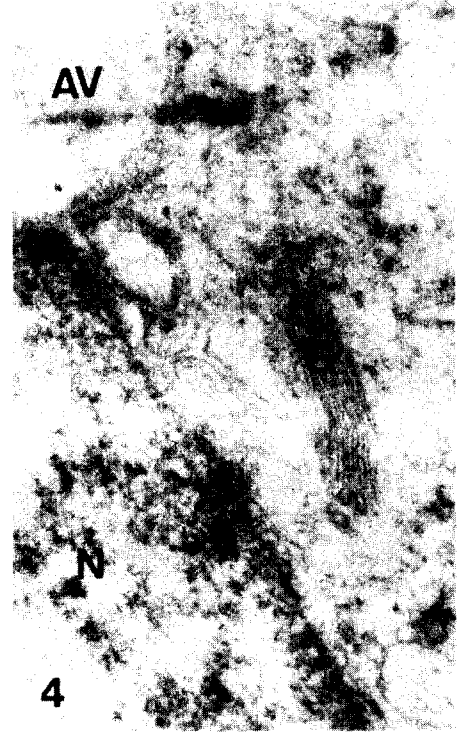
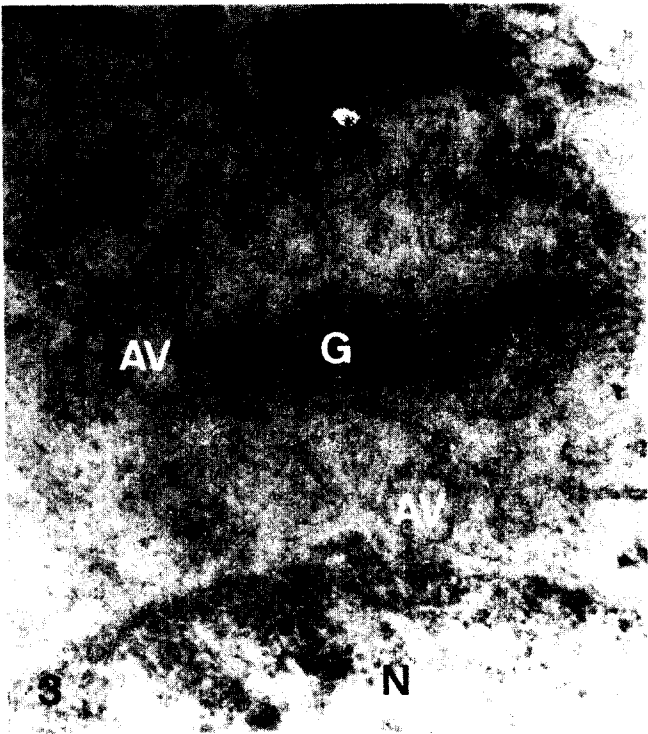
電子顯微鏡으로 觀察한 珍島犬의 精子完成段階는 크게 4 단계로 구분할 수 있고, 各段階別 특징에 따라 더욱 細分하여 7기로 나누었다. 이는 사람(Holstein and Roosen-Runge, 1981), 韓牛(裊, 1984; 裊와 金, 1984), 山羊(裊와 金, 1985), 돼지(金, 1986) 등의 完成過程과 비슷하다. 그러나 개의 精子完成에 관한 電子顯微鏡의 研究을 찾아보기 어렵고, 試料의 절단방향을 마음대로 정할수도 없어 各期別 區分은 어느 정도 主觀에 의존할 수밖에 없었다.

