

진도견 정자형성계 세포들의 Lectin-binding patterns

박 영 석 · 이 성 호*

일본낙농대학 수의해부학교실
공주전문대학*
(1996년 3월 18일 접수)

Lectine-binding patterns of spermatogenic cells in the Jindo dog

Young-seok Park, Seong-ho Lee*

*Department of Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University, Hokkaido, Japan
KongJoo National Junior College, Korea**

(Received Mar 18, 1996)

Abstract : The lectin-binding patterns in the testis of the sexually matured Jindo dog were investigated to study the distribution of glycoconjugates in the seminiferous tubule under light and transmission electron microscopy.

Positive reactions to Wheat germ agglutinin(WGA) and Dolichos biflorus agglutinin (DBA) were observed in the Sertoli cell and in the residual body of spermatid with a stronger reaction in the Sertoli cell to the lectins than in the residual body.

Strong reactions to Soybean agglutinin(SBA) and Peanut agglutinin(PNA) were observed in the acrosome vesicles of the Golgi- and cap-phase spermatid, while a moderate reaction was observed in the acrosome-phase, maturation-phase spermatid and the residual body.

The acrosome area of the spermatid reacted intensively to Griffonia simplicifolia agglutinin(GS-I) when the cell was in the acrosome-phase and maturation-phase, and the same reaction to the GS-I was observed in the residual body. However, the seminiferous tubule did not react to Ulex europeus agglutinin I(UEA-I).

The gold-labelling of the Sertoli cells with DBA resulted in positive reactions of the Sertoli cell column and processes when observed under the electron microscopy, while the Golgi-, cap- and acrosome-phase spermatids reacted positively to SBA in the peripheral low-dense area of the acrosome vesicle of spermatid. Based on these results, we concluded that differences in the lectin-binding pattern of the seminiferous tubules were recognized in the Jindo dog compared to other animals.

Key words : lectin, dog, WGA, DBA, SBA, PNA, GS-1, UEA-1.

서 론

정자형성계 세포의 ATP생산과 단백질 합성 등에 필수적으로 이용되는 탄수화물은 탄수화물 잔기와 특이적으로 반응하는 lectin 면역조직화학 등이 검출방법으로 이용되고 있다.

20종의 lectin을 사용하여 사람의 정자와 각종 정세포에서 lectin 결합부위를 검출한 결과 정자발생과정에 따라서 각종 정세포의 glycoconjugates 분포는 변화되며¹, 정세포들은 발육하는 동안에 풍부한 탄수화물을 함유하고 glycosyl moieties의 특이적인 변화를 보인다². 설치류에서 rodamine-conjugated lectins를 이용하여 서로 다른 당잔기를 갖는 당단백질(glycoproteins)의 검출은 성숙중인 정자세포 외막, 첨단체, 기저막 등에 친화력이 있으며, 주기적인 변화상이 관찰되어 이러한 방법은 음성 생식선의 당단백질 분포, 분비, 흡수 및 감소 등의 분석에 매우 유용한 방법으로 알려져 있다³. 생식기관에서 glycoconjugate의 분비 및 합성부위의 분포는 광학현미경을 이용한 10종류의 lectins 반응의 관찰에 의해 알려졌다⁴. Fazel 등⁵은 쥐의 원시 정세포에서 α -N-acetyl-galactosamine 종말이 포함된 glycoconjugate의 두 표면을 fucose-specific lectin conjugate 반응으로 검출하고, 전자현미경으로 관찰하여 정세포 표면 glycoconjugate의 특수구조의 차이를 보고하였다. 또한 쥐의 정자형성과정 동안에 분화하는 첨단체내 당단백질의 조성분포에서 완성된 첨단체에는 N-,O-linked oligosaccharides를 함유하며 완성된 정자에서 당단백질은 바깥첨단체막에 현저히 분포한다고 하였다⁶. Ertl과 Wrogel⁷은 소를 대상으로 생후부터 성성숙까지 8종류 lectin을 사용하여 탄수화물 잔기의 정세포내 분포를 보고하였으며, Kurohmaru 등⁸은 성성숙한 산양 정세포들의 lectin binding pattern들이 다른 동물과는 다소 다른 pattern을 나타내 동물 특이성을 갖는다고 하였다.

