

면역화학적 방법에 의한 정자결함 검색

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실

김 세 중 · 이 무 상

Evaluation of the Spermatozoal Defect with Immunochemical Method

Se Joong Kim and Moo Sang Lee

From the Department of Urology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

= Abstract =

Although many therapies have been advocated in the treatment of idiopathic male infertility, the results of treatment are poor. This probably seems to be due to a lack of one or more proteins constituting the key structures of the spermatozoa.

We evaluated the functional structures of the spermatozoa in 11 infertile patients whose semen showed severe oligoasthenozoospermia with immunochemical method and found a case with spermatozoa lacking acrosin.

Evaluation of the spermatozoal defect with immunochemical method is desirable in patients with severe oligoasthenozoospermia, especially in cases unresponsive to medical therapy.

서 론

특발성 불임환자는 남성 불임증의 약 25%를 차지하며, 이들 환자들에서 여러 약제의 투여가 시도되고 있으나, 그 효과는 별로 고무적이지 못한 실정이다(Sigman & Vance, 1987). 그 이유는 아마도 이들의 상당수에서, 특히 심한 정자의 운동성 장애나 정자형태의 이상소견을 보이는 환자들에서 정자자체에 결함이 있기 때문으로 생각된다. 따라서 이들 환자들에서 정자의 형태학적 및 기능적 결함여부를 검색해 보는 것이 중요하겠으나, 임상에서는 아직도 대개의 경우 일반 정액검사만 시행하고 있는 실정이다. 그러나 최근 개발된 정자의 주요 구성단백질에 대한 항체를 이용한 면역화학적 방법으로 비교적 손쉽게 정자의 결함여부 검색이 가능하게 되었다.

이에 저자들은 심한 정자의 운동성 저하나 정자형태의 이상소견을 보이는 특발성 불임환자를 대상으로 면역화학적 방법을 이용하여 정

자의 결함여부를 검색해 보고자 본 연구에 착수하였다.

대상 및 방법

호르몬 검사(FSH, LH, testosterone, prolactin)와 이학적 검사에서 이상소견이 없으면서, 3번이상 시행한 정액검사에서 계속 심한 정자의 운동성 저하나 정자형태의 이상소견을 보이는 특발성 불임환자 11명과, 대조군으로 결혼해서 자녀가 있고, 정액검사에서 정상소견을 보이는 건강한 남성 4명을 대상으로 하였다. 정자의 면역화학적 검사에 이용되는 항체는 Spermascreeen kit(Serono Co., Italy)를 이용하였다.

검사방법은 2-3일간 금욕후 용수법으로 정액을 채취하여 시험관에 넣어서 액화시키고, phosphate buffered saline(PBS) 10ml에 섞어서 700-800rpm으로 10분간 2-3번 원심분리하여 정장액을 제거한 후, 침전물을 PBS 5ml로 희석시킨다. Gatenby's glue를 슬라이드에 얇게 도포하고 수직으로 세워서 말린 후, 정자를 슬라이드에 도말하여 상온에서 말린다. 슬라이드를 순수 메탄올에 -20℃에서 15분간, 순수 아세톤에 -20℃에서 5분간 담가서 고정시킨 후

*본 연구는 1990년도 연세대학교 의과대학 연구장사 연구비의 보조를 받았음.

*본 논문의 요지는 1990년도 대한비뇨기과학회 제42차 학술대회에서 발표되었음.

말린다. 정자가 있는 부위를 PBS로 재수화시키고, normal goat serum 50 μ l를 상온에서 15분간 접촉시킨 후 제거한다. 1차 항체(actin, acrosin, dynein, tubulin, hyaluronidase 항혈청) 50 μ l를 정자가 있는 부위에 균일하게 분포되도록 접촉시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 습기있는 용기에 넣어 하룻밤 유지한 후 PBS로 10분간 3번 씻는다. Alkaline phosphatase가 결합되어 있는 2차 항체

(goat antirabbit IgG) 50 μ l를 접촉시키고, 20-25 $^{\circ}$ C에서 습기 있는 용기에 넣어 1시간동안 유지한 후 PBS로 10분간 3번 씻는다. 수매질 용액(BCIP+NBT+DMF+Buffer Tris HCl) 50 μ l를 슬라이드에 접촉시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 습기있는 용기에 넣어 40분간 유지한 후 증류수로 씻는다. 글리세롤 1방울을 떨어뜨리고 덮개유리로 덮은 후 광학현미경하에서 관찰한다. 양성반