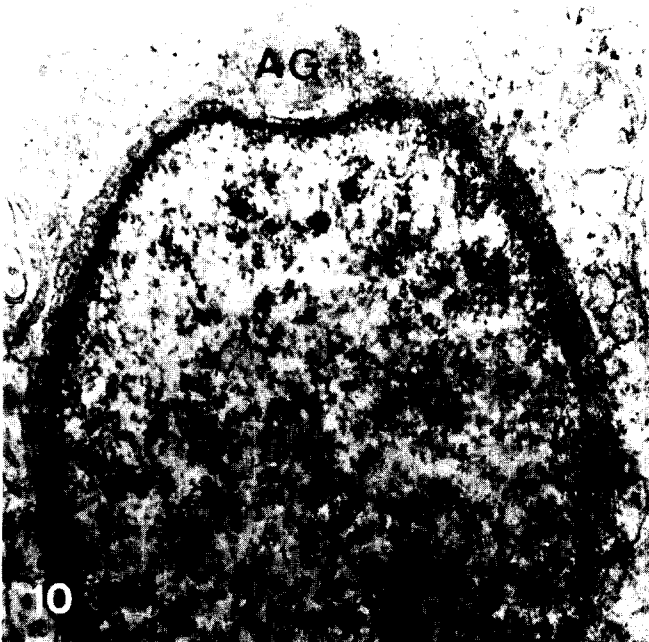
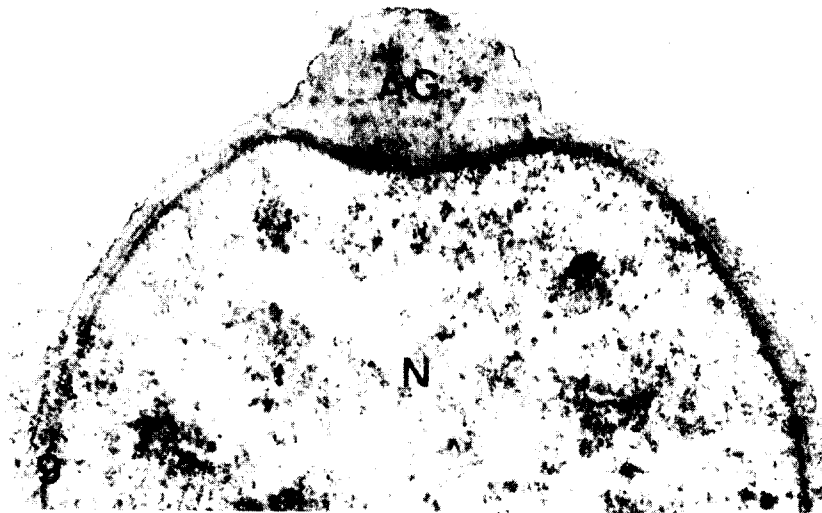
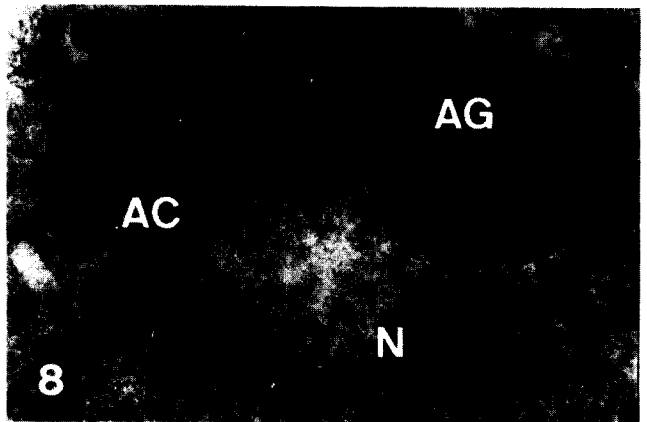
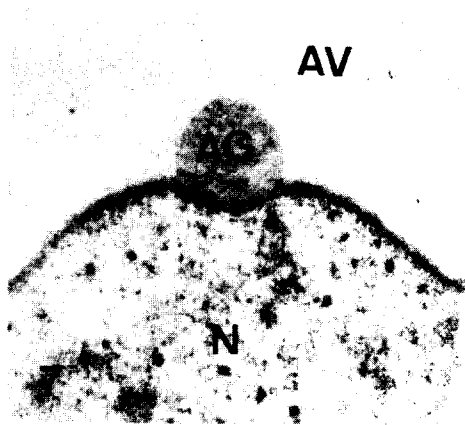
Golgi 段階에 있어서 노끼(Hadek, 1963a, b; Plöen, 1971), 狒狒(Afzelius et al, 1982), 韓牛(裊와 金, 1984), 山羊(裊와 金, 1985), 돼지(金, 1986), 쟁겨우우(金 등, 1987)에서는 이미 尖體顆粒이 形成되어 圓形의 狀態로 觀察된 것에 비하여 珍島犬의 경우는 Golgi 後期에 電子密度가 높은 물질이 모이는 것(Fig. 5)이 약간 다르다.

