

## 번식기와 비번식기의 한국산 꿩 고환간질조직의 형태계측학적 연구

김 인 식\*

전북대학교 수의과대학 해부학교실  
(게재승인 : 2002년 8월 29일)

### Morphometric Studies on the Testis Interstitium of Korean Ring-Necked Pheasants (*Phasianus colchicus karpowi*) during the Breeding and Nonbreeding Seasons

In-Shik Kim\*

Department of Anatomy, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Accepted : August 29, 2002)

**Abstracts :** The purpose of this morphometric study was to obtain detailed quantitative information on all cell types in the testis interstitium of Korean ring-necked pheasants combined with data on changes in the steroidogenic function of the testis during the breeding and nonbreeding seasons. Animals collected during the breeding season, testis weights, sperm production, serum testosterone levels, leuteinizing hormone-stimulated testosterone secretion, and the length of the seminiferous tubules were significantly ( $p < 0.05$ ) increased as compared to the nonbreeding season. Seminiferous tubules occupied 93.25% of testis volume in the breeding season. Leydig cells constituted 0.82% of the testicular volume. The mean volume of an Leydig cell was  $1039 \mu\text{m}^3$ , and each testis contained about 24.53 million Leydig cells. Testes of the pheasants during the nonbreeding season displayed a 98% reduction in testis volume that was associated with a decrease in the absolute volume of seminiferous tubules (98% reduction), tubular lumen(100%), interstitium(90%), blood vessels(84%), lymphatic spaces(97%), Leydig cells(79%), mesenchymal cells(51%), and myoid cells(61%). The number of Leydig cells, mesenchymal cells, myoid cells per testis in the breeding season was higher ( $p < 0.05$ ) than in the nonbreeding season. Although the average volume of a Leydig cell was 74% lower in the nonbreeding season, the average volume of a myoid and mesenchymal cell remained unchanged. These results demonstrate that there are a striking differences in the testicular structure of the Korean ring-necked pheasant in the breeding and nonbreeding seasons. Every structural parameter of the Leydig cell was positively correlated with both serum and LH-stimulated secretion concentrations of testosterone. Correlation of changes in hormonal status with morphometric alterations of all Leydig cell suggests that the Korean-ring necked pheasant may be used as a model to study structure-function relations in the avian testis.

**Key words :** Korean ring-necked pheasant, testis interstitium, morphometry

#### 서 론

고환(testis)은 다양한 종류의 정자발생세포(spermato-

genic cells)를 지닌 수컷생식기관으로서 정자발생(spermatogenesis)이 이루어지는 곱슬정세관(semiferous tubule)과 내분비기능을 담당하는 간질세포를 포함한 간질조직

이 논문은 2001년도 전북대학교의 지원 연구비에 의하여 연구되었음.

\* Corresponding author: In-Shik Kim, Phone : 063-270-2556, E-mail : iskim@chonbuk.ac.kr

(interstitium)으로 구분되어 있다. 또한 간질조직은 내분비세포인 간질세포(Leydig cell), 간질세포의 전구세포로 알려져 있는 중간엽세포(mesenchymal cell), 근육성세포(myoid cell), 간질조직내 죽은 세포를 탐식하는 큰포식세포(macrophage), 혈관주위세포(pericyte), 림프공간(lymphatic space), 혈관 및 혈관내피세포(endothelial cell)로 이루어져 있다<sup>1-4</sup>.

테스토스테론은 고환의 간질세포에서 주로 생성되어 정자발생의 조절, 부속생식기관(accessory sex organs)의 유지 및 발기 기능 등을 포함한 수컷생식계통에서 중요한 역할을 담당하고 있으며<sup>5</sup>, 황체형성호르몬(luteinizing hormone)이 간질세포의 구조와 기능을 조절하여 일반적으로 간질세포의 크기는 황체형성호르몬에 의존적이다<sup>6</sup>.

계절번식 동물은 일련에 따른 번식주기와 번식에 영향을 미치는 호르몬이 주기적인 변동을 나타내어 고환의 구조적인 변화와 더불어서 정자발생 세포들의 양상이 많은 변화를 보인다<sup>7-11</sup>. 이러한 주기적인 변동을 일으키는 요인은 여러 가지가 있으나 부분적으로는 간질세포의 안드로젠 생합성(androgen biosynthesis)률의 변화에 기인하며 2가지 요소 즉, 황체형성호르몬의 자극 정도와 간질세포의 황체형성호르몬에 대한 반응력이 계절번식 주기동안 간질세포의 안드로젠 생합성률을 변화시키는 데에 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>12,13</sup>.

계절번식 조류인 꿩<sup>14</sup>, 청둥오리<sup>15</sup>, 타조<sup>16</sup>, 거위<sup>17</sup>, 자고새<sup>18</sup>, 일본 꿩<sup>19</sup> 등에서 번식주기에 따른 혈청내 테스토스테론과 황체형성호르몬이 계절적인 변화를 나타내며, 이는 정자발생의 변화와 밀접한 연관성이 있음을 보고하였다. 그러나 저자들의 보고<sup>20</sup>를 포함하여 이러한 연구는 계절번식 조류에서 간질세포 분화의 특징을 이해하는데 중요한 고환간질조직을 이루고 있는 세포 유형별 절대부피(absolute volume), 각 세포의 평균부피(average cell volume) 및 숫자에 대한 번식주기에 따른 중요한 정보를 접할 수 없으며, 번식주기에 따른 고환간질조직 세포유형의 양적인 정보와 안드로젠 형성능 등의 변화를 결부시킨 보고는 없는 실정이고 지금까지도 조류간질세포의 운명과 중요성이 명확하게 밝혀져 있지 않다. 그러므로 한국산 꿩을 실험동물로 하여 번식기와 비번식기에 혈청내 테스토스테론 농도, 고환의 황체형성호르몬 자극에 대한 시험관내 테스토스테론분비(LH-stimulated testosterone secretion), 정자생성(sperm production) 및 고환 간질조직의 형태계측학적인 변화를 관찰하여 한국산 꿩 번식에 관한 기초자료를 얻고 조류간질조직의 구성 특징 및 간질세포 구조와 기능의 상호연관성을 명확히 밝히고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

전주근교 조류 사육장에서 번식기인 5월과 비번식기인 12월에 각각 건강하고 성숙한 꿩 32수(평균체중: 1150g)를 구입하여 실험에 사용하였다.