본 실험은 지금까지 보고된 바 없는 성 성숙한 진돗개의 정자형성계 세포에서 lectin 면역조직화학적 방법을 이용하여 정세포내 glycoconjugates의 분포와 정자형성계의 탄수화물 대사기전을 밝히는 기초자료를 얻고자 시도하였다.

재료 및 방법

성 성숙한 1-2년생 수컷 진돗개 4 마리를 국소마취한

후 우측고환은 광학현미경, 좌측고환은 전자현미경 시료로 각각 제작하였다.

광학현미경용 시료제작 및 lectin 면역조직화학 : 우측고환은 약 5mm³로 세절한 후 2% calcium acetate를 함유한 10% formalin으로 고정하였으며 고정된 조직은 탈수 등 조직표본 제작과정을 거쳐 paraplast에 포매하였고 5 μ m의 절편을 제작하였다. 5m의 조직들은 1% BSA(bovine serum albumin) 10mM PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척한 후 0.3% H₂O₂가 함유된 methanol에 15분간 처리하여 내인성 peroxidase를 제거하였다. slide들은 WGA(Wheat germ agglutinin), DBA(Dolichos biflorus agglutinin), SBA(Soybean agglutinin), PNA(Peanut agglutinin), GS-I(Griffonia simplicifolia agglutinin)과 UEA-I(Ulex europeus agglutinin I) 등 6종류의 biotiny lectins(Vector Lab., 0.1% BSA-PBS)을 각각의 slide에 점적한 후 4℃에서 12시간 배양하였다. Biotiny lectin과 반응시킨 slide들은 0.01M PBS로 세척한후 실온에서 avidin-biotiny peroxidase complex(ABC, Vector Lab.)로 30분간 배양하였으며, 3,3'-diaminobenzidine(DAB, 0.2mg/ml)-H₂O₂로 10분간 처리후 증류수로 세척, 탈수하였다⁹. 관찰은 박과이⁹가 보고한 진도건의 12기(stages)와 14단계(steps)를 기준으로 Golgi, cap, acrosome과 maturation phase 정자세포로 구분하여 관찰하였다.

전자현미경용 시료제작 및 Lectin 면역조직화학 : 좌측고환은 적출후 고환동맥을 통해 4% glutaraldehyde(0.05M PB, pH 7.2, 4℃)로 관류고정시킨 후 1mm³로 세절, 같은 용액으로 2시간동안 재고정하였다. 고정된 조직은 -20℃에서 50, 80, 90% N,N-dimethylformamide(DMF)로 탈수하였으며 glycol methacrylate(GMA)로 채워진 gelatin capsule에 넣은후 파장이 360nm인 자외선으로 조사(-20℃)하여 중합시켰다^{10,11}. GMA에 포매된 조직은 60-80nm로 박절한 후 nickel grid에 부착시키고 1% BSA-PBS로 배양하였으며 15nm colloidal gold conjugate SBA, DBA lectin(Vector lab.) 20 μ l 속에 nickel grid를 넣고 4℃에서 12시간 배양하였다. Lectin과 반응시킨 grid는 세척후 uranyl acetate와 lead citrate로 전자염색하고 carbon coating한 후 투과전자현미경(JEM-100S)으로 관찰하였다.

결 과

광학현미경의 관찰 : 진도건의 정세포내 탄수화물 잔기

Table 1. The optimum concentrations of lectins, and their carbohydrate specificity, and inhibitory sugars

Lectin	Optimum Concentration	Carbohydrate Specificity	Inhibitory Sugar
WGA	0.0022mg/ml [1:500]	α/β -D-GlcNac, NeuNAc	GlcNac
DBA	0.01mg/ml [1:100]	α /D-GlcNac	GalNAc
SBA	0.005mg/ml [1:200]	α/β -D-GlcNac, α -Gal	GlcNac
PNA	0.002mg/ml [1:500]	β -D-Gal-GalNAc, D-Gal	Gal
Gs-I	0.002mg/ml [1:500]	α -Gal, α -GalNAc	GalNAc, Gal
UEA-I	0.004mg/ml [1:250]	α -L-Fuc	Fuc

Abbreviations used are GlcNac, N-acetylglucosamine; GalNAc, N-acetylgalactosamine; NeuNAc, N-acetylneuraminic acid(sialic acid); Gal, galactose; Fuc, Fucose.