頭帽段階는 尖體顆粒이 쟁겨 核表面을 모자를 의우듯 퍼져 내려와 核의 中間에 이르는데, 이 때 精子細胞의 核은 약간 타원형으로 변하게 된다. 青어우(Anderson, 1978)와 狒狒(Afzelius et al, 1982)의 경우 尖體顆粒의 주위를 침체소로의 내용물이 낀을 두께로 둘러싼 狀態로 觀察된 것처럼 珍島犬도 그와 비슷한 모양을 한다. 韓牛(裊와 金, 1984)의 경우 침체과립이 주위의 투명한 小胞體로 비교적 두텁게 싸여있다고 報告되었는데, 珍島犬에서는 頭帽前期에 두텁게 싸고 있다가 後期에 얇게 되는 것으로 보아 큰 차이는 없다고 여겨진다.

頭帽前期까지 거의 圓형이던 精子細胞는 尖體前期에 이르러 만펫트의 出現으로 核을 조여 내려감으로써 긴 타원형으로 변한다고 생각되며, 尖體後期에는 精子의 形態를 거의 갖추고 다만 核質의 濃縮이 덜 되었고 核輪이 核의 終端까지 下向하지 못하였다.

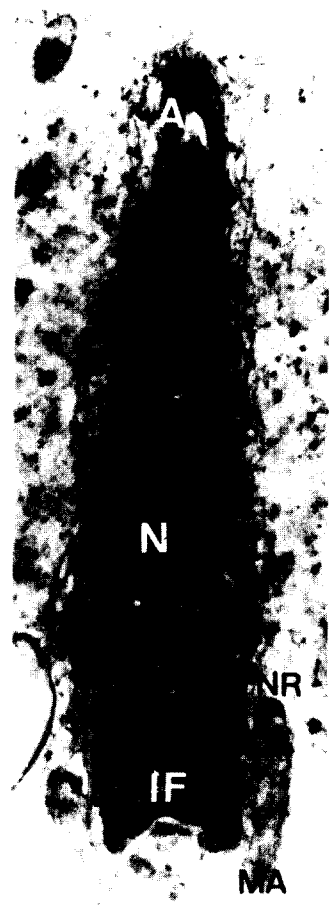
珍島犬의 成熟한 精子의 頭部에 있는 赤道帶는 核의 前半部를 덮고 있는 침체보다 현저하게 얇고 濃厚한 狀態로 觀察되었는데, 이는 韓國山羊(裊와 金, 1985)에서는 尖體期에 形成되었던 赤道帶가 成熟精子에서는 없어졌으나 개의 精子는 成熟後에도