### 2. 조직표본제작 및 혈청분리

혈청 테스토스테론 농도를 측정하기 위하여 상완정맥(brachial vein)에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 분석할 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 고환조직을 관류고정하기 위하여 실험동물을 Ketamine(3 ml/kg)으로 마취한 후 체중을 측정하고 관류고정(perfusion fixation)도중 혈액이 응고하는 것을 방지하기 위하여 Heparin(Sigma, 100,000 Unit) 150IU/Kg를 복강 내에 주입하고 10분 후에 복강을 절개하고 고정 전 고환의 용적을 측정하기 위하여 오른쪽 고환을 적출하여 무게를 측정한 다음 대동맥을 절개하여 cutdown tube를 삽입하고 0.75% 생리식염수를 사용하여 전신의 혈관을 1-2분 동안 세척하였다. 이후 2.5% glutaraldehyde로 대체하여 약 40분 동안 관류고정 하였다. 고환의 고정 후 용적을 측정하기 위하여 고환을 적출한 후 chemical balance를 이용하여 무게를 측정하고 sucrose를 사용하여 부양법(floatation method)으로 비중(specific gravity)을 측정하여 고정 후의 고환용적을 산출하였다(고환용적 = 고환무게/고환비중)<sup>4,21-23</sup>. 조직표본 제작을 위하여 고환을 2-3 mm로 세절하여 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 12시간동안 고정한 후 1% osmium tetroxide로 2시간동안 후고정한 후 alcohol로 탈수하고 Epon-812로 포매하여 각 개체 당 블록 15개씩을 제작하였다.

### 3. 광학현미경관찰

초박절편기(ultramicrotome, Leica ultracut-s, Austria)를 이용하여 1  $\mu\text{m}$ 로 절편을 제작하여 1% Methylene Blue-Azure II로 염색, canada balsam으로 봉입하여 고환간질조직을 구성하고 있는 간질세포, 중간엽세포, 림프공간, 혈관, 혈관주위세포, 혈관내피세포 및 근모양세포를 광학현미경(Leica, DMRBE, Germany)에서 관찰하고 사진 촬영하였다.

### 4. 형태계측(Morphometry)

(1) 고환 간질조직 구성물의 용적치밀도(volume density; volume per unit volume):

Point Counting법<sup>21-25</sup>을 적용, 121 point ocular grid를 장착한 광학현미경을 이용하여 point와 만나는 각 구조

물(간질세포, 혈관, 중간엽세포, 근모양세포, 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 림프공간)의 수를 네 모서리와 가운데, 즉 5부위를 세었으며 각 개체 당 최소 50부위에서 최대 100부위를 중복되지 않게 측정하였다. 이것을 전체 point(121 × 5)로 나누어 각 고환간질조직 구조물의 용적치밀도(Vv%)를 구하였다.

$$Vv\% \text{ of a component} = \frac{\text{number of points on the component} \times 100}{\text{total number of points on the testis tissue}}$$

(2) 고환 간질조직 구성물의 절대용적(absolute volume): 이미 구해진 용적치밀도와 고환용적(fresh testis volume)을 이용해서 절대용적을 다음과 같은 공식에 의해서 구하였다.

$$\text{Absolute volume of testicular component} = \text{volume density of the component} \times \text{fresh testis volume}$$

여기서 고환의 용적은 고환의 무게와 비중으로부터 구하였다<sup>21-25</sup>.

(3) 고환단위용적 당 세포의 수(numerical density; Nv): Floderus<sup>26</sup> 방정식( $Nv = Na / (T + D - 2h) \times (1 - Sr)$ )을 적용하여 numerical density를 계산하였다. 이 공식에서 Na는 단위면적 당 각 세포핵의 숫자(단위면적 =  $48520.8 \mu m^2$ ), D는 평균 핵 직경, T는 평균 절편 두께, Sr(total shrinkage = histologic correction factor)는 총 고환조직의 고정전, 고정후, 표본제작후의 총 수축량, h는 가장 작다고 생각되는 핵의 높이이며 이는 보통 평균 핵 직경의 10%정도이다<sup>21-25</sup>. 단위 면적당 각 세포핵의 숫자와 핵의 크기는 조직 표본에서 5군데를 중복되지 않도록 선택하여 영상분석기(image analyzer system, Leica Q500MC, Germany)를 이용하여 측정하였다. 고환 당 각 세포의 총 숫자(total number)는 단위 용적 당 세포의 수에 각 고환의 용적을 곱하여 구하였다(total number = numerical density × fresh testis volume).

(4) 간질조직내 각 세포의 평균 용적(average volume): 간질세포를 포함한 각 세포의 평균용적은 용적치밀도를 단위용적 당 세포의 수로 나누어 구하였다<sup>21-25</sup>.

$$\text{Average cell volume} = \text{volume density} / \text{numerical density of each cell type}$$

**5. 황체형성호르몬 자극에 의한 고환내 테스토스테론 분비(LH - stimulated testosterone secretion)**  
 신속하게 왼쪽 고환을 적출 하여 피막(capsule, tunica

albuginea)을 제거한 후 무게를 측정하고 황체형성호르몬(oLH-26, NIH, Bethesda, MD, U.S.A) 100 ng/ml을 첨가한 medium (Kreb's buffered solution, pH 7.2)에 넣었다. 20 ml scintillation vials에 담아 34°C oscillating water bath(90 oscillations/minute)에서 3시간 동안 배양하고 원심분리 한 후 상층액을 채취하여 -70°C에 보관하였고 혈청과 배양액내의 테스토스테론 농도는 김과 양<sup>20</sup>의 방법에 따라서 측정하였다.