Table 2. Lectin staining of Sertoli cell, spermatid and residual body in Jindo dog

	WGA	DBA	SBA	PNA	GS-I	UEA-I
Sertoli cell	+++	+++	-	-	-	-
Spermatid						
Golgi phases	-	+	+++	+++	-	-
Cap phases	-	+	+++	+++	-	-
Acrosome phases	-	+	++	++	+++	-
Maturation phases	-	+	++	++	+++	-
Residual body	++	+	++	++	+++	-

Intensity of staining : - negative, + weak, ++ moderate, +++ strong.

Abbreviations used are WGA, Wheat germ agglutinin; DBA, Dolichos biflorus agglutinin;

SBA, Soybean agglutinin; PNA, Peanut agglutinin; GS-I, Griffonia simplicifolia agglutinin; UEA-I, Ulex europeus agglutinin I.

를 관찰하기 위해 사용한 WGA, DBA, SBA, PNA, GS-I 과 UEA-I 등 6가지 lectin의 적정 희석농도와 당질특이성을 Table 1에 표시하였으며 염색결과는 Table 2에 요약하였다.

정세관내 정자세포는 Golgi, cap, acrosome과 maturation phase로 나누어 관찰하였다. WGA는 Sertoli 세포에서 3⁺ 정도의 양성반응을 나타냈으며 Golgi, cap phase 정자세포에서는 음성반응을 보였다. 그러나 acrosome과 maturation phase 정자세포의 잔류체에서는 2⁺ 정도의 양성반응을 보였다(Figs 1, 2).

DBA는 Sertoli 세포에 3⁺ 양성반응을 보였으며 나머지 세포들도 1⁺ 정도의 양성반응이 정세관 전체에서 나타났으나 정자세포의 첨단체 부위에서는 음성반응이었다(Figs 3, 4).

SBA는 Sertoli 세포에서 음성반응이었으나 Golgi, cap phase 정자세포의 첨단체소포막에서 3⁺의 양성반응을 나타냈고, acrosome과 maturation phase 정자세포 및 잔류체에서 2⁺ 양성반응을 나타냈다(Figs 5, 6).

PNA는 Golgi와 cap phase 정자세포의 첨단체소포에 3⁺의 양성반응을 보였으며 acrosome과 maturation phase 및 잔류체 부위에서 2⁺ 정도의 양성반응이 관찰되어 SBA 결과와 비슷하였으나 maturation phase 정자세포의 꼬리부분에도 2⁺ 양성반응을 보였다(Figs 7, 8).

GS-I은 Sertoli 세포, Golgi, cap phase 정자세포에서 음성반응을 보였으나 acrosome과 maturation phase 정자세포와 잔류체에서 3⁺ 양성반응과 정자세포 꼬리부위에서 2⁺의 양성반응을 나타냈다(Figs 9, 10).

UEA-I은 정세관 전체에서 음성반응을 나타냈다.

전자현미경의 관찰 : DBA는 Sertoli 세포의 기저부를 중심으로 하여 내강측에 존재하는 Sertoli 세포 돌기까지 전반적으로 분포하여 광학현미경 관찰결과와 일치하였다. 정자세포의 첨단체 부위에서는 금(gold) 표식입자가 관찰되지 않았다(Figs 11, 12).

SBA는 Golgi, cap, acrosome phase 정자세포의 첨단체소포 부위의 peripheral low-dense area에 금표식입자가 밀

집되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 13).

고 찰

본 실험은 lectin 면역조직화학적 방법을 이용하여 지금까지 보고된 바 없는 성숙한 진돗개의 정세관내 탄수화물 잔기의 분포를 규명하여 정자형성계의 탄수화물 대사기전을 밝히는 기초자료를 얻고자 시도하였다.