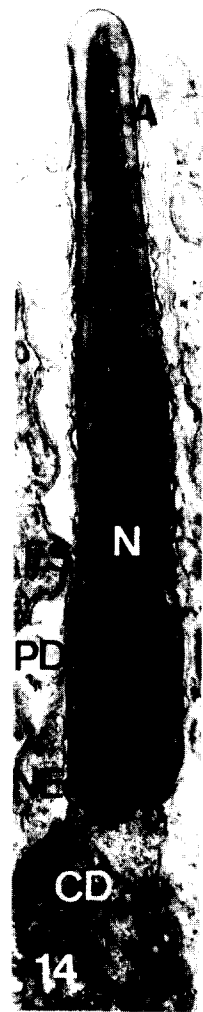




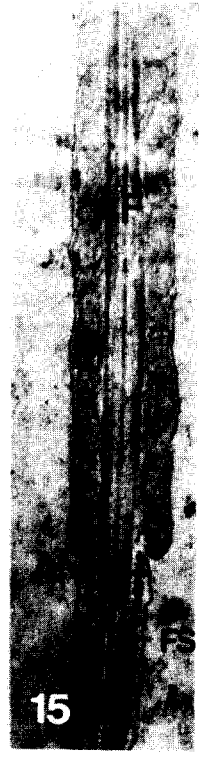
12



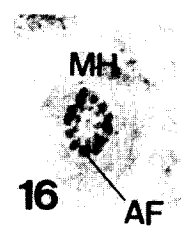
13



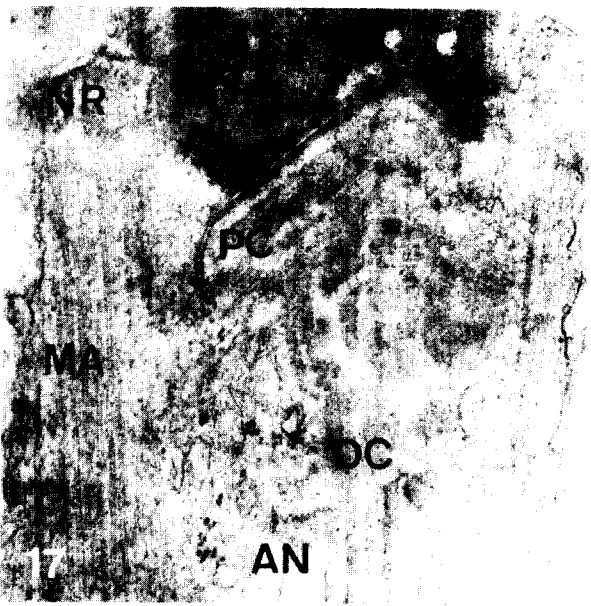
14



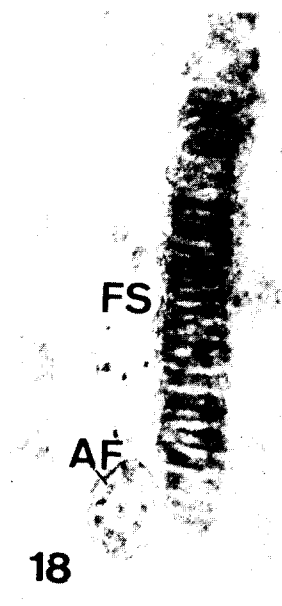
15



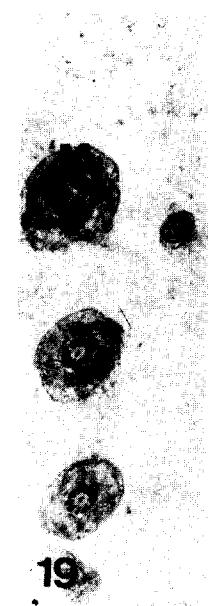
16



17



18



19

Fig. 3. In the early Golgi stage some acrosomal vesicle (AV) surrounded by a Golgi apparatus (G) have approached to the nucleus (N). Several acrosomal vesicle (AV) is seen near the Golgi apparatus. X40,000.

Fig. 4. An expanded acrosomal vesicle (AV) contacted with nuclear membrane in the late Golgi stage. A Golgi apparatus (G) is seen in the neighborhood of the acrosomal vesicle (AV). X40,000.

Fig. 5. In the late Golgi stage a big acrosomal vesicle (AV) with electron dense acrosomal material (DA) is indenting on the nucleus. The electron dense acrosomal material is accumulating to the nuclear membrane. X24,000.

Fig. 6. A bonnet-form acrosomal granule (AG) is formed in the acrosomal vesicle (AV) in the late Golgi stage. X24,000.

Fig. 7. The acrosomal granule (AG) has change to an oval form and the acrosomal vesicle (AV) is flattened to the surface of the nucleus in the early cap stage. X14,000.

Fig. 8. The acrosomal cap spreads over the surface of the acrosomal granule and the nucleus in the late cap stage. X24,000.

Fig. 9. The more expanded acrosomal cap (AC) hangs down to the caudal part of the nucleus in the late cap stage. X24,000.

Fig. 10. In the early acrosome stage the acrosomal cap (AC) material is more expanded to the caudal nucleus. X24,000.

Fig. 11. In the late acrosome stage the elongated nucleus with flattened acrosome (A) has the manchette (MA) around the distal part of the nucleus. The nuclear ring (NR) is seen apparently in this stage. X24,000.