**6. 곱슬정세관의 길이 측정**

곱슬정세관의 길이는 실린더(cylinder)의 부피 즉,  $V = \pi r^2 l$  (r = 곱슬정세관의 반지름, l = 곱슬정세관의 길이)의 공식을 적용하여 측정하였고 곱슬정세관의 반지름은 원형의 정세관을 택하여 Image analyzer(Leica, Germany)을 이용하여 측정하였다<sup>24</sup>.

**7. 정자생성(sperm production)**

Kirby et al<sup>27</sup>의 방법을 적용하여 오른쪽 고환을 적출하고 무게를 측정한 후 백막(tunica albuginea)을 제거하고 0.05% (vol/vol) Triton X-10과 0.25% M thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)이 혼합된 50 ml 생리식염수에서 semimicro Waring Blender를 이용하여 2분간 균질화시켰다. 정자생성은 이 용액 0.2 ml를 4% trypan blue가 혼합된 0.8 ml 생리식염수에 희석하여 측정하였다. 정소조직당 평균정자 생성을 측정하기 위하여 이 용액 10 μl를 혈구계(hemocytometer)로 광학현미경하에서 평균 5회 측정하였다. 이러한 방법으로 얻어진 수치는 정소조직당 총 종자수를 얻기 위하여 적용하였다.

**8. 통계처리**

본 실험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적 유의성은 SAS package의 General Linear Model(GLM) Procedure(SAS Ver. 6.12, SAS Institute, 1996)를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였으며 P<0.05 이하의 유의성만을 통계학적 차이로 인정하였다.

**결 과**

**1. 고환의 일반형태**

번식기인 5월에 수집한 고환은 곱슬정세관내에서 많은 수의 정자가 관찰되었고 간질조직내의 간질세포는 이웃하여 위치하고 있으며 핵은 원형 또는 난원형의 핵을 갖고 있었고 세포질 안에 작은 많은 수의 지방방울(lipid droplets)이 관찰되었다(Fig. 1, 2).

비번식기인 12월에 수집한 고환은 곱슬정세관내에서 정자를 관찰할 수 없었고 번식기와는 달리 곱슬정세관의 직경은 큰 폭으로 감소한 반면 간질조직이 차지하고 있는 비율은 증가되어 있었다. 간질조직내의 간질세포의 핵은 불규칙적이었고 세포질내에 큰 지방방울이 다수 관찰되었다(Fig. 3, 4).

**2. 체중, 고환의 고정전과 고정후의 무게 및 비중**

한국산 평 번식기와 비번식기의 체중 및 고환의 기초 자료는 Table 1에 요약되어 있다. 번식기에 관류 고정전(fresh testis weight)의 평균고환 무게는 3.2g이었고 평균 부피는 3.1Cm<sup>3</sup>이었으며, 비중은 1.04이었다. 비번식기에는 번식기에 비하여 체중의 변화는 없었으나 고환의 무게와 부피는 98% 감소하였다.

**3. 고환의 부피밀도와 절대부피**

번식기 평 고환의 절대부피는 곱슬정세관(semiferous tubule)이 93.25%를 차지하고 있고 이중 11.98%는 관강으로 이루어져 있었다. 또한 간질조직은 6.75%를 차지하고 있었으며 혈관(0.36%), 림프공간(4.78%), 혈관내피세포(0.15%), 중간엽세포(0.32%), 근모양세포(0.31%), 간질세포(0.82%) 및 혈관주위세포(0.003%)로 구성되어 있었다. 비번식기에는 번식기와 비교하여 볼 때 곱슬정세관의 관강이 전혀 관찰되지 않았고 곱슬정세관과 림프공간은 통계적 유의성이 없었으며 혈관내피세포(89%)와 혈관주위세포(66%)는 감소하였다. 그러나 그 이외의 구조물 즉, 혈관(88%), 중간엽세포(96%), 근모양세포(95%), 간질세포(91%)와 혈관주위세포는 명확하게 증가하였다(Table 2).

고정전 고환의 부피와 고환의 부피밀도를 곱하여 얻어진 절대부피를 비교하여 보면 비번식기는 번식기에 비하여 곱슬정세관은 98.4% 감소, 곱슬정세관의 관강

(100%), 간질조직(90%), 림프공간(97%), 혈관(84%) 혈관내피세포(99%), 중간엽세포(51%), 근모양세포(61%), 간질세포(79%) 및 혈관주위세포(90%)가 각각 감소하였다(Table 3).

**4. 간질조직을 구성하고 있는 각 세포유형의 고환내 총 숫자**

번식기의 고환간질조직을 이루고 있는 세포 중에서 중간엽세포는 23.22 × 10<sup>6</sup>, 근모양세포(14.93 × 10<sup>6</sup>), 혈관내피세포(7.52 × 10<sup>6</sup>), 혈관주위세포(14.93 × 10<sup>6</sup>) 및 간질세포는 36.67 × 10<sup>6</sup>의 숫자를 갖고 있었다. 이에 반하여 비번식기에는 중간엽세포(66%), 근모양세포(60%), 혈관내피세포(88%), 혈관주위세포(86%) 및 간질세포(74%)의 고환내 총 숫자가 감소하였다(Table 4).

**5. 간질조직을 구성하고 있는 각 세포의 평균부피**

중간엽세포와 근모양세포는 번식주기에 따라서 크기의 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 간질세포는 번식기에는 1039 μm<sup>3</sup>이었으나 비번식기에는 767 μm<sup>3</sup>으로 27%가 감소되어 있었다(Table 5).