본 실험에서 정자세포의 Golgi와 cap phase의 첨단체 부위는 SBA, PNA에 3° 정도의 강한 반응과 DBA에 1° 정도의 미약한 반응은 N-acetyl-D galactosamine과 D-galactose 잔기의 분포를 나타내어 gerbil³, Nutria와 guinea pig^{3,13}, 황소¹², 생쥐^{3,4} 등에서 반응성 결과와 일치하였다. 그러나 일본 산양⁸에서는 SBA와 PNA의 반응성은 일치하였으나, DBA의 반응성은 보고되지 않은 반면, GS-II에 반응성이 보고되었다. 또한 쥐⁶에서는 PNA와 WGA에, gerbil, Nutria, 생쥐 및 guinea pig³, 황소⁷에서 WGA에 2° 또는 3°의 반응성을 보였으나, 본 실험에서 WGA는 Sertoli 세포와 정자세포의 잔류체에서만 반응성이 관찰되어 다른 연구자들의 결과와 차이를 보이고 있었다.

개의 정자세포 acrosome과 maturation phase에서 SBA와 PNA는 2°, GS-I은 3°의 반응성이 관찰되어 N-acetyl-D galactosamine과 galactose 잔기의 분포를 나타내고 있었다. 이는 일본 산양⁸의 반응결과와 유사하였으며, 쥐⁶에서 PNA는 3°, gerbil, Mouse³, 사람¹, 황소⁷등의 acrosomal phase에서 PNA와 SBA 반응성의 강도는 약간의 차이는 있으나 결과는 일치하였다. Maturation phase에서는 일본 산양⁸, 생쥐³, 사람¹의 결과와 일치하였으며, 황소⁷에서는 미약한 SBA와 PNA 반응성이 관찰되었다. 하지만 동물종에 따라서 WGA, UEA-I, DBA 등의 반응성이 보고^{3,6,7}되어 동물종에 따른 특이성으로 추측된다.

본 실험에서 사용한 6가지 lectin중에서 정자세포의 잔류체에서는 3°의 GS-I과 2°의 SBA, PNA 및 WGA 반응성이 검출되어 galactose, N-acetyl-D galactosamine, galactose 및 N-acetyl-D-glucosamine 잔기가 분포하며, Sertoli 세포는 3°의 WGA와 DBA의 반응성이 관찰되어 N-acetyl-D-glucosamine과 N-acetyl-D-galactosamine의 잔기가 분포하였다. 하지만 이 부위들은 다른 연구자들의 연구 결과에는 언급된 바 없어 더욱 자세한 연구가 수행되어야 할 것이다.

본 실험에서 시도된 lectin 면역세포화학 방법은 15nm

colloidal gold가 부착된 DBA와 SBA의 두 종류를 시도하였다. DBA는 광학현미경의 관찰결과와 같이 Sertoli 세포의 기저부와 acrosome 및 maturation phase 정자세포의 두 부가 묻혀있는 Sertoli 세포질에는 15nm의 금표식입자가 부착되었으나 정자세포의 첨단체 부위는 부착되지 않았다. 따라서 DBA는 Sertoli 세포에만 반응성이 인정되었다. SBA의 15nm 금표식입자는 Golgi 및 cap phase 정자세포 첨단체세포의 peripheral low-dense area에 집중적으로 부착되었다. 그러나 일본 산양에서 SBA 금표식입자는 Golgi 및 cap phase 정자세포의 첨단체과립에 집중적으로 부착되어 있고, acrosome 및 maturation phase에서도 첨단체 부위에 집중되어⁸ 본 실험결과와는 상이성을 보였다. 이러한 SBA의 반응성은 쥐⁶, 황소⁷, guinea pig, gerbil, 생쥐, nutria와 사람¹의 첨단체부위에서 반응성이 인정되었으나, 생쥐⁴는 반응성이 나타나지 않았다. 이는 동물종이나 연구자에 의해 약간의 차이점이 있는 것으로 추측된다.