Fig. 12. In the late acrosome stage the nucleus has become waist-form and is formed the implantation fossa (IF). The nuclear ring (NR) with the manchette (NA) moves to the caudal part of the nucleus. X19,250.

Fig. 13. The acrosome can be distinguished from the postacrosomal dense lamina (PD) in the late acrosome stage. X24,000.

Fig. 14. In the maturation stage the karyoplasm is completely condensed and spermatozoon head has an equatorial segment (ES). NE: nucleus envelope. PD: postacrosomal dense lamina. CD: cytoplasmic droplets. X24,000.

Fig. 15. The longitudinal section through the mid piece (MP) shows cross sections of mitochondria (MP and fibrous sheath (FS). AF: axoneme fibre. AN: annulus. X24,000.

Fig. 16. The cross section of the mid piece at the maturation stage shows the mitochondrial helix (MH) and typical axoneme fibre (AF). X24,000.

Fig. 17. In the late acrosome stage centriolar adjunct disappeared remain proximal centriole, dis-integrating the distal centriole. X40,000.

Fig. 18. The longitudinal section of the principal piece shows surface view of fibrous sheath (FS). AF: axoneme fibre. X40,000.

Fig. 19. Many cross sections of tails show axoneme fibre (AF) and mitochondrial helix (MH). X24,000.

뚜렷하게 남아 있다. 또한 Bedford와 Nicander (1970)의 토끼, 원숭이, Bernstein 등(1972)의 토끼, 사람, 소, Andersen (1974)의青衣우, Courtens와 Lior (1981)의 돼지, 소, 염소, 쥐, 생쥐, 말, Friend 등(1977)의 기니아 피그, 襄와 金(1985)의 韓國山羊, Flaherty (1987)의 plain mouse 등에서 觀察된 것처럼 種에 따라 赤道帶의 形態가 다르다.

또한 포유류에서 일반적인 경우처럼 珍島犬 精子의 主部도 軸索을 纖維鞘가 감싸고 있다. 이는 鳥類의 精子 主部가 무정형물질(amorphous material)로 둘러싸인 것과는 서로 다른데(Lake et al., 1968; 襄와 金, 1987a, b) 이는 哺乳類와 鳥類精子間의 微細構造의 差異라고 할 수 있다.

이상과 같이 珍島犬의 精子完成은 種의 형성단계에 있어서 사람, 소, 山羊, 돼지, 狒狒 등과 거의 비슷하고, 微細構造는 精子頭部의 형태 중에서 赤道帶 모양 및 伸長된 程度가 青衣우(Andersen, 1974)의 精子와 가장 닮았다고 할 수 있다. 이로써 개와 여우는 같은 무리에 속한다고 추측할 수 있다.

V. 摘 要

成熟한 珍島犬 精巢의 表層 深層과 精巢上體 頭部에서 組織을 切取하여 試料를 調製한 다음 電子顯微鏡으로 精子完成過程과 精子를 觀察한 結果는 다음과 같다.

1. 細胞物質의 一時的 또는 永久的 形態에 따라 珍島犬의 精子完成過程은 Golgi·頭帽·尖體·成熟의 네 段階로 大別하고, 이를 다시 細分하여 7기로 나눌 수 있다.

2. 尖體段階에서 만헛트의 起始部가 核輪을 形成하여 이것이 核의 아래쪽으로 移動함에 따라 核質이 濃縮되면서 核이 細長化한다.

3. 尖體後期에 核의 中間部分이 잘록하게 되어 輪狀의 赤道帶가 形成되고 成熟後까지 存在한다.

4. 成熟段階에 頭部의 核質은 거의 완전한 濃縮과 함께 細長化가 끝나고, 中片部에 미토콘드리아 鞘가 形成되기 시작한다.

5. 完成된 精子는 核質의 濃縮이 完了되고, 中片部에 完全한 미토콘드리아 鞘를 形成하며 尾部의 軸纖維束이 典型的인 構造를 하고 있다.