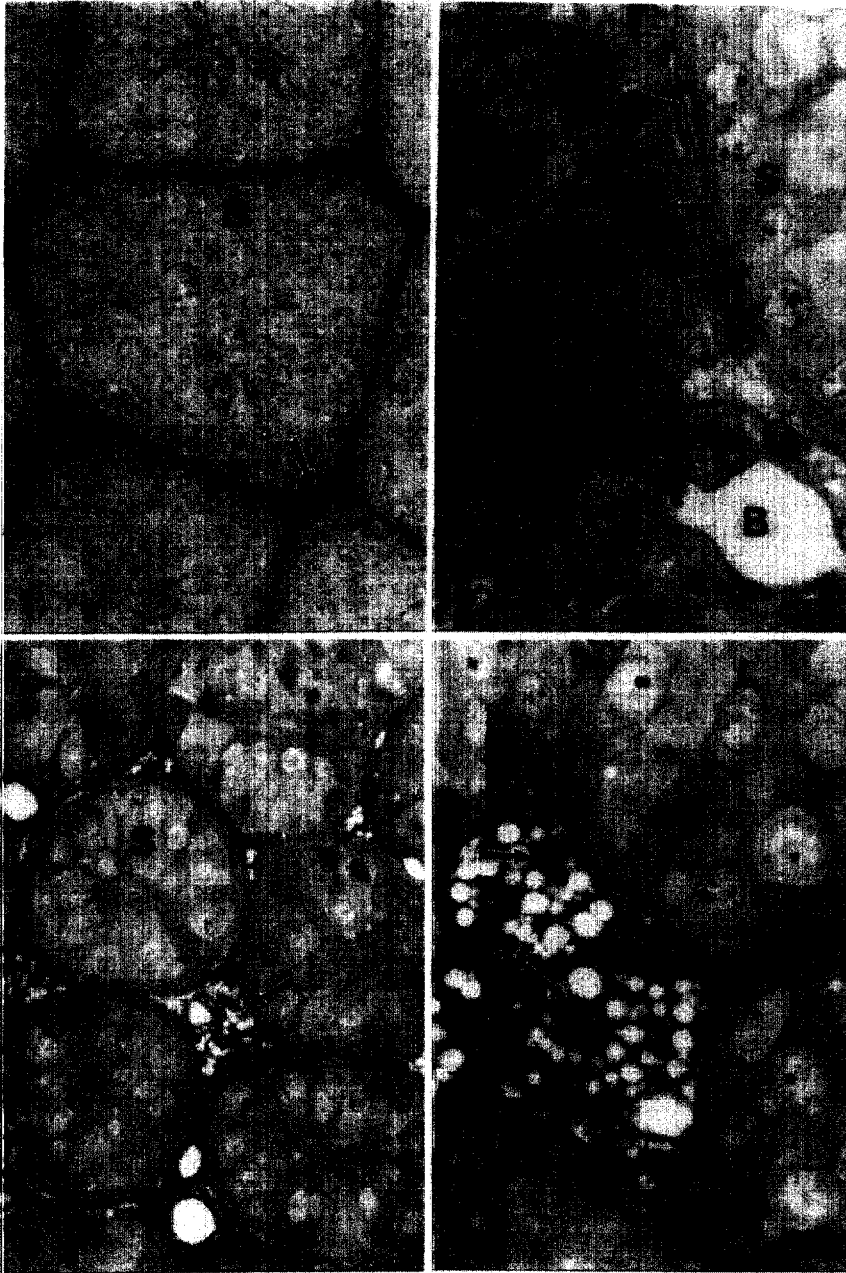
**6. 혈청내 및 황체형성호르몬 자극에 대한 고환내 테스토스테론 농도, 정자생성과 곱슬정세관의 길이**

번식기의 혈청 테스토스테론 농도와 황체형성호르몬 자극에 대한 고환 테스토스테론의 농도는 각각 295.5 ng/dl, 2713 ng/testis/3hours이었다. 이에 대한 비번식기의 농도는 각각 88%, 93%가 감소되었다. 정자생성은 번식기에 1665.45 × 10<sup>6</sup>이었으나 비번식기에는 정자생성이 전혀 이루어지지 않았고 번식기 곱슬정세관의 길이는 80.83m 이었으며 이에 대한 비번식기의 길이는 87% 감소되어 관찰되었다(Table 6).

**Table 1.** Basic data during the breeding and nonbreeding seasons in the pheasant

Parameters	Breeding season (n=8)	Nonbreeding season (n=8)
Body weight (g)	1500 ± 235	1605 ± 197
Fresh (right) testis weight (g)	3.2303 ± 0.120 <sup>a</sup>	0.0612 ± 0.003 <sup>b</sup>
Fresh (right) testis volume (cm <sup>3</sup> )	3.109 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.059 ± 0.002 <sup>b</sup>
Specific gravity of fresh testis	1.039 ± 0.03	1.037 ± 0.009
Fixed (left) testis weight (g)	3.103 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.0576 ± 0.002 <sup>b</sup>
Fixed (left) testis volume (cm <sup>3</sup> )	2.983 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.059 ± 0.001 <sup>b</sup>
Specific gravity of fixed testis	1.044 ± 0.005	1.044 ± 0.007

Values are the mean ± SEM. In each row, values with different superscripts (a, b) are significantly different (p<0.05).



**Fig. 1.** Light micrograph of a pheasant testis collected in May, showing normal spermatogenesis including spermatozoa within seminiferous tubules (S) and narrow interstitium (arrow).  $\times 200$ .

**Fig. 2.** Light micrograph of a pheasant testis collected in May. Most of Leydig cells contain small lipid droplets. S : seminiferous, Long arrow : Leydig cell, Short arrow : Myoid cell, B : Blood vessel, Arrow head : Mesenchymal cell.  $\times 1,000$ .

**Fig. 3.** Light micrograph of a pheasant testis collected in December, showing absence of spermatogenesis within seminiferous tubules (S). Note that the interstitium (arrow) is relatively large compared to that in Fig. 1.  $\times 400$ .