이상과 같이 진돗개를 대상으로한 본 실험의 lectins 분포결과는 타동물을 대상으로한 보고들과 일부분에서 유사성이 인정되었으나, Sertoli 세포와 각종 정세포에서 lectins 물질들의 반응부위와 반응성 감도 등은 차이점이 인정되어 동물의 종 특이성으로 추측된다. 하지만 정자형성 과정에서 탄수화물 잔기의 분포에 대한 변화는 생화학적 방법을 도입한 전자현미경 수준의 심도있는 연구가 수행되어, 정자형성계의 탄수화물 대사기전이 규명되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

성 성숙한 진돗개 고환에서 정세관내 탄수화물 대사기전을 밝히는 기초자료를 얻기 위하여 lectin-binding pattern을 광학 및 전자현미경으로 관찰하였다. WGA와 DBA는 Sertoli 세포에서 강한 양성반응이 관찰되었으며 잔류체에서도 양성반응을 보였다.

SBA와 PNA는 golgi- 및 cap-phase 정자세포 첨단체세포에서 강한 양성반응을 나타냈으며 acrosome- 및 maturation-phase 정자세포와 잔류체에서 중등도의 양성반응이 관찰되었다. GS-I은 acrosome- maturation-phase 정자세포와 잔류체에서 강한 반응성이 나타났으나, UEA-I은 모든 정세관에서 음성반응이었다.

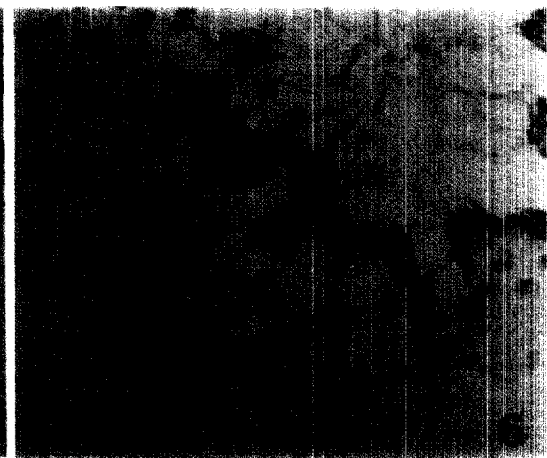
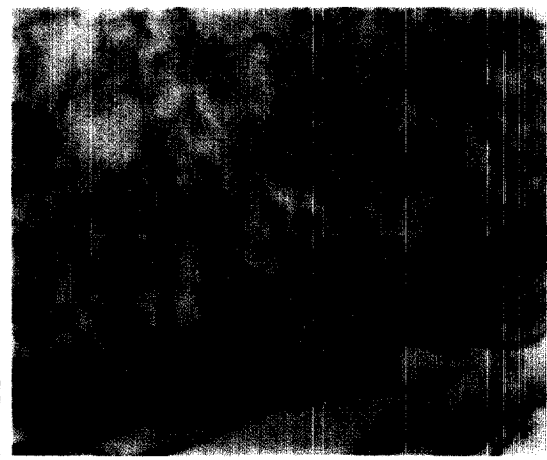
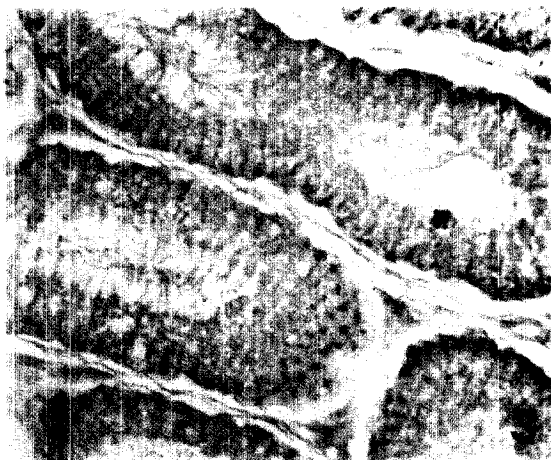
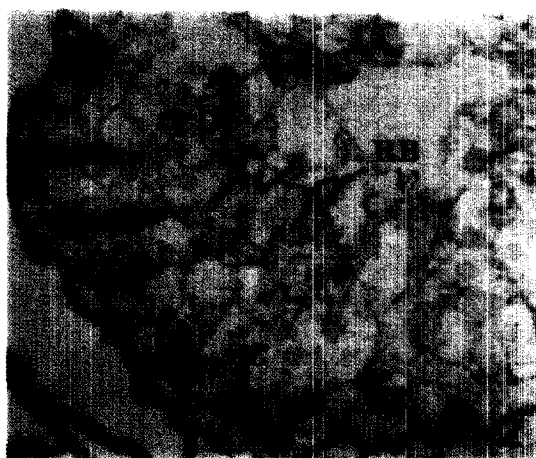
전자현미경 관찰에서 DBA는 Sertoli세포원주와 Sertoli 세포 돌기들에서 양성반응이었으며, SBA는 Golgi-, cap-