VI. 引用文獻

1. Afzelius, B.A., R.E. Johnsonbaugh, J.W. Kim, L. Ploen, and E.M. Ritzen. 1982. Spermatogenesis and testicular spermatozoa of the olive baboon (*Papio anubis*). J. Submicrosc. Cytol. 14:627-639.
2. Andersen, K. 1974. Ultrastructural studies of blue fox spermatozoa. Acta Vet. Scand. 15:620-630.
3. Andersen, K. 1978. Fine structure of developing spermatids used as a basis for staging of the spermateliosis in the blue fox (*Alopex lagopus*) Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryo. 7:164-181.
4. Bedford, J.M., and L. Nicander. 1970. Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. J. Ant. 108, 3:527-543.
5. Bernstein, H. Maurice, and J. Robert. Teichman. 1972. Regional differentiation in the heads of spermatozoa of rabbit, man and bull. Am. J. Anat. 133, No. 2: 165-178.
6. Brown, H.H. 1885. On spermatogenesis in the rat. Quart. J. Mocr. Sci. 25:343. Cited by Swiestra and Foote, 1963.
7. Courtens, J.L., and M. Lior. 1981. A cytochemical study of nuclear changes in boar, bull, goat, mouse, rat, and stallion spermatids. J. Ultrast. Res. 74:327-340.
8. Flaherty, S.P. 1987. Further ultrastructural observation on the sperm head of the plain mouse, *Pseudomys australis* (Rodentia: Muridae). The Anatomical record. 217: 240-249.
9. Friend, D.S., L. Orci, A. Perrelet, and R. Yanagimachi 1977. Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. J. Cell Biol. 74:561-577.

10. Hadek, R. 1963a. Submicroscopic changes in the penetrating spermatozoon of the rabbit. *J. Ultrastruct. Res.* 8:161-169.
11. Hadek, R. 1963b. Study on the fine structure of rabbit sperm-head. *J. Ultrastruct. Res.* 9:110-122.
12. Holstein, A.F., and E.C. Roosen-Runge. 1981. *Atlas of human spermatogenesis.* Gross Verlag, Berlin.
13. Jones, R.C. 1971. Studies of the structure of the head of boar spermatozoa from the epididymis. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 13:51-64.
14. Lake, P.E., W. Smith, and D. Young. 1968. The ultrastructure of the ejaculated fowl spermatozoon. *Quart J. Exp. Physiol.* 53:356-366.
15. Leblond, C.P., and Y. Clermont. 1952a. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acidfuchsin sulfurous" epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55:548-573.
16. Leblond, C.P., and Y. Clermont. 1952b. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55:548-573.
17. Ploen, L. 1971. A scheme of rabbit spermatogenesis based upon electron microscopical observations. *Z. Zellforsch.* 115:564.
18. Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26:31-43.
19. Venable, J.H., and R. Coggeshall. 1965. A simplified head citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408.
20. Von Ebner, V. 1888. Zur Spermatogenese bei den Säugethieren. *Arch. Mikrobiol. Anat.* 31:236-292. Cited by Leblond and Clermont, 1952b.
21. 金鍾旭, 1986. 돼지의精子完成에 관한電子顯微鏡的研究. *韓國顯微誌* 16:1~13.
22. 金鍾旭, H.R. Harding, C.D. Shorey. 1987. 캥거루우(Allied Rock Wallaby, *Petrogale assimilus*)의精子完成과精子에 관한電子顯微鏡的研究, *韓電顯微誌* 17:1~15.
23. 裴大植. 1984. 韓牛의精子完成과精子의微細構造에 관한電子顯微鏡的研究. *韓畜誌* 26:509~526.
24. 裴大植, 金鍾旭. 1984. 韓牛의精子完成에 관한電子顯微鏡的研究. *韓家繁研會報* 8:70~78.
25. 裴大植, 金鍾旭. 1985. 韓國山羊의精子完成에 관한電子顯微鏡的研究. *韓家繁研會報* 9:46~56.
26. 裴大植, 金鍾旭. 1987a. 닭의精子完成과精子에 관한電子顯微鏡的研究. *韓畜誌* 10:475~482.
27. 裴大植, 金鍾旭. 1987b. 오리와거위의精子完成과精子에 관한電子顯微鏡的研究. *韓家繁研會報* 11:206~217.