**Fig. 4.** Light micrograph of a pheasant testis collected in December. Note that the Leydig cells contain very large lipid droplets. S : seminiferous, Long arrow : Leydig cell, Short arrow : Myoid cell, Arrow head : Mesenchymal cell.  $\times 1,000$

**Table 2.** Volume density (Vv%) of testicular components of the pheasant during the breeding and nonbreeding seasons

Testicular component	Breeding season (n=8)	Nonbreeding season (n=8)
Seminiferous tubules		
Luminal component	11.98 ± 0.28	Not detected
Cellular component	81.27 ± 0.54	67.6 ± 0.45
Interstitialum	6.75 ± 0.43 <sup>a</sup>	32.4 ± 0.79 <sup>b</sup>
Blood vessels	0.36 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.18 <sup>b</sup>
Lymphatic spaces	4.78 ± 0.53	5.84 ± 0.62
Endothelial cells	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.004 <sup>b</sup>
Mesenchymal cells	0.32 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.1 ± 0.27 <sup>b</sup>
Myoid cells	0.31 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.21 <sup>b</sup>
Leydig cells	0.82 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.14 ± 0.35 <sup>b</sup>
Pericytes	0.003 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.0002 <sup>b</sup>

Values are the mean ± SEM. In each row, values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Absolute volume (mm<sup>3</sup>) of testicular components of the pheasant during the breeding and nonbreeding seasons.

Testicular component	Breeding season (n=8)	Nonbreeding season (n=8)
Seminiferous tubules		
Luminal component	372.4 ± 12.34	Not detected
Cellular component	2526.7 ± 38.46 <sup>a</sup>	39.9 ± 4.88 <sup>b</sup>
Interstitialum	209.8 ± 8.15 <sup>a</sup>	19.1 ± 1.78 <sup>b</sup>
Blood vessels	11.2 ± 4.15 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.09 <sup>b</sup>
Lymphatic spaces	148.6 ± 10.17 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.49 <sup>b</sup>
Endothelial cells	4.8 ± 2.25 <sup>a</sup>	0.006 ± 0.001 <sup>b</sup>
Mesenchymal cells	9.9 ± 3.07 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.39 <sup>b</sup>
Myoid cells	9.6 ± 1.32 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.54 <sup>b</sup>
Leydig cells	25.49 ± 5.22 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.48 <sup>b</sup>
Pericytes	0.01 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.001 ± 0.0002 <sup>b</sup>

Values are the mean ± SEM. In each row, values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table 4.** Total number (10<sup>6</sup> cells/testis) of interstitial cell types in the pheasant during the breeding and nonbreeding seasons.

Cell type	Breeding season (n=8)	Nonbreeding season (n=8)
Mesenchymal cells	23.22 ± 1.37 <sup>a</sup>	7.87 ± 0.38 <sup>b</sup>
Myoid cells	14.93 ± 0.78 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.15 <sup>b</sup>
Endothelial cells	7.52 ± 0.95 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.02 <sup>b</sup>
Pericytes	2.32 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>b</sup>
Leydig cells	24.53 ± 2.48 <sup>a</sup>	6.23 ± 0.24 <sup>b</sup>

Values are the mean ± SEM. In each row, values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 5. Average volume ( $\mu\text{m}^3$ ) of interstitial cell types in the pheasant during the breeding and nonbreeding seasons.

Cell type	Breeding season (n=8)	Nonbreeding season (n=8)
Mesenchymal cells	698 $\pm$ 15	612 $\pm$ 38
Myoid cells	664 $\pm$ 23	632 $\pm$ 49
Leydig cells	1039 $\pm$ 64 <sup>a</sup>	767 $\pm$ 92 <sup>b</sup>

Values are the mean  $\pm$  SEM. In each row, values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 6. Serum testosterone, LH-stimulated testosterone release, sperm production, and length of the seminiferous tubule in the pheasant during the breeding and nonbreeding seasons.

Parameters	Breeding season	Nonbreeding season
Serum testosterone(ng/dl)	295.5 $\pm$ 12.14 <sup>a</sup>	35.34 $\pm$ 1.39 <sup>b</sup>
LH-stimulated testosterone release(ng/testis/3hours)	2713 $\pm$ 122.5 <sup>a</sup>	183 $\pm$ 10.36 <sup>b</sup>
Sperm production( $\times 10^6$ )	1665.45 $\pm$ 82.4 <sup>a</sup>	Not detected
Length of the seminiferous tubule (m/testis)	80.83 $\pm$ 3.56 <sup>a</sup>	10.85 $\pm$ 2.34 <sup>b</sup>

Values are the mean  $\pm$  SEM. In each row, values with different superscripts (a, b) are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 고찰

고환의 구조와 기능의 상호 연관성을 알아보기 위한 연구를 수행하고자 할 때 예로부터 계절번식 포유동물을 실험대상으로 하여 자연상태<sup>9,11</sup>, 빛의 양을 인위적으로 조절하거나<sup>10</sup> 뇌하수체 절개(hypophysectomy)<sup>28</sup>, 방사선조사<sup>29</sup> 및 여러 가지 화학물질에 노출<sup>30</sup>시킨 다음 고환을 구성하고 있는 세포의 변화 및 호르몬 분비의 변화를 관찰하였다. 그러나 현재까지도 계절번식 조류에서는 번식주기에 따른 고환의 간단한 조직학적인 구성과 호르몬의 변동에 관한 연구만 있을 뿐이고 저자의 견해에 의하면 한국산 꿩<sup>20</sup>을 포함한 계절번식 조류에서 번식주기에 따른 고환 간질조직의 형태계측에 관한 보고는 없다. 따라서 이 실험에서 얻어진 자료는 주로 지금까지 보고된 계절번식 포유동물류에서의 결과와 비교하여 고찰하고자 한다.