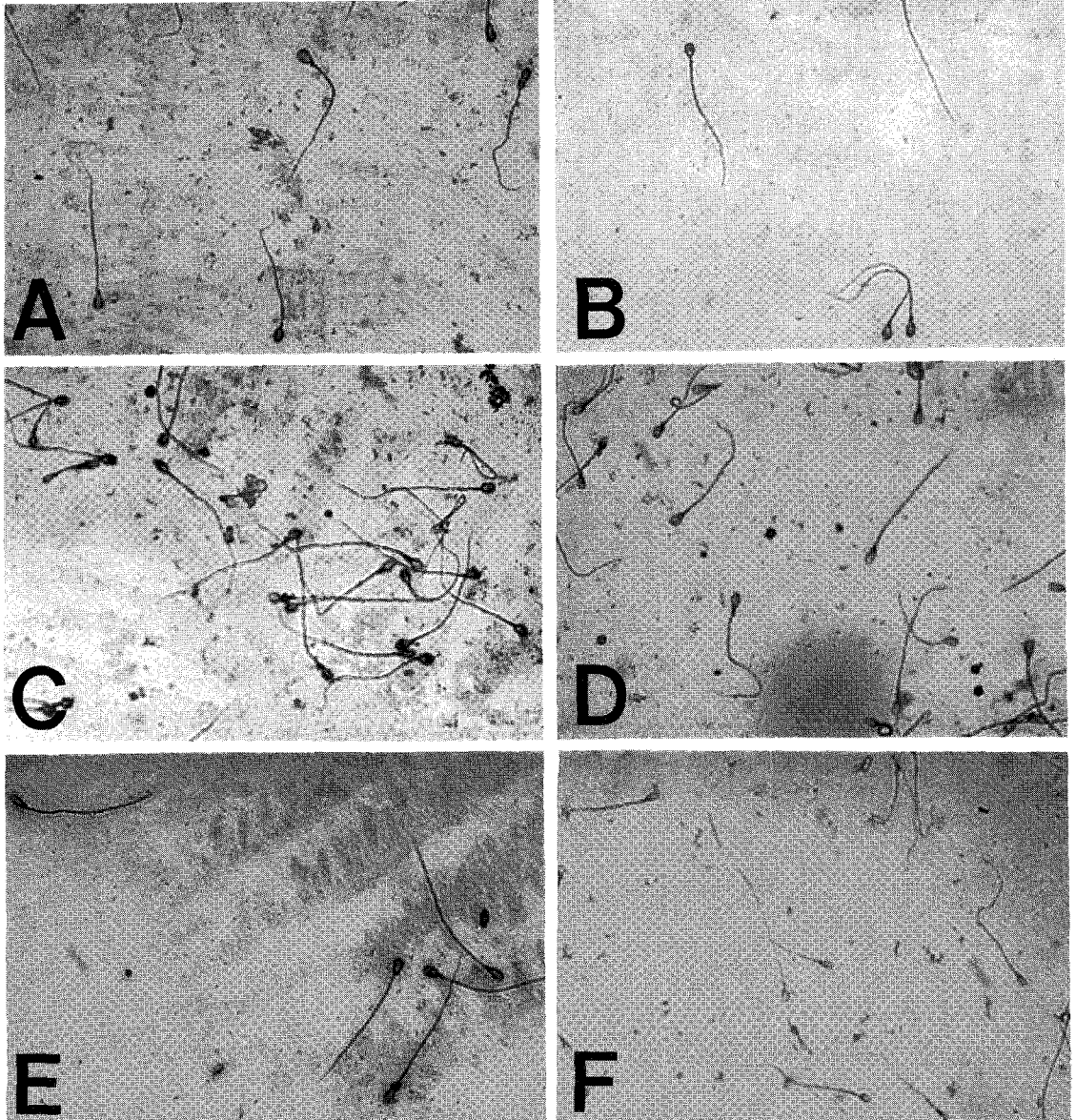


Fig. 1. Normal pattern of staining. A) Staining at the acrosomal area with acrosin antiserum. B) Staining at the acrosomal area with hyaluronidase antiserum. C) Staining at the tail with tubulin antiserum. D) Staining at the tail with dynein antiserum. E) Staining at the subacrosomal, centriolar area and tail with actin antiserum. F) Negative blank.

응을 나타내는 부위는 푸른 빛을 띄게 된다.

결 과

대조군에서 시행한 면역화학적 검사결과 acrosin 및 hyaluronidase는 정자의 선체에, tubulin 및 dynein은 정자의 꼬리에, 그리고 actin은 정자의 선체부위, 중심소체 및 꼬리에 염색되었다(그림 1. A-E). 이들의 염색상황은 1차 항체를 접촉시키지 않은 음성 대조군(그림 1. F)과 비교하여 봄으로써 확인가능하였다.