및 acrosome-phase 정자세포의 peripheral low-dense area
에서 양성반응이 관찰되었다.

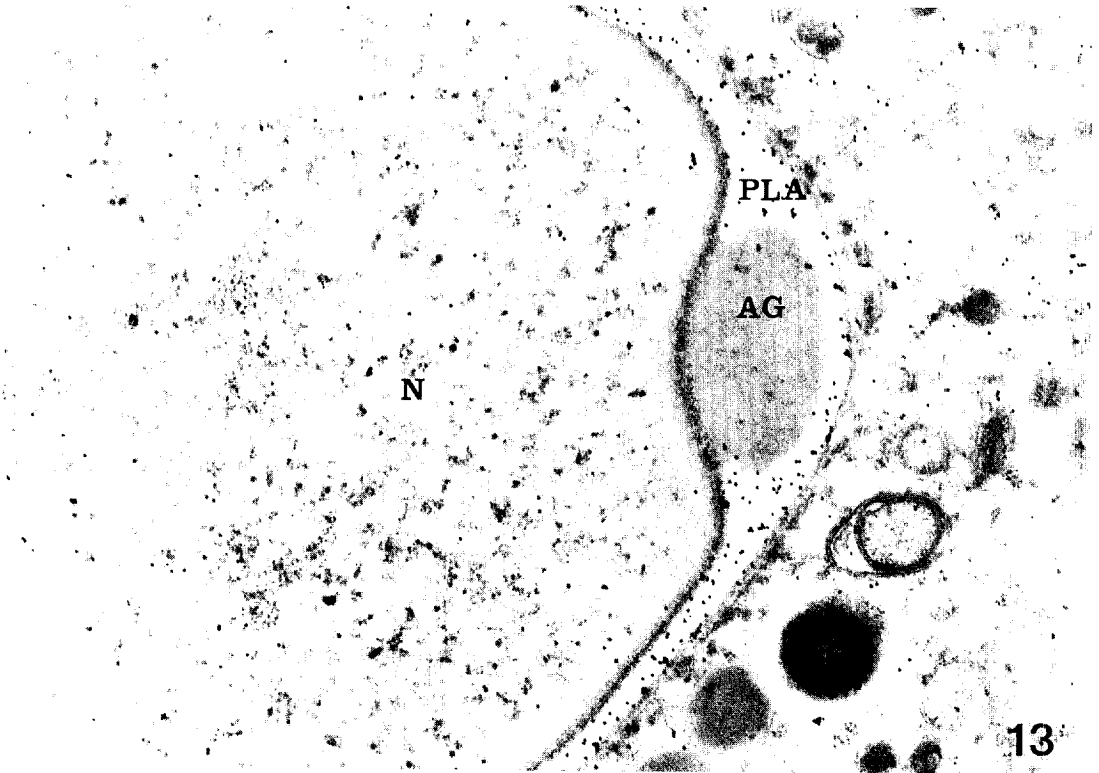
개 고환에서 lectin-binding pattern의 이러한 결과는 타
동물들의 pattern과 상이성이 인정되었다.