한국산 꿩 고환 간질조직의 일반적인 구성은 포유동물류<sup>2-4,23,25</sup>와 유사하였으나 고환에서 간질조직이 차지하고 있는 비율은 햄스터에서<sup>10</sup> 번식기 및 비번식기에 각각 6.5%, 16.5%이며 계절번식 조류인 예류<sup>31</sup>는 12.5 - 27.5%, 꿩에서는 번식기에는 6.75%, 비번식기에는 32.4%이었다. 이러한 결과는 계절번식 동물에서 조류는 포유동물보다 번식주기에 따라서 간질조직의 변화가 많은 것을 확인 할 수 있었고 이것은 간질조직을 이루고 있는 각 세포 변화 유형도 포유동물류와는 큰 차이를 나

타내는 것과 외부환경 변화에 보다 더 민감하게 반응하고 있음을 암시하고 있다. 또한 번식기에 간질조직의 비율이 감소하는 것은 정자발생으로 인하여 곱슬정세관이 차지하는 비율이 상대적으로 증가함으로써 초래된 결과이다.

계절번식 동물에서 간질세포의 숫자에 관한 연구는 많은 차이를 나타내고 있다. 햄스터<sup>10</sup>와 말<sup>32</sup>에서는 비번식기에 큰 폭으로 감소되고 바위너구리<sup>9</sup>에서는 감소되는 경향을 보였으나 유의성이 없었다. 이와는 달리 수양<sup>33</sup>은 숫자의 변화가 전혀 없다. 한국산 꿩에서는 74% 감소되었는데 이러한 결과는 계절번식 동물에서 번식주기에 따른 간질세포 숫자의 차이는 일반적인 것이 아니라 종에 따라서 다르게 반응하는 것으로 생각된다. 또한 Aire<sup>34</sup>는 닭, 오리, 메추라기의 간질조직의 구조에 관한 연구에서 간질세포가 적게 관찰됨을 보고하였고 번식기에 햄스터<sup>10</sup>와 말<sup>32</sup>에서 고환 1g 당 간질세포의 숫자는 각각  $15.32 \times 10^6$ ,  $18.7 \times 10^6$  이었으나 꿩에서는  $8.58 \times 10^6$ 이었다. 따라서 이러한 결과를 종합하여 볼 때 일반적으로 조류가 포유동물류보다 간질세포의 숫자가 적음을 확인할 수 있었다.

고환에서 간질세포가 차지하고 있는 절대부피의 계절적인 변화는 바위너구리에서 간질세포의 평균부피 및 간질세포 미세구조의 양과 밀접한 연관성이 있다<sup>9</sup>. 그러나 계절번식 동물인 바위너구리에서 간질세포는 계절적인 변화를 나타내지 않는다. 바위너구리와 마찬가지로

노루<sup>35</sup>와 박쥐<sup>36</sup>도 간질세포의 절대 부피가 계절적인 변화를 나타내는 것은 간질세포의 숫자 증가보다는 주로 간질세포 평균부피 증가에 의한 것이라고 설명되었다. 반면에 말에서 간질세포 절대부피의 계절적인 변화는 세포의 크기보다는 세포의 숫자와 연관성이 있음을 보고하였다<sup>32</sup>. 한국산 썩에서는 전혀 다르게 간질세포 절대부피의 증가와 더불어 간질세포의 크기는 물론 숫자도 유의성 있게 증가되어 있는 것으로 보아 썩 간질세포의 숫자와 크기가 간질세포 절대부피의 계절적인 변화에 미치는 영향은 말과 바위너구리 사이의 중간형에 속하는 것으로 확인되었다.

간질세포의 숫자가 큰 폭으로 증가하는 기원(mitosis or differentiation) 과 운명(cell death or dedifferentiation)은 알려져 있지 않다. 썩 번식기에 간질세포의 숫자는 비번식기에 비하여 400% 증가되어 있었다. 간질세포 숫자 변동이 세포 자체의 체세포분열에 의한 것인지 혹은 기타 간질세포로부터 분화에 의한 것인지에 관하여 많은 논란이 있었으나 최근에 흰쥐에서의 보고에 의하면 중간엽세포가 간질세포의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>4,30,37</sup> 썩에서 번식기에 간질세포와 중간엽세포가 동시에 증가하는 양상은 관찰되었으나 간질세포의 기원에 관한 정확한 세포의 종류는 이 연구에서는 모호한 점이 많고 추후에 이에 관한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 비번식기에 중간엽세포 숫자가 증가하지 않는 것과 중간엽세포의 숫자  $7.87 \times 10^6$ 는  $18.3 \times 10^6$ 의 간질세포 손실에 대한 충분한 설명이 되지 않기 때문에 간질세포가 감소하는 것은 아마도 간질세포가 중간엽세포로 재분화(dedifferentiation) 된다기 보다는 세포 죽음의 결과임을 암시하고 Table 4에 보이는 간질세포를 포함한 다양한 세포 숫자의 계절적인 변화는 썩을 조류 간질세포의 기원과 운명에 관한 연구에 적합한 실험동물 모델로 이용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

비번식기에 썩 곱슬정세관의 관강이 관찰되지 않는 것은 가치 있는 결과이다. 이는 Srrtoli 세포 분비의 완전한 정지를 의미하고 있다. 햄스터에서 고환 퇴축 동안 곱슬정세관에서 분비되는 액상 물질이 번식기에 비하여 현저하게 감소되어 있고 곱슬정세관 직경의 감소, 곱슬정세관 관강이 없는 것과 정자발생의 저해는 흰쥐에서 뇌하수체를 절개한 효과와 유사한 결과를 보여준다.<sup>38</sup>

Lincoln<sup>8</sup>은 계절번식 동물에서 고환의 무게가 최대치의 30%이하로 감소되면 정자발생 세포들의 완전한 성숙이 없어서 정자발생이 완전하게 정지되는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서도 비번식기에 고환이 98% 감소되었고 정자생성은 관찰되지 않아 일치하는 결과를

얻었다.