특발성 불임환자 11명의 연령은 30-41세였고, 불임기간은 2-11년이었다. 정액검사소견에서 정자수는 $2-93 \times 10^5/ml$, 정자운동성은 0-20%였고, 정자형태는 25-60%에서 정상 형태를 나타내었다(표 1). 면역화학적 검사결과 1례에서 이상소견이 관찰되었는데, 검사한 5가지

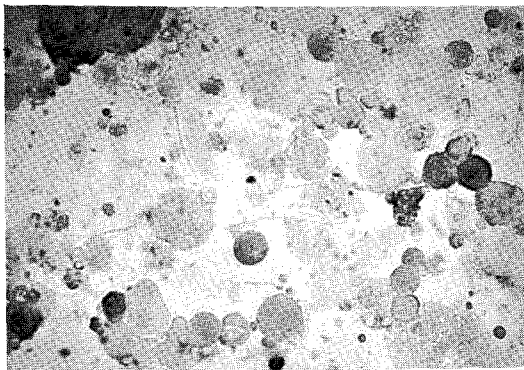


Fig. 2. Case 4. No staining at the acrosomal area with acrosin antiserum.

단백질중 acrosin에 대해서만 음성을 나타내었고(그림 2), 그외의 4가지 단백질에 대해서는 양성을 나타내었다.

고 찰

정자는 머리와 꼬리로 구성되며, 머리의 앞부분에는 선체(acrosome)가 존재한다(Fawcett, 1975). 선체에는 여러 효소들이 존재하여 선체반응(acrosome reaction)시 방출되게 되는데, 이들중 acrosin과 hyaluronidase가 주된 성분이며, 수정시 난자를 둘러싸고 있는 층을 정자가 통과하는데 중요한 역할을 하게 된다. 즉, hyaluronidase는 hyaluronic acid가 주성분인 난구(cumulus oophorus) 기질을 제거시켜 주며, acrosin은 투명대(zona pellucida)를 정자가 통과하는데 도움을 준다(McRorie & Williams, 1974; Morton, 1975). 꼬리의 가장 중요한 구조는 축사(axoneme)로서, 2개의 중심부 마이크로세관(microtubule)과 이를 둘러싸는 9개의 마이크로세관 이중선(doublet)으로 구성된다. Tubulin은 마이크로세관을, dynein은 마이크로세관 이중선의 팔(arm)을 구성하며, 정자의 운동에 관여한다(Fawcett, 1975; Baccetti et al., 1981; Virtanen et al., 1984). Actin은 선체하 부위(subacrosomal space), 선체후 부위(postacrosomal region), 중심소체(centriole) 및 꼬리주요구획(principal piece)의 나선초(spiral sheath)에 존재하며, 선체반응과 정자의 운동에 도움을 준다(Fawcett, 1975; Virtanen et al.,

Table 1. Characteristics of the patients

Case	Age	Duration of infertility(yrs)	Semen quality			Spermascreen test
			Count($\times 10^5/ml$)	Motility(%)	Morphology(%)	
1	33	4	3	10	60	+
2	31	3	10	10	50	+
3	34	7	90	0	40	+
4	41	11	2	5	30	*
5	30	3	3	20	40	+
6	31	2	93	5	25	+
7	31	4	2	10	50	+
8	31	5	70	20	40	+
9	32	4	30	10	50	+
10	33	3	20	10	40	+
11	31	4	7	5	60	+

*Spermatozoa of case 4 revealed that acrosin was negative but the other proteins tested were positive.

1984; Baccetti et al., 1988). 따라서 이들 5가지 요소는 수정능에 중요한 역할을 하며, 이들 요소의 존재여부를 확인해 봄은 수정능의 판정에 중요하겠다.

불임환자에서의 정자의 형태학적 결함에 관한 보고들을 살펴보면 선체의 결함과 꼬리축사의 결함으로 대별된다(Baccetti et al., 1988). 선체의 결함으로는 가장 심한 경우에 선체가 전혀 없는 소위 "round-headed" 정자로 나타나며(Pedersen & Rebbe, 1974; Jeyendran et al., 1985), 선체의 성형에 변화가 오는 경우도 있다(Renieri, 1974). 꼬리 축사의 결함으로 가장 심한 경우는 tubulin 및 dynein이 결여됨으로써 꼬리가 짧은 정자로 나타나거나(Baccetti et al., 1975), 광학현미경하에서의 정자형태는 정상이면서 축사가 결여된 정자로 나타나는 경우이고(Baccetti et al., 1980), 축사의 중심부 마이크로세관이 없는 "9+0" 형태나(Baccetti et al., 1979), dynein arm이 결여된 경우(Afzelius et al., 1975; Afzelius & Eliasson, 1979) 등도 보고되어 있다. 정자결함의 검색을 위해서는 전자현미경 검사 혹은 항체를 이용한 면역형광현미경 검사가 이용될 수 있으나, 아직까지 임상에서는 널리 이용되지 못하고 있는 실정이다.