Legends for figures

- Fig 1-1a. Lectin-binding sites in the dog seminiferous tubules at light microscopic level.
Fig 1. WGA is positive in Sertoli cells(SC) and residual body(RB). X 100.
- Fig 2. Closer view of a part of figure 1. X 400.
- Fig 3. DBA is positive in Sertoli cells and seminiferous tubules except acrosomal region and residual body of spermatids. X 100.
- Fig 4. Closer view of a part of figure 3. SC: Sertoli cell. X 400.
- Fig 5. SBA is positive in acrosomal region(A) and residual body(R) of spermatids. X 100.
- Fig 6. Closer view of a part of figure 5. X 400.
- Fig 7. PNA is positive in the acrosomal region(A), tail(T), residual body(R) of spermatids. X 100.
- Fig 8. Closer view of a part of figure 7. X 400.
- Fig 9. GS-I is positive in the acrosomal region(A), tail(T) and residual body(R) of the acrosom-phase and maturation-phase spermatids. X 100.
- Fig 10. Closer view of a part of figure 9. X400.
- Fig 11. Electron micrograph shows DBA gold particles in the Sertoli cell column(SC).
AC:acrosome of the elongated spermatid. X 25,000.
- Fig 12. Electron micrograph shows DBA gold particles in the base region of the Sertoli cell.
X 35,000.
- Fig 13. Electron micrograph shows SBA gold particles in the acrosome-phase spermatid. Gold particles are distributed in the peripheral low-dense area(PLA), but not in the acrosomal granule(AG).
N: nucleus of spermatid. X 25,000.







참 고 문 헌

1. Lee MC, Damjanov I. Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat Rec*, 212 : 282-287, 1985.
2. Malmi R, Soderstrom KO. Lectin binding sites in human seminiferous epithelium, in CIS cells and in seminomas. *Inter J Androl*, 10 : 157-162, 1987.
3. Arya M, Vanha-Perttula T. Comparison of lectin-staining pattern in testis and epididymis of gerbil, guinea pig, mouse, and nutria. *Amer J Anat*, 175 : 449-469, 1986.
4. Burkett BN, Schulte BA, Spicer SS. Histochemical evaluation of glycoconjugates in the male reproductive tract with lectin-horseradish peroxidase conjugates: I. Staining of principal cell and spermatozoa in the mouse. *Amer J Anat*, 178 : 11-22, 1987.
5. Fazel AR, Schulte BA, Spicer SS. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cells differs with genera. *Anat Rec*, 228 : 177-184, 1990.
6. Martinez-Memarguez JA, Ballesta J, Aviles M, et al. Cytochemical characterization of glycoproteins in the developing acrosome of rats: An ultrastructural study using lectin histochemistry, enzymes and chemical deglycosylation. *Histochemistry*, 97 : 439-449, 1992.
7. Ertl C, Wrogl KH. Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Histochemistry*, 97 : 161-171, 1992.
8. Kurohmaru M, Kanai Y, Hayashi Y. Lectin-binding patterns in the spermatogenic cells of the shiba goat testis. *J Vet Med Sci*, 53 : 893-897, 1991.
9. 박영석, 이재홍: 진도견의 정자형성과 Sertoli 세포 특수 연결부의 미세구조. I. 진도견의 정자형성에 관한 연구. *대한 수의학회지*, 32 : 281-294, 1992.
10. Hoshino M, Kobayashi H. The use of glycol methacrylate as an embedding medium for the histochemical demonstration of acid phosphatase activity. *J Histochem Cytochem*, 19 : 575-576, 1971.
11. Uchida T. Serotonin-like immunoreactivity in the taste bud of the mouse circumvallate papilla. *Jpn J Oral Biol*, 27 : 132-139, 1985.
12. Arya M, Vanha-perttula T. Lectin-binding pattern of bull testis. *J Androl*, 6 : 230-242, 1985.
13. Yamamoto N. Electron microscopic analysis of sugar residues of glycoproteins in the acrosomes of spermatids using various lectins. *Acta Histochem Cytochem*, 15 : 139-150, 1982.