테스토스테론 농도는 간질세포의 평균부피와는 연관성이 없고 고환내 숫자와 밀접한 연관성이 있다.<sup>32</sup> 그러나 햄스터, 흰쥐 및 토끼를 대상으로 한 연구에서는 테스토스테론 농도는 숫자보다는 평균부피와 연관성이 있음을 보고하였다.<sup>2</sup> 이 실험에서는 비번식기에 평균부피, 총 숫자 및 테스토스테론 농도가 각각 74%, 27%, 88% 감소하여 썩에서는 테스토스테론 농도는 간질세포의 숫자뿐만 아니라 평균부피와 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 이러한 보고들을 바탕으로 계절번식 포유동물류에서는 필수적으로 간질세포의 부피와 숫자 중 어느 한 가지의 요소가 테스토스테론 농도와 연관성이 있고 조류에서는 이 두 가지 요소가 모두 연관성이 있음을 추론해 볼 수 있으나 이를 구체적으로 입증하기 위하여는 여러 종의 계절번식 조류를 대상으로 비교하여 연구할 필요가 있다.

계절번식 조류에서<sup>7,12,13,17</sup> 고환이 황체형성호르몬 자극에 대하여 계절에 따라서 다른 반응정도를 나타내는 것은 테스토스테론 분비 양상에 중요한 역할을 담당하고 있다. 이 연구에서 황체형성호르몬 자극에 대한 고환 테스토스테론 분비와 더불어 혈청 테스토스테론이 계절적인 변화를 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 한국산 썩에서도 다른 계절번식 조류에서와 마찬가지로 계절적인 테스토스테론 농도의 변화는 황체형성호르몬 자극에 대한 고환의 계절에 따른 반응정도의 차이에 영향이 있음을 확인할 수 있었다.

간질세포에서 관찰되는 큰 지방방울(lipid droplets)과 양의 증가는 생쥐에서 뇌하수체 절개 후 비활성기(inactive state)의 고환의 특징이며<sup>39</sup> 흰쥐에서도 성숙 간질세포에 비하여 미성숙 세포에서 크고 많은 양의 지방방울이 관찰되었다.<sup>4,23,37</sup> 본 실험에서도 비번식기의 간질세포 세포질 내에 번식기에 비하여 숫자는 감소하였으나 크기가 명확하게 증가한 지방방울이 다수 관찰되어 포유동물류에서 미성숙 간질세포와 유사한 특징을 갖고 있었고 지방방울은 테스토스테론 분비와 밀접한 관련이 있으므로 이는 테스토스테론 분비 대사의 기능이 저하되어 있음을 의미하며 비번식기에 테스토스테론 농도가 감소하는 것으로 보아 썩에서 간질세포내 지방방울의 크기는 혈청 테스토스테론 농도와 반비례의 관계에 있음을 알 수 있었다.

## 결론

한국산 썩에서 번식기와 비번식기에 고환의 스테로이드 형성 능의 변화와 결부시켜 고환 간질조직을 이루고



있는 세포유형의 상세한 양적인 변화의 정보를 얻기 위하여 이 연구를 수행하였다. 비번식기에 고환무계, 정자 생성, 혈청 테스토스테론농도, 황체형성호르몬 자극에 대한 고환 테스토스테론 분비 및 곱슬정세관의 길이는 비번식기에 비하여 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 번식기의 고환 부피에서 곱슬정세관과 간질세포는 각각 93.25%와 0.82%를 차지하고 있었고 간질세포의 평균 부피는  $1039 \mu\text{m}^3$ 이었으며, 고환내 총 간질세포의 숫자는  $24.53 \times 10^6$ 이었다. 비번식기에 곱슬정세관 98% 감소, 곱슬정세관 관강(100%), 간질조직(90%), 혈관(84%), 림프공간(97%), 간질세포(79%), 중간엽세포(51%) 및 근모양세포(61%) 절대부피의 감소로 인하여 꿩 고환의 부피는 98% 감소되어 있었다. 번식기 고환 조직당 간질세포, 중간엽세포 및 근모양세포의 숫자는 비번식기에 비하여 유의성 있게 증가되었다( $p < 0.05$ ). 비번식기에 간질세포의 평균부피는 74% 감소되어 있었으나 근모양세포와 중간엽세포의 평균부피는 변화가 없었다. 이러한 결과는 한국산 꿩은 번식기와 비번식기에 고환의 구조가 현저한 차이가 있음을 확인하였고 간질세포의 형태계측학적인 변화와 혈청 및 황체형성호르몬 자극에 대한 고환 테스토스테론 농도 변화가 밀접한 관련성이 있는 것은 한국산 꿩을 조류 고환의 형태와 기능의 상호연관성에 관한 연구에 실험동물 모델로 이용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