그러나 최근 개발된 정자의 주요 구성단백질에 대한 항체를 이용한 면역화학적 방법으로 정자내 상기 다섯 요소의 존재여부를 판정해 봄으로써, 비교적 손쉽게 정자의 결함여부를 검색할 수 있게 되었다. 저자들은 본 검사방법을 이용하여 증례 4에서 acrosin에 결함이 있음을 발견하였고, 이 환자에서 불임의 해결책으로는 미세주작기를 이용한 정자미세주입술(sperm microinjection), 공급자 수정(artificial insemination with donor sperm) 혹은 입양이 있겠다.

본 검사는 비교적 많은 비용이 드는 검사방법이므로, 불임환자 11례중 1례에서만 정자의 결함이 발견된 것으로 보아 임상이용시 비용효과적인 면에서 의문점이 제기될 수 있으며, 이의 검증을 위해서는 향후 더 많은 환자에서 검사를 시행해 보아야 할 것으로 생각된다. 그러나 본 검사를 이용하여 정자의 결함이 발견된다면 불필요한 치료에 드는 시간, 경비 및 노력을 줄일 수 있으리라 생각되므로, 심한 정자의 운동성 저하나 정자형태의 이상소견을 보이는 환자, 특히 약제의 투여에 반응을 보이지 않는 환자에서 시행해 볼만한 검사로 인정된다.

결 론

심한 정자의 운동성 저하나 정자형태의 이상소견을 보이는 특발성 불임환자 11명을 대상으로 면역화학적 방법으로 정자의 결함여부를 검색해 본 결과 1명에서 정자의 결함을 발견하였다.

본 검사는 심한 정자의 운동성 저하나 정자형태의 이상소견을 보이는 환자, 특히 약제의 투여에 반응을 보이지 않는 환자에서 시행해 볼만한 검사로 사료된다.

인 용 문 헌

- Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindholmer C: Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol* 1975, 66, 225-232.
- Afzelius BA, Eliasson R: Flagellar mutants in man: On the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome. *J Ultrastruct Res* 1979, 69, 43-52.
- Baccetti B, Burrini AG, Pallini V, Renieri T, Rosati F, Menchini Fabris GF: The short-tailed human spermatozoa. Ultrastructural alterations and dynein absence. *J Submicr Cytol* 1975, 7, 349-359.
- Baccetti B, Burrini AG, Maver A, Pallini V, Renieri T: "9+0" immotile spermatozoa in an infertile man. *Andrologia* 1979, 11, 437-443.
- Baccetti B, Burrini AG, Pallini V: Spermatozoa and cilia lacking axoneme in an infertile man. *Andrologia* 1980, 12, 525-532.
- Baccetti B, Burrini AG, Pallini V, Renieri T: Human dynein and sperm pathology. *J Cell Biol* 1981, 88, 102-107.
- Baccetti B, Burrini AG, Collodel G, Magnano AR, Piomboni P, Renieri T: Immunocytochemistry and sperm pathology. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1988, 20, 209-224.
- Fawcett DW: The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975, 44, 394-436.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Kennedy WP, Heath E, Perez-Pelaez M, Sobrero AJ, Zaneveld LJD: Acrosomeless sperm. A cause of primary male infertility. *An-*

- drologia* 1985, 17, 31-36.
- McRorie RA, Williams WL: Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann Rev Biochem* 1974, 43, 777-803.
- Morton DB: Acrosomal enzymes: Immunochemical localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 1975, 45, 375-378.
- Pedersen H, Rebbe H: Fine structure of round-headed human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1974, 37, 51-54.
- Renieri T: Submicroscopical observations on abnormal human spermatozoa. *J Submicr Cytol* 1974, 6, 421-432.
- Sigman M, Vance ML: Medical treatment of idiopathic infertility. *Urol Clin North Am* 1987, 14, 459-469.
- Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R, Lehto VP: Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol* 1984, 99, 1083-1091.
-