### 참고문헌

- Russel LD, de Franca LR. Building a testis. *Tissue Cell*, 27:127-147, 1995.
- Mendis-Handagama SMLC, Zirkin BR, Ewing LL. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in hamster, rat, and guinea pig testes perfused *in vitro*. *Am J Anat*, 181:12-22, 1988.
- Rey RA, Nagle CA, Chemes H. Morphometric study of the testicular interstitial tissue of the monkey *Cebus apella* during postnatal development. *Tissue Cell*, 28: 31-42, 1996.
- Ariyaratne HBS, Chamindrani Mendis-Handagama SML. Changes in the testis interstitium of sprague dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod*, 62: 680-690, 2000.
- Ewing LL, Zirkin BR. Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res*, 39:599-632, 1983.
- Ewing LL, Wing TY, Cochran RC, BR Zirkin. Effect of lutenizing hormone on Leydig cell structure and testosterone secretion. *Endocrinology*, 112:1763-1769, 1983.
- Follett BK. Photoperiodism and seasonal breeding in birds and mammals, In Crighton CB, Haynes NB, Lamming GE, eds. *Buttersworths*, London: 267-293, 1978.
- Lincoln GA(1981): Seasonal aspects of testicular function, In Burger H, de Krester HD eds. *Raven Press*, New York: 255-302, 1981.
- Neaves WB. Changes in testicular Leydig cells and in plasma testosterone levels among seasonally breeding rock hydrax. *Biol Reprod*, 8:451-466, 1973.
- Sinha-Hikim AP, Bartke A, Russell LD. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: Light microscope findings. *Biol Reprod*, 39: 1225-1237, 1988.
- Hochereau-de Reviere MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J Reprod Fertil*, 54:209-213, 1978.
- Bluhm CK, Schwabl H, Schwabl A, et al. Variation in hypothalamic gonadotrophin-releasing hormone content, plasma and pituitary LH, and in-vitro testosterone release in a long-distance migratory bird, the garden warbler (*Sylvia borin*), under constant photoperiods. *J Endocrinol*, 128:339-345, 1991.
- Sharp PJ, Massa R, Bottoni L, et al. Photoperiodic and endocrine control of seasonal breeding in grey partridge (*Perdix perdix*). *J Zoo*, 209:187-200, 1986.
- Williams TD. Reproductive endocrinology of macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) and gentoo (*Pygoscelis papua*) penguins. *Gen Comp Endocrinol*, 85:230-240, 1992.
- Donham RS. Annual cycles of plasma LH and sex hormones in male and female mallards (*Anas platyrhynchos*). *Biol Reprod*, 21:1273-1285, 1979.
- Degen AA, Weil S, Rosenstrauch A, et al. Seasonal plasma levels of luteinizing and steroid hormones in male and female domestic ostriches (*Struthio camelus*). *Gen Comp Endocrinol*, 93:21-27, 1994.
- Dittami JP. Seasonal changes in the behavior and plasma titers of various hormones in barheaded geese. *Anser Indicus Z Tierpsychol*, 55:289-324, 1981.
- Fraissinet M, Varriale B, Pierantoni R, et al. Annual testicular activity in the gray partridge (*Perdix Perdix*

- L.). *Gen Comp Endocrinol*, 68:28-32, 1987.
19. Sakai H, Ishii S. Annual cycles of plasma gonadotropins and sex steroids in Japanese common pheasants, *Phasianus colchicus versicolor*. *Gen Comp Endocrinol*, 63:275-283, 1986.
  20. Kim IS, Yang HH. Seasonal changes of testicular weight, sperm production, serum testosterone, and in vitro testosterone release in Korean ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpowi*). *J Vet Med Sci*, 63(2): 151-156, 2001.
  21. Kim IS. Effects of exposure of lactating female rats to polychlorinated biphenyls (PCBs) on testis weight, sperm production and Sertoli cell numbers in the adult male offspring. *J Vet Med Sci*, 63(1) : 5-9, 2001.
  22. Kim IS, Ariyaratne HBS and Mendis-Handagama SMLC. Effects of continuous and intermittent exposure of lactating mothers to Aroclor 1242 on testicular steroidogenic function in the adult male offspring. *Tissue Cell*, 33 : 169-177, 2001.
  23. Kim IS, Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC. Changes in the testis interstitium of Brown Norway rats with aging and effects of luteinizing and thyroid hormones on the aged testes in enhancing the steroidogenic potential. *Biol Reprod*, 66(5):1359-1366, 2002.
  24. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, 26:235-301, 1969.
  25. Mendis-Handagama SMLC, Ewing LL. Sources of error in the estimation of Leydig cell numbers in control and atrophied mammalian testes. *J Microsc*, 59:73-82, 1990.
  26. Floderus S. Untersuchungdf uber den bau der menschlichen hypophyse mit besonderer berucksichtigung der quantitativen mikromorphologischen verhaltnisse. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 53:1-276, 1944.
  27. Kirby JD, Mankar MV, Hardesty D, et al. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis development and function in the domestic fowl. *Biol Reprod*, 55:910-916, 1996.
  28. Ahmad H, Haltmeyer GC, Eik-Nes KB. Maintenance of spermatogenesis with testosterone or dihydrotestosterone in hypophysectomized rats. *J Reprod Fertil*, 44: 103-107, 1975.
  29. Kerr JB, Donacchie K, Rommerts FFG. Selective destruction and regeneration of rat Leydig cells in vivo: a new method for the study of seminiferous tubular-interstitial tissue interaction. *Cell Tissue Res*, 242:145-156, 1985.
  30. Jackson AE, O' Leary PC, Ayers MM, et al. The effects of ethylene dimethane sulphonate (EDS) on rat Leydig cells: evidence to support a connective tissue origin of Leydig cells. *Biol Reprod*, 35:425-437, 1986.
  31. Malecki IA, Martin GB, O' Malley PJ, et al. Endocrine and testicular changes in a short-day seasonally breeding bird, the emu(*Dromaius novaehollandiae*), in southwestern Australia. *Ani Reprod Sci*, 53:143-155, 1998.
  32. Johnson L, Thompson DL. Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. *Biol Reprod*, 35:971-979, 1986.
  33. Hochereau-de Reviere MT, Perreau C, Lincoln GA. Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soy ram testis. *J Reprod Fertil*, 74: 329-334, 1985.
  34. Aire TA. The structure of the interstitial tissue of the active and resting avian testis. *J Vet Res*, 64:291-299, 1997.
  35. Short RV, Mann T. The sexual cycle of a seasonally breeding mammal, the roebuck (*Capreolus capreolus*). *J Reprod Fertil*, 12:337-351, 1966.
  36. Pearson OP, Koford MR, Pearson AK. Reproduction of the lump-nosed bat (*Corynorhinus rafinesquei*) in California. *J Mammol*, 59:273-320, 1952.
  37. Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. Kinetics studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology*, 12:762-770, 1989.
  38. Bartke A, Amador AG, Chandrashekar V, et al. Seasonal differences in testicular receptors and steroidogenesis. *J Steroid Biochem*, 27:581-587, 1987.
  39. Aoki A. Hormonal control of Leydig cell differentiation. *Protoplasma*, 71:209-225, 